**TESES 2020**

**Título:**

Evaluation of antitumoral activity of novel dinuclear Cu2+-complexes on tumorigenesis: from the cytotoxic potential to the mechanism of action

**Autor:**

ZEINAB GHASEMISHAHRESTANI

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

TESE

**Abreviatura:**

GHASEMISHAHRESTANI, Z.

**Data da Defesa:**

16/12/2020

**Resumo:**

Resumo não fornecido em língua portuguesa

**Palavras-chave:**

Palavras chaves não fornecidas em língua portuguesa

**Abstract:**

Cancer is a major cause of death worldwide. Current chemotherapy for cancer treatment associate with many side effects and tumor cells often become resistant to the drugs. Hence, development of chemotherapeutic strategies involving novel antitumor agents with increased efficacy and immunity has been the focus area of cancer treatment. The discovery of the antitumor properties of cisplatin in 1969 opened a new field in design and development of a new class of therapeutic drugs based on metal. The anticancer activities of Cu+2-complexes have been the focus of several researchers aiming to discover novel anticancer agents. In this study, we investigated the potential antitumor activity of two novel Cu+2-complexes, [Cu2(μ-CH3COO)(OH2)(L2)]· 1½H2O (R9) and [Cu2(μ-OH)(OH2)(HL2)]ClO4·2H2O (R10), in different cancer cell lines MCF-7 (breast adenocarcinoma), A549 (lung carcinoma) and PC3 (prostate carcinoma). Both Cu+2-complexes showed great cytotoxic effects compared with the positive control cisplatin. The IC50 (μM) values of R9 measured by the MTT assay in MCF-7, A549, PC3, was 1.01 ± 0.09, 1.01 ± 0.07 and 1.51 ± 0.06, respectively. On the other hand, MCF-7, A549, PC3 cell lines affected by R10 exhibited IC50 (μM) of 1.27 ± 0.14, 1.23 ± 0.09 and 1.38 ± 0.16, respectively. MCF10A, the healthy breast epithelial cell line, after treatment with R9 and R10, showed the IC50 (μM) of 8.19 ± 0.87 and 6.93 ± 0.96, respectively which is approximately 7-8 times more resistant than MCF-7, showing that Cu+2-complexes had a low toxicity to its relative non-cancerous cells. The pictures from invertor microscope gave us an idea of change in granularity that later proved by flow cytometry analysis which revealed the increase of granularity in both MCF-7 and A549 cell lines due to effect of R9 and R10 at IC50 concentration (1.0 μM) about 2, 2.6, 1.5 and 1.4 times higher than the untreated cells, respectively. Cu+2-complexes at ½ IC50, IC50 and 2×IC50 concentrations significantly reduced mitochondrial membrane potential (ΔΨm) and induced a high production of reactive oxygen species (ROS) in both MCF-7 and A549 cells measured through flow cytometry assay. The results of cell cycle arrest displayed the increase number of cells at Sub-G1 and concomitant decrease in G1,S and G2/M phases in both MCF-7 and A549 at IC50 concentration of R9 and R10. Together with TUNEL assay, confirmed that both Cu+2-complexes induced DNA fragmentation in theses tumor cells where the percentage of cells with fragmented DNA induced by R9 and R10 at IC50 concentration in MCF-7 and A549 were 3.5, 3.6, 2 and 2 times more than the untreated control, respectively that measured by flow cytometer. Moreover, the activation of caspase 9 exhibited that R9 and R10 treatment at IC50 concentration induced cell death mainly through the intrinsic apoptosis pathway. Competition between Cu+2-complexes and PI for DNA binding revealed non-significant changes in percentage of fluorescent cells/fluorescence intensity as compared to control in both cell lines, assured that the compounds cannot bind to DNA as an intercalating agent. In vivo assay with Galleria mellonella showed that R9 presented a lower toxicity in comparison to cisplatin at the same concentration (50 mg/kg). The results of G. mellonella agreed with the LD50 calculated in BALB/c mice treated with R9 and cisplatin. The results obtained in BALB/c mice is promising since the value of 71.6 mg/kg is much higher than the LD50 of cisplatin, 6.6 mg/kg. The high value of LD50 means a small toxicity of Cu+2-complex. The Results obtained in the label-free proteomic analysis of differentially expressed proteins in breast cancer cells in response to R10 treatment revealed that, 118 proteins were significantly downregulated were linked to the 194 downregulated pathways and 49 proteins were upregulated that were defined 40 upregulated pathways. On the other side, in MCF-7 treated with cisplatin, 58 proteins were downregulated responsible for 105 pathways downregulated and 37 proteins were upregulated associated to the 47 pathways upregulated. Our results confirmed the difference of up/downregulated proteins expressed in R10-treated and cisplatin-treated cells that might be related to the possible different mechanism of action of R10 and cisplatin. Total 6 proteins related to the downregulation of apoptosis pathway in R10-treated cell include: lamin B1, NRAS, MAPK1, MAPK3, spectrin alpha, and calpain 2. Whereas, apoptosis inducing factor (AIFM1) was related to the upregulation of apoptosis. Moreover, MCF-7 cell death treated with R10 might occur by direct activation of apoptosis through AIF by down regulation of heat shock 70-kDa protein HSP70 together with downregulation of lamin that favor the entrance of AIF to the nucleus. The apoptosis may relate to the downregulation of RAS-ERK pathway via down regulation of ezrin, moesin and β1-integrin (ITGβ) which affect the activation of RAS, down regulate protein 14-3-3 ε, β and ζ (tyrosine 3- monooxygenase, tryptophan 5-mono-oxygenase) and reduce ERK1/2. Furthermore, the low expression of 14-3-3ζ and dysregulation of CRM1/XPO1 (exportin 1) plus RAN GTPase, may sensitize cells to apoptosis. The downregulation of calpain, protein casein kinase, as well as catalytic (α3, α4) and regulatory (β5) subunits of proteosome may activate apoptotic pathways for DNA degradation. In addition, down regulation of vacuolar ATPase (V-ATPase) may help in suppressing the growth and survival of tumor and together with the rate-limiting glycolytic enzyme pyruvate kinase may have great impact in glycolytic flux and force the cells through oxidative phosphorylation. Altogether, these results confirm that the Cu+2-complexes tested have a great potential as an antitumor metallodrug and is highly competitive with cisplatin chemotherapy drug.

**Keywords:**

Cu+2-complexes;cytotoxicity,;intrinsic apoptosis;antitumor metallodrug;label-free proteomic

**Título:**

Biologia sintética de Yarrowia lipolytica visando a produção de biossurfactantes e carotenoides

**Autor:**

CAMILLA PIRES DE SOUZA

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

TESE

**Abreviatura:**

SOUZA, C. P.

**Data da Defesa:**

04/12/2020

**Resumo:**

A versatilidade metabólica da levedura não-convencional Yarrowia lipolytica incentivou o desenvolvimento de uma vasta gama de ferramentas de biologia sintética, o que tem permitido a construção de promissoras plataformas de produção de diferentes compostos de alto valor agregado. À vista disso, o presente estudo objetivou desenvolver cepas engenheiradas de Y. lipolytica visando a obtenção de dois produtos de interesse biotecnológico: o manosileritritol lipídio (MEL) e o β-caroteno. Para a produção de MELs, os genes emt1, mac1, mac2 e mmf1 de Ustilago maydis foram clonados em cepas auxotróficas derivadas da linhagem W29 através de duas estratégias: (I) fusionados ao peptídeo autocatalítico 2A em um único cassete de expressão; e (II) separados em cassetes de expressão independentes, construídos pelo sistema Golden Gate Assembly. As cepas recombinantes foram capazes de sintetizar MELs em meios mínimos contendo manose e eritritol como substrato. O produto gerado pelos recombinantes provenientes da estratégia de clonagem II foi caracterizado por espectrometria de massas como MEL-C2, devido à presença apenas de um grupamento acetila na porção hidrofílica, e sua produção volumétrica alcançou 0,42 g.L-1. A clonagem da proteína transmembrana MMF1 não favoreceu a secreção do MEL-C2, e o uso do glicerol como fonte de carbono não alterou as características estruturais deste glicolipídio nas condições testadas, a fim de torna-lo relevante comercialmente. No entanto, esse é o primeiro relato na literatura da produção de MELs por Y. lipolytica. Para a produção de β-caroteno, o gene URA3 da linhagem selvagem brasileira IMUFRJ 50682 foi nocauteado pelo método CRISPR/Cas9 através da estratégia combinatória de clivagem dupla, com eficiência de excisão de toda a sequência codificante de 5 – 28%. Os mutantes auxotróficos ura3Δ IMUFRJ 50682 construídos foram transformados com os genes heterólogos carB e carRP de Mucor circinelloides, e o gene homólogo GGS1. As cepas recombinantes foram capazes de sintetizar de 18,5 a 50,1 mg.L-1 de beta-caroteno, com a produção específica variando de 2,4 a 4,8 mg.g cel-1 em meio rico e mínimo, contendo glicose como fonte de carbono. O emprego da glicerina loira em meio definido levou a síntese de 50,6 mg.L-1 (2,9 mg.g cel-1) de carotenoides, e a redução da razão C/N permitiu que cepa recombinante carotenogênica atingisse 54,4 mg.L-1 (2,7 mg.g cel-1) de carotenoides totais, composto de 91% de beta-caroteno. A substituição dos componentes do meio por milhocina apresentou impacto positivo na síntese de carotenoides. A produtividade e as produções volumétrica e específica máximas alcançadas foram de 4,8 mg.L-1.h-1, 154,7 mg.L-1 e 11,6 mg.g cel-1, respectivamente, mostrando pela primeira vez o potencial da cepa brasileira IMUFRJ 50682 na bioconversão de resíduos para produção em larga escala de β-caroteno. Assim, o presente trabalho mostra a ampla flexibilidade da espécie Y. lipolytica para servir como chassi biotecnológico em diferentes aplicações industriais.

**Palavras-chave:**

Yarrowia lipolytica;manosileritrirol lipídios;beta-caroteno;CRISPR/Cas9;Golden gate assembly;resíduos industriais

**Abstract:**

The metabolic versatility of the non-conventional yeast Yarrowia lipolytica has encouraged the development of a wide range of synthetic biology tools, which has allowed the construction of promising platforms for production of high added-value compounds. In view of this, the present study aimed to develop engineered strains of Y. lipolytica in order to obtain two products of biotechnological interest: mannosylerythritol lipid (MEL) and β-carotene. For MEL production, emt1, mac1, mac2 and mmf1 genes from Ustilago maydis were cloned in autotrophic strains derived from Y. lipolytica W29. Two cloning strategies were userd: (I) genes were fused with the 2A self-cleaving peptides into a single expression cassette; and (II) genes were separated into three independent expression cassettes by the Golden Gate Assembly system. The recombinant strains were able to synthesize MELs in minimal media containing mannose and erythritol as a substrate. The product generated by the recombinants from cloning strategy II was characterized by mass spectrometry as MEL-C2, due to the presence of only an acetyl group in the hydrophilic portion, and its volumetric production reached 0.42 g.L-1. The cloning of the transmembrane protein MMF1 did not favor the secretion of MEL-C2, and the use of glycerol as a carbon source did not alter the structural characteristics of this glycolipid under the conditions tested, in order to make it commercially relevant. However, this is the first report in the literature on MEL production by Y. lipolytica. For β-carotene production, the URA3 gene of the Brazilian IMUFRJ 50682 wild-type strain was knocked out by a combinatorial dual cleavage CRISPR/Cas9-mediated strategy. The excision efficiency of all coding sequence ranged from 5 to 28%. The ura3Δ IMUFRJ 50682 auxotrophic mutants were transformed with the heterologous genes carB and carRP, and the homologous gene GGS1. The recombinant strains were able to synthesize from 18.5 to 50.1 mg.L-1 of β-carotene with specific production ranging from 2.4 to 4.8 mg.g cel-1 in rich and minimal medium containing glucose as a carbon source. The use of crude glycerol in a defined medium led to a carotenoid production of 50.6 mg.L-1 (2.9 mg.g cel-1) and the decrease of C/N ratio allowed the carotenogenic recombinant strain to reach 54.4 mg.L-1 (2.7 mg.g cel-1) of total carotenoids, composed of 91% of β-carotene. The substitution of culture medium for corn steep liquor had a positive effect on carotenoid production. The maximum carotenoid productivity and volumetric and specific productions were 4.8 mg.L-1.h-1, 154.7 mg.L-1 and 11.6 mg.g cel-1, respectively. It shows for the first time the potential of the Brazilian IMUFRJ 50682 strain in the bioconversion of residues for large-scale production of β-carotene. Thus, the present work reveals the wide flexibility of the Y. lipolytica species to serve as a biotechnological chassis in different industrial applications.

**Keywords:**

Yarrowia lipolitica;mannosylerythritol lipids;beta-carotene;CRISPR/Cas9;Golden gate assembly;indsutrial waste

**Título:**

Análise dos biomarcadores bioquímicos em militares submetidos a treinamento físico vigoroso e prolongado

**Autor:**

MARCIO ANTONIO DE BARROS SENA

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

TESE

**Abreviatura:**

SENA, M. A. B.

**Data da Defesa:**

29/10/2020

**Resumo:**

O exercício físico moderado está associado com inúmeros benefícios para a saúde. Entretanto, se vigoroso e prolongado, pode levar à ocorrência de lesões e ao aumento da produção das espécies reativas de oxigênio (EROs). Se a produção das EROs superar o sistema antioxidante do organismo, instala-se um quadro de estresse oxidativo. Nesta situação, o indivíduo fica susceptível a uma série de malefícios, como danos na membrana celular, proteínas e DNA. Em geral, estes eventos estão relacionados com a fadiga muscular, queda no desempenho e desistências nos treinamentos físicos. Portanto, este trabalho objetivou avaliar o comportamento de biomarcadores sanguíneos de estresse oxidativo, lesão celular e hematológicas em militares submetidos a treinamento físico vigoroso e prolongado (TFVP) durante o curso básico paraquedista do Exército Brasileiro. Foi realizada uma pesquisa observacional analítica transversal em um grupo de 22 militares do Exército Brasileiro, do sexo masculino (21 a 38 anos), voluntários a realização do curso básico paraquedista. Foi realizada coleta de sangue para investigação dos marcadores bioquímicos: I) dano oxidativo: carbonilação de proteína (CP), malondialdeído (MDA) e glutationa oxidada (GSSG); II) sistema antioxidante: grupamento sulfidrila (GS) totais, ácido úrico (AU), enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), bem como, a atividade antioxidante total (AAT); III) parâmetros minerais: cálcio (Ca2+) e magnésio (Mg) e; IV) dano muscular: creatina quinase (CK) e lactato desidrogenase (LDH); V) dano hepático: aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e gama glutamil transferase (GGT); VI) parâmetros hematológicos: leucócitos totais (LT), hemácias, hemoblogina (Hb) e hematócrito (Hct). As coletas de sangue ocorreram: antes do início da realização do curso (T0) com os voluntários em jejum, após a 1ª semana (T1), 2ª semana (T2) e 3ª semana (T3) de TFVP e três dias após o término do treinamento, caracterizado pela recuperação (T4). Observou-se que as três semanas de TFVP induziu um aumento significativo nos biomarcadores CP, MDA, GS totais, SOD,AAT, Ca2+, CK, LDH, AST, ALT e LT nos períodos T1, T2, T3 e/ou T4 versus T0, sendo mais pronunciado em T1. A maioria dos biomarcadores apresentou uma redução gradual versus T1, exceto Ca2+ e ALT. Foi observado uma redução significativa na GSSG e no Mg em T1 versus T0. A CAT mostrou um aumento significativo em T3 e T4 versus T0 e T1. O AU apresentou uma redução significativa em T4 versus T1, T2 e T3. A maioria dos biomarcadores demonstrou valores próximos ou inferiores em T4 versus T0 (P<0,05). Nosso estudo é pioneiro na apresentação da relação de um conjunto de biomarcadores bioquímicos de estresse oxidativo afetando a capacidade antioxidante de militares e provocando lesão celular. É possível que as descobertas deste estudo ampliem a compreensão fisiológica e possam servir de base para que o comando do Exército Brasileiro e confederações esportivas adotem medidas preventivas visando preservar a saúde dos indivíduos submetidos a estes tipos de estresses físicos.

**Palavras-chave:**

Exercício;Espécie reativas de oxigênio;Estresse oxidativo;Militares

**Abstract:**

Moderate physical exercise is associated with several health benefits. However, if vigorous and prolonged, it can lead to injury and increased production of reactive oxygen species (ROS). If the production of ROS exceeds the body’s antioxidant system, oxidative stress is developed in the organism. In this situation, the individual is susceptible to a series of harms, such as damage to the cell membrane, proteins, and DNA. Generally, these events are related to muscle fatigue, drop in performance, and burnout. Therefore, this work aimed to evaluate the behavior of blood biomarkers of oxidative stress, cell, and hematological injuries in military personnel submitted to vigorous and prolonged physical training (VPPT) during the basic parachutist course of the Brazilian Army. A cross-sectional analytical observational research was conducted in a group of 22 Brazilian Army male soldiers (21 to 38 years) of the basic parachutist course. Blood collection was performed to investigate the biochemical markers: I) oxidative damage: protein carbonylation (PC), malondialdehyde (MDA), and oxidized glutathione (GSSG); II) antioxidant system: total sulfhydryl group (SG), uric acid (UA), superoxide dismutase (SOD), and catalase (CAT) enzymes, as well as total antioxidant activity (TAA); III) mineral parameters: magnesium (Mg) and calcium (Ca2+); IV) muscle damage: creatine kinase (CK) and lactate dehydrogenase (LDH); V) liver damage: aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), and gamma-glutamyl transferase (GGT); VI) hematological parameters: total leukocytes (TL), erythrocytes, hemoglobin (Hb), and hematocrit (Hct). Blood collections occurred: before the course (T0) with the fasting volunteers, at the end of the 1st week (T1), 2nd week (T2), and 3rd week (T3) of VPPT, and three days after the training period, characterized by recovery (T4). We observed that the three weeks of VPPT induced a significant increase in the biomarkers PC, MDA, total SG, SOD, TAA, Ca2+, CK, LDH, AST, ALT, and TL in periods T1, T2, T3, and/or T4 versus T0, being more pronounced in T1. Most biomarkers showed a gradual reduction versus T1, except for Ca2+ and ALT. A significant reduction in GSSG and Mg was observed at T1 versus T0. CAT showed a significant increase in T3 and T4 versus T0 and T1. The UA showed a significant reduction in T4 versus T1, T2, and T3. Most biomarkers showed values close to or below T4 versus T0 (P<0.05). Our study is pioneering in presenting the relationship of a set of biochemical markers of oxidative stress affecting the antioxidant capacity of military personnel and causing cell damage. Thus, it is possible that the findings of this study expand physiological understandings and may serve as a basis for the Brazilian Army command and sports confederations to adopt preventive measures aimed at preserving the health of individuals submitted to these types of physical stresses.

**Keywords:**

Exercise;Reactive oxygen species;Oxidative stress;Military

**Título:**

ESTUDOS ESTRUTURAIS E DA DINÂMICA DA ENZIMA FKBP12 DE MICRO-ORGANISMOS: BUSCA POR NOVOS ALVOS TERAPÊUTICOS

**Autor:**

GUILHERME CALDAS DE ANDRADE

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

TESE

**Abreviatura:**

ANDRADE, G.C.

**Data da Defesa:**

29/04/2020

**Resumo:**

As infecções microbianas continuam sendo um desafio para a humanidade, com considerável impacto no sistema de saúde de vários países devido à sua elevada taxa de mortalidade. A crescente resistência e a diminuição do desenvolvimento de novos agentes tornaram a terapia convencional ineficaz. Dessa forma, a pesquisa de medicamentos mais ativos e novos alvos para essas doenças é essencial. A enzima FKBP12 (peptidil-prolil cis-trans isomerase) foi escolhida como alvo para esses estudos. Embora o ortólogo humano já seja usado como alvo para compostos, essa proteína também está presente em vários micro-organismos causadores de doenças, que difere em cerca de 40% em sua sequência primária em comparação à primeira. Dessa maneira, essas enzimas são validadas como alvos biológicos. Foram selecionadas as proteínas FKBP12 de Trypanosoma brucei (TbFKBP12) e Mycobacterium tuberculosis (MtFKBP12). Elas foram expressas em E. coli BL21 (DE3), induzidas com IPTG e purificadas, em etapas, através de cromatografia de afinidade e exclusão molecular. A proteína MtFKBP12 foi isotopicamente marcada com 15N e 13C e todos os experimentos necessários para o assinalamento sequencial e de correlação espacial via NOESY foram realizados por RMN. Os NOEs atribuídos, as restrições diédricas previstas e ligações de hidrogênio foram usadas como entrada para o cálculo estrutural usando Aria2.2 / CNS1.2. Diversos ciclos de cálculo foram realizados usando protocolos padrão de simulated-annealing. Os 20 confôrmeros de menor energia foram refinados por dinâmica em água. A estrutura da MtFKBP12 é semelhante às outras proteínas desta família, porém com uma região N-terminal divergente que mostra pouca convergência estrutural. A dinâmica da cadeia principal do MtFKBP12 foi investigada medindo os parâmetros de relaxação: 15N R1, R2 e 1H-15N NOE heteronuclear e indicaram que as principais variações nos parâmetros ocorrem nos resíduos da região N-terminal e nos loops β1- β2 e hélice π-β5. Experimentos de titulação com o peptídeo ligante N-Succinil-AXPF-ρ- nitroanilida (X: leucina ou alanina) foram realizados com as proteínas TbFKBP12 e MtFKBP12. Além disto, experimentos de STD envolvendo a proteína MtFKBP12 e os dois substratos já citados também foram realizados. Os dados indicaram que a interação parece maior com o ligante N-Succinil-ALPF-ρ-nitroanilida. O Docking molecular realizado com o servidor HADDOCK 2.2 permitiu observar uma região preferencial de ligação para ambos os substratos na MtFKBP12. Tais dados corroboraram os dados experimentais obtidos através de CSP e STD. Os resultados obtidos com este trabalho identificam os principais resíduos das proteínas envolvidos na ligação com o substrato, o que pode facilitar a identificação de ligantes de baixa afinidade com potencial para subsequentemente se tornarem compostos líderes no desenho de novos medicamentos.

**Palavras-chave:**

Estrutura de proteínas;FKBP12;Enzimas;PPIase

**Abstract:**

Microbial infections remain a challenge for humankind with considerable impact on health care system of several countries due to its elevated mortality rate. The rising resistance and decrease of development of new agents has turned conventional therapy ineffective. In this way, the research of more effective drugs and targets for these diseases are essential. FKBP12 (peptidylprolyl cis-trans isomerase) enzyme was chosen as a target for such studies. Although human ortholog is already used as a target for compounds, this protein is also present in numerous disease-causing microorganisms, and differ by about 40% in their primary sequence compared to the first one. In this way, such enzymes are validated as biological targets. Initially, FKBP12 proteins from Trypanosoma brucei (TbFKBP12) and Mycobacterium tuberculosis (MtFKBP12) were selected. They were expressed in E. coli BL21(DE3), induced with IPTG and purified with steps of affinity and size-exclusion chromatography. The MtFKBP12 protein was isotopically labelled with 15N and 13C and had all experiments required for NMR assignment performed, besides NOESY spatial correlation experiments. Lists containing assigned NOEs, predicted dihedral constraints and hydrogen bonds were used as input of the structural calculation using Aria2.2/CNS1.2. Several calculation cycles were performed using standard simulated annealing protocols. Finally, the 20 best conformers were refined by dynamics in water. It was possible to observe that MtFKBP12 structure is similar with the other proteins of this family with a divergent N-terminal portion that shows little structural convergence. The backbone dynamics of MtFKBP12 were investigated measuring the relaxation parameters: 15N R1 and R2 relaxation experiments and 1H-15N heteronuclear NOE and indicated that the main variations in the parameters occur in the residues of the N-terminal region and in the β1-β2 loops and helix π-β5. Titration experiments with N-succinyl-AXPF-ρ- nitroanilide (X: leucine or alanine) were performed with TbFKBP12 and MtFKBP12 proteins, in addition to STD experiments involving the MtFKBP12 protein and the two substrates already mentioned. Data indicated that the interaction appears to be stronger with the N-Succinyl- ALPF-ρ-nitroanilide ligand. The molecular docking performed with the HADDOCK 2.2 server allowed us to observe a preferred region of substrate binding in the protein. Such data corroborated the experimental data obtained previously. The results obtained with this work identify the main residues of proteins involved in binding with the substrate, which may facilitate the identification of low affinity ligands that can subsequently become leading compounds in the design of new drugs.

**Keywords:**

Protein Structure;FKBP12;Enzymes;PPIase

**Título:**

PRODUÇÃO DE BIOLUBRIFICANTE POR TRANSESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DE ÉSTERES METÍLICOS DE SOJA UTILIZANDO LIPASE NÃO COMERCIAL DE Rhizomucor miehei

**Autor:**

KASSIA LEONE IGNACIO

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

TESE

**Abreviatura:**

IGNACIO, K.L.

**Data da Defesa:**

28/04/2020

**Resumo:**

Os lubrificantes são produtos usados para redução de desgaste e corrosão, refrigeração e proteção de componentes móveis de motores e equipamentos. A classe de óleos sintéticos, tais como ésteres de poliois, constitui-se de moléculas produzidas por esterificação com álcoois alifáticos polihidroxilados. A conversão de óleos vegetais em poliol ésteres melhora sua estabilidade térmica e resistência à hidrólise. Todavia, o alto custo de enzimas comerciais limita a viabilidade econômica de suas aplicações. A utilização de enzimas produzidas por Fermentação em Estado Sólido (FES) de rejeitos agroindustriais representa uma alternativa de redução dos custos desses biocatalisadores. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho é desenvolver biocatalisadores de baixo custo para a síntese de biolubrificantes, especificamente, com a lipase de Rhyzomucor miehei, por FES, e a obtenção de biolubrificantes por catálise enzimática. A FES foi conduzida em biorreatores do tipo bandeja, contendo torta de babaçu e esporos de R. miehei. O sólido fermentado liofilizado constitui o Preparado Enzimático Sólido (PES). As reações para síntese de biolubrificantes foram realizadas em reatores de vidro encamisados e sob agitação. Ao meio racional, composto de neopentilglicol (NPG), biodiesel de soja (BDS) e água, foi adicionado o PES (20% m/m). A síntese do biolubrificante foi medida pela porcentagem das hidroxilas do NPG esterificadas, determinando-se o teor de ésteres de biodiesel em cada alíquota reacional por cromatografia gasosa e o teor de ácidos graxos livres por titulometria de neutralização. Um primeiro estudo reacional com planejamento experimental do tipo delineamento central composto rotacional (DCCR) foi conduzido tendo como variáveis a razão molar, a temperatura e o teor de água. Os resultados apontaram como melhor combinação a razão molar de 3,1 mols de BDS para 1 mol de NPG, acrescida de 2,5% (%m/m) de água, com temperatura de 45 °C. O produto teve suas características físico-químicas bem avaliadas em análises conduzidas pelo CENPES. As cinéticas até 120h revelaram conversões que atingem 100% após 72h, sem modificação no percentual de acidez a partir disso. Conversões similares foram atingidas quando as reações foram catalisadas pela enzima comercial RM-IM (Lipozyme). Estudos de reutilização do PES demonstraram melhores resultados quando o PES não foi submetido a lavagens com solvente. A adição de NPG ou etanol ao meio reacional após 72h de reação resultou no consumo dos ácidos graxos, tendo a adição do poliálcool favorecido tanto o consumo dos ácidos graxos quanto do biodiesel remanescente (apenas 1,5% de biodiesel não foi transesterificado ou hidrolisado). Os resultados desta tese chegaram a um produto com alto percentual de conversão e com boas propriedades físico-químicas, produzido por catálise enzimática utilizando um biocatalisador obtido a partir de cultivo em coprodutos agroindustriais.

**Palavras-chave:**

Biolubrificantes;Lipase;Biodiesel de Soja;Fermentação em Estado Sólido;Rhizomucor miehei;Transesterificação

**Abstract:**

Lubricants are products used to reduce wear and corrosion, cooling and protection of movable engine components of and equipments. The class of synthetic oils, such as polyol esters, consists of molecules produced by esterification with polyhydroxylated aliphatic alcohols. Vegetable oils conversion into polyol esters improves their thermal stability and resistance to hydrolysis. However, the high cost of commercial enzymes limits the economic viability of their applications. The use of enzymes produced by Solid State Fermentation (SSF) of agro-industrial waste represents an alternative to reduce the biocatalysts costs. In this context, the objective of this work is to develop low cost biocatalysts for biolubricants synthesis, specifically, with Rhyzomucor miehei lipase, by SSF, and to obtain biolubricants by enzymatic catalysis. The SSF was conducted in tray-type bioreactors, containing babassu cake and R. miehei spores. The lyophilized fermented solid constitutes the Solid Enzyme Preparation (SEP). The synthesis reactions of biolubricants were carried out in jacketed glass reactors under agitation. SEP (20% w/w) was added to the rational medium, composed by neopentylglycol (NPG), soy biodiesel (SB) and water. The biolubricant synthesis was measured by the percentage of esterified NPG hydroxyls, determining the biodiesel esters content in each reaction aliquot by gas chromatography and the free fatty acids content by neutralization titrometry. A preliminary study by central composite rotational design (CCRD) was conducted with molar ratio, temperature and water content as variables. The results showed 188/5000 The results showed the best combination was molar ratio of 3.1:1 (BDS:NPG), plus 2.5% (% w/w) of water, and 45 ° C. The product was well evaluated concerning its physical-chemical characteristics in analyzes conducted by CENPES. The kinetics curves up to 120h revealed conversions of 100% after 72h, without changing the acidity from that. Similar conversions were achieved in reactions catalyzed by the commercial enzyme RM-IM (Lipozyme). SEP reuse have shown better results when SEP has not been subjected to solvent washes. The addition of NPG or ethanol to the reaction medium after 72 hours resulted in fatty acids consumption; the addition of polyalcohol favoring both fatty acids and remaining biodiesel consumption (only 1.5% of biodiesel was not transesterified or hydrolyzed). The results of this thesis reached a product with a high percentage of conversion and good physical-chemical properties, produced by enzymatic catalysis using a biocatalyst obtained from cultivation in agroindustrial by-products.

**Keywords:**

Biolubricants;Lipase;Soy Biodiesel;Solid State Fermentation;Rhizomucor Miehei;Transesterification

**Título:**

Desenvolvimento De Um Anticorpo Monoclonal Recombinante Para Tratamento De Altos Níveis De Colesterol

**Autor:**

THAYANA ARAUJO DA CRUZ

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

TESE

**Abreviatura:**

CRUZ, T. A.

**Data da Defesa:**

03/03/2020

**Resumo:**

Altos níveis de lipoproteína de baixa densidade (LDL) no sangue estão relacionados com um aumento de cerca de 50% no risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, que são a principal causa de morte em todo o mundo. Desde a década de 1980, as estatinas vêm sendo usadas amplamente como tratamento de primeira escolha para a redução dos níveis de colesterol. Entretanto, cerca de 20% dos pacientes sofrem com efeitos colaterais ou são intolerantes às estatinas, além da dificuldade associada ao tratamento de portadores da doença genética hipercolesterolemia familiar. Neste contexto, a aprovação de biofármacos da classe de anticorpos monoclonais (mAbs) inibidores da enzima PCSK9 surge como uma alternativa de tratamento eficiente. A PCSK9 é responsável pela degradação lisossomal dos receptores de LDL, diminuindo significativamente a sua concentração na superfície das células hepáticas e comprometendo a remoção eficiente de LDL circulante. Os mAbs anti-PCSK9 permitem, portanto, que mais receptores de LDL estejam disponíveis, possibilitando uma redução dos níveis de colesterol. Desta forma, o objetivo geral deste trabalho consiste em desenvolver uma plataforma para a expressão de um mAb inibidor de PCSK9 biossimiliar ao produto de referência Repatha® (evolocumabe, Amgen), incluindo desde a geração de uma população estável de células CHO até a caracterização e formulação do biofármaco produzido. Para isso, as seguintes etapas foram realizadas: (1) construção de vetores de expressão tricistrônicos mediados por elementos IRES contendo os genes do mAb anti-PCSK9 (cadeias leve e pesada com seus respectivos peptídeos sinal - sp) e diferentes marcadores de seleção (Neo e Hygro); (2) transfecção e seleção de células da linhagem CHO-K1 com os vetores construídos; (3) caracterização comparativa do crescimento, metabolismo e produtividade das linhagens estáveis geradas; (5) produção de mAb através de cultivo da linhagem mais promissora em batelada em frascos agitados; (6) purificação do mAb através de cromatografia de afinidade à proteína A; (7) caracterização estrutural, físico-química e biológica do mAb produzido e (8) estudos de estabilidade em diferentes formulações líquidas. Inicialmente, a linhagem estável mais promissora dentre as obtidas foi selecionada, tendo sido a transfectada com um plasmídeo de expressão contendo a seguinte construção gênica: promotor CMV-(spL1)cadeia leve-IRES-(spH7)cadeia pesada-IRES-Neo. Em seguida, o mAb oriundo de sobrenadante de diversos cultivos em batelada desta população foi purificado. O mAb foi então extensivamente caracterizado e mostrou elevada pureza com concentrações mínimas de agregados e fragmentos; perfil de N-glicosilação e de cargas compatível com imunoglobulinas G humanas; estruturas primária, secundária e terciária, conformação global, solubilidade relativa e propensão à agregação similares ao produto de referência e alta afinidade de reconhecimento pela proteína-alvo (PCSK9). Estudos comparativos de estabilidade em diferentes condições de pH e temperatura, além de diversas formulações, também mostraram uma elevada similaridade entre o biossimilar produzido e o produto de referência. A inclusão de açúcares (sacarose), aminoácidos (glicina, prolina) e surfactantes (polisorbato 80) na formulação do mAb mostrou-se benéfica para o aumento de sua integridade conformacional e coloidal. Os resultados obtidos confirmam a eficiência da plataforma proposta, apontando gargalos no processo que podem ser investigados e superados para aplicação do processo em maior escala futuramente.

**Palavras-chave:**

Anticorpo monoclonal anti-PCSK9;Plasmídeos tricistrônicos mediados por elementos IRES;Células CHO;Atributos críticos de qualidade;Formulação de proteínas;Desenvolvimento de biossimilar

**Abstract:**

High levels of low-density lipoprotein (LDL) in the blood are associate to about a 50% increase in the risk of developing cardiovascular disease, which is the leading cause of death worldwide. Since the 1980s, statins have been widely used as the first-choice treatment for lowering cholesterol levels. However, about 20% of patients present adverse effects or do not tolerate statins, in addition the treatment of patients with familial hypercholesterolaemia is challenging. In this context, the approval of PCSK9 inhibitor monoclonal antibodies (mAbs) arises as an efficient alternative treatment. PCSK9 is responsible for lysosomal degradation of LDL receptors, significantly decreasing its concentration on the surface of liver cells and compromising the efficient removal of circulating LDL. Anti-PCSK9 mAbs therefore allow more LDL receptors to be available lowering cholesterol levels. Thus, the main goal of this work is to develop a platform for the expression of an anti-PCSK9 biosimilar mAb to the reference product Repatha® (evolocumab, Amgen), including steps from the generation of a stable CHO cell pool to characterization and formulation of the biopharmaceutical produced. The following steps were performed: (1) construction of IRES-mediated tricistronic expression vectors containing the anti-PCSK9 mAb genes (light and heavy chains with their respective signal peptides - sp) and different selection markers (Neo and Hygro); (2) transfection and selection of CHO-K1 cell lines with the constructed vectors; (3) comparative characterization of growth, metabolism and productivity of the generated stable lines; (5) mAb production through cultivation of the most promising cell line by batch cultures in shake flasks; (6) mAb purification by protein A affinity chromatography; (7) structural, physicochemical and biological characterization of the produced mAb and (8) stability studies in different liquid formulations. Initially, the most promising stable line among those obtained was selected, having been transfected with an expression plasmid presenting the following gene construct: CMV promoter-(spL1)light chain-IRES-(spH7)heavy chain-IRES-Neo. Then, the mAb supernatant from several batches of this cell line was purified. The mAb was then extensively characterized and showed high purity with minimal aggregate and fragment concentrations; N-glycosylation and charge profile compatible with human immunoglobulins G; primary, secondary and tertiary structures, global conformation, relative solubility and aggregation propensity similar to the reference product and high binding affinity for the target protein (PCSK9). Comparative stability studies under different pH and temperature conditions, as well as several formulations also showed a high similarity between the produced biosimilar and the reference product. The inclusion of sugars (sucrose), amino acids (glycine, proline) and surfactants (polysorbate 80) in the mAb formulation was beneficial for increasing conformational and colloidal integrity. The results confirm the efficiency of the proposed platform, highlighting process bottlenecks that can potentially be investigated and overcome to apply the process in large scales in the future.

**Keywords:**

Anti-PCSK9 monoclonal antibody;Tricistronic plasmids mediated by IRES elements;CHO cells;Critical quality attributes;Formulation of proteins;Biosimilar development