

FIGUEIREDO, Lílian Louise Souza. **Análise estrutural do mRNA de cinco variantes de GCCase recombinante *in silico* e sua relação com a análise funcional *in vitro*: Seleção da variante mais promissora para o tratamento da Doença de Gaucher.** 2023. Dissertação (Mestrado em Genética) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto - SP, 2023.

A Doença de Gaucher (DG) é caracterizada pela deficiência da enzima lisossomal glicocerebrosidase (GCCase). A terapia de reposição enzimática é considerada o padrão ouro no tratamento da DG. No Brasil, três enzimas recombinantes fazem parte do protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para DG. Entretanto, essas enzimas são importadas e o país carece de autonomia no desenvolvimento de GCCase. Por meio de evolução dirigida *in silico*, em estudos anteriores do nosso laboratório, foram desenvolvidas cinco variantes do gene *GBA1* com códons otimizados e mutações *missenses* sítio-específicas que codificam cinco variantes de GCCase humana recombinante: GBA-opt, GBA-7, GBA-8, GBA-9 e GBA-12. Como continuidade desses estudos, este projeto teve como objetivo caracterizar e selecionar dentre as cinco variantes, aquela mais promissora para ser utilizada no tratamento da DG. Por abordagem *in silico* foi realizada a predição das estruturas secundárias e terciárias do mRNA das cinco variantes. Em sequência, por ensaios *in vitro*, foram geradas 150 linhagens celulares humanas transgênicas com produção transiente de GCCase humana recombinante: 60 para análise da expressão relativa do mRNA de GCCase por RT-qPCR; 40 para avaliação da eficiência de transfecção por microscopia de fluorescência e citometria de fluxo após co-transfecção de construções plasmidiais contendo cDNA que codifica as variantes de GCCase e cDNA que codifica a proteína verde fluorescente (GFP); e 50 para mensuração da atividade enzimática de GCCase biologicamente ativa por meio de ensaio fluorimétrico. Dos resultados obtidos destacam-se seis: (1) a otimização de códons promoveu um aumento da estabilidade termodinâmica da estrutura secundária do mRNA de GCCase humana com energia mínima livre 7,200 kcal/mol mais negativa na molécula otimizada (GBA-opt) (-832,470 \pm 4,970 kcal/mol) em comparação a GCCase humana selvagem (-825,430 \pm 2,570 kcal/mol); (2) a estrutura secundária do mRNA da variante GBA-7 é a mais estável entre as variantes, com energia mínima livre de -844,000 \pm 4,860 kcal/mol; (3) o promotor hEF1a é mais eficiente na expressão do mRNA das variantes GBA-opt, GBA-7, GBA-9 e GBA-12 em comparação ao promotor CMV; (4) os níveis de expressão dos mRNAs das variantes GBA-7 e GBA-9 relativo ao gene referência RNAr 18S foram 16×10^6 ($\pm 2,9 \times 10^6$) e 11×10^6 ($\pm 0,9 \times 10^6$) Unidades relativas de expressão (URE) quando comparado com o mRNA GBA-opt 3×10^6 ($\pm 0,5 \times 10^6$) URE; (5) por meio do ensaio de co-transfecção plasmidial observou-se que a eficácia da transfecção foi similar entre as linhagens celulares humanas transgênicas geradas; (6) no que se refere a atividade específica de GCCase, as linhagens celulares humanas transgênicas 293-FT_hEF1a-GBA-7⁺ e 293-FT_hEF1a-GBA-opt⁺ apresentaram níveis de 496,000 \pm 69,800 e 429,050 \pm 63,800 nmol de substrato hidrolisado/mg proteína/h enquanto as células não transfectadas apresentaram níveis da ordem de 128,700 \pm 8,400 nmol/mg/h. Concluímos que otimização de códons e mutações *missenses* sítio-específicas, determinadas por estudos de evolução dirigida *in silico*, favorecem a expressão do mRNA de enzimas GCCase humana recombinantes *in vitro*. Demonstramos que GBA-7 é uma variante promissora para futuros estudos que visam aumentar a produção de GCCase recombinante para obter uma terapia de reposição enzimática para DG de desenvolvimento nacional.

Palavras-chave: Doença de Gaucher; variantes de GCase recombinante humana; Predição de estruturas secundárias e terciárias de mRNAs; Terapia de Reposição Enzimática; Linhagem celular humana 293-FT.