

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – CAMPUS DO LITORAL PAULISTA SÃO VICENTE

Triagem de Moléculas Inibitórias da Peroxirredoxina II humana, visando o tratamento da Leucemia Linfoide Aguda (LLA).

Nicholas Tadeu Vannuchi da Costa Almeida

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação do Instituto de Biociências
do Campus do Litoral Paulista São Vicente,
Universidade Estadual Paulista – UNESP
para obtenção do título de Mestre em
Biodiversidade Aquática – Área de
Bioquímica, Biologia Molecular e Moléculas
Biologicamente Ativas

São Vicente

2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – CAMPUS DO LITORAL PAULISTA SÃO VICENTE

Título: Triagem de Moléculas Inibitórias da Peroxirredoxina II humana, visando o tratamento da Leucemia Linfoide Aguda (LLA).

Vinculado ao Projeto Temático: Produção de L-Asparaginase extracelular: da bioprospecção à engenharia de biofármacos antileucêmicos (Proc nº 2013/08617-7)

Mestrando: Nicholas Tadeu Vannuchi da Costa Almeida

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antônio de Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. Wagner Vilegas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Biotecnologia do Campus do Litoral Paulista São Vicente, Universidade Estadual Paulista – UNESP para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade Aquática – Área de Bioquímica, Biologia Molecular e Moléculas Biologicamente Ativas

São Vicente

2017

574.88 Almeida, Nicholas Tadeu Vannuchi da Costa
Al64 Triagem de moléculas inibitórias da Peroxirredoxinall
humana, visando o tratamento da Leucemia Linfoide Aguda
(LLA). / Nicholas Tadeu Vannuchi da Costa Almeida - São
Vicente, 2016.
43 p. :, 16 figs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Campus do Litoral Paulista - Instituto de Biociências.
Orientador: Marcos Antonio de Oliveira
Co-orientador: Wagner Vilegas

1. Biologia molecular. 2. Biofarmacologia. 3. Leucemia Linfoide
Aguda. 4. Peroxirredoxina II. 5. Inibidores de enzimas.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da UNESP

Campus do Litoral Paulista

Banca Examinadora

Prof^a Dra. Gisele Monteiro de Souza

Prof^a Dra. Cristiane Angélica Ottoni

Prof. Dr. Marcos Antônio de Oliveira

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha mãe, guerreira, que sempre me apoiou e acreditou no meu potencial, sem ela nenhum trabalho teria existido. Ao meu pai por investir na minha formação, saudades eternas.

Agradecimentos

Muitas pessoas para agradecer. Primeiramente ao meu orientador, por acreditar em mim e participar desta parte tão importante da minha formação me ajudando com muita dedicação. Em seguida todos meus amigos do laboratório, que me ajudaram em todas diferentes partes do processo, ora cedendo um poço no gel, ora discutindo resultados. O trabalho em equipe é o que torna muitos projetos possíveis e não foi diferente com este. Em especial Melina e Breyer que me ajudaram tanto a aprofundar os conhecimentos com as Prx e Carlão que contribuiu na minha qualificação.

Aos meus sinceros amigos: Eva Maia, que mesmo distante sempre está disposta a me ajudar e escutar; Rodrigo Barros que é um verdadeiro irmão para sempre; Júlia Pizarro por ser a pessoa maravilhosa e preocupada comigo que é; Leonardo Mendes por tantas horas discutindo rotina do laboratório, papers, jogos e aplicativos que fizeram meus momentos de lazer.

Agradeço ao Estado de São Paulo e a Sociedade Paulista, que investiram na minha formação e na minha ideia. Agradeço a FAPESP pelo financiamento direto do projeto (processo 2015/04349-3) essencial para qualquer pesquisador e a contribuição inestimável do CNPQ na minha formação e no laboratório onde trabalho.

Agradeço a toda equipe da UNESP, meus antigos professores que me inspiraram, em especial Wagner Vilegas e equipe do seu laboratório, que também me coorientou neste projeto e Marcos Toyama que cedeu parte do seu tempo e do seu laboratório para conclusão deste trabalho.

Aos pesquisadores do meu antigo laboratório, o “Lado Rosa” que sempre cederam seu tempo para contribuir em diversas questões químicas do meu trabalho.

Agradecimento especial a equipe acadêmica da UNESP que me ajudou incontáveis vezes com todos documentos necessários: Denise, Fabiana, Hana, Edemilson e Gabriel. A sempre solícita Maria da Conceição bibliotecária e a grande ajuda no laboratório pela técnica Luciana.

“A vida sem ciência é uma espécie de morte”

Sócrates

Sumário

1. Introdução.....	1
1.1. Leucemia Linfoblástica Aguda.	1
1.2. L-Asparaginase no tratamento da LLA.	2
1.3 Aspectos da LLA e utilização da L-asparaginase no Brasil	3
1.4 Drogas de baixa massa molar para o tratamento de cânceres.....	4
1.5 Peroxirredoxinas: características, envolvimento no crescimento celular, apoptose e alvos para quimioterápico em cânceres.....	6
1.6 Envolvimento das Prx em eventos de morte celular e câncer.	8
1.7 Inibidores de Prx e moléculas oriundas da biota costeira brasileira como potenciais inibidores de Prx.....	10
2. Objetivos.....	13
3. Justificativa	Erro! Indicador não definido.
4. Material e métodos.....	13
4.1. Expressão e purificação de proteínas recombinantes	13
4.2. Quantificação de proteínas	13
4.3. Moléculas utilizadas	13
4.4. Determinação da atividade antioxidante	13
4.5 Espectroscopia de dicroísmo circular.....	13
4.6 Cromatografia de exclusão molecular (SEC)	13
4.7 Análises de formação de dissulfeto em SDS-PAGE	14
4.8 Ensaio de citotoxicidade	14
5. Resultados e Discussão.....	15
5.1 Expressão e purificação da enzima PrxII humana	15
5.2 Padronização da avaliação da atividade peroxidásica por meio do ensaio FOX.....	16
5.3 Avaliação de alterações na estrutura secundária em razão da interação com moléculas inibitórias.....	18
5.4 Análise de estrutura quaternária por cromatografia de exclusão molecular (SEC).....	23
5.5 Avaliação da formação de dissulfetos intermoleculares.....	25
5.6 Avaliação de Citotoxicidade	27
6. Conclusões.....	36
7. Bibliografia.....	38

Resumo: O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima que em 2016 sejam registrados cerca de 12.600 novos casos pediátricos de câncer, sendo que ~25% devem ser representados pela leucemia linfóide aguda (LLA). Todos os quimioterápicos utilizados no tratamento da LLA levam a diversos efeitos colaterais como: mutagenicidade, teratogenicidade, efeitos citotóxicos e alergias, sendo premente a necessidade da descoberta de novas drogas com efeitos indesejados reduzidos ou ausentes. Já foi demonstrado que em células tumorais a expressão de peroxidases é aumentada de modo a manter níveis adequados para o crescimento e evitar a apoptose. Em mamíferos, a peroxidase denominada de peroxirredoxina II (PrxII) aparenta ter papel fundamental na progressão e manutenção das células tumorais e estudos recentes indicam que esta enzima possui altos níveis de expressão em células neoplásicas ao passo que sua inibição é capaz de tornar células neoplásicas mais suscetíveis ao tratamento com radioterapia ou mesmo induzir a diferenciação celular das células tumorais. Foi descoberto que o diterpenóide natural, adenantina (Adn), é capaz de inibir de forma bastante eficaz o crescimento celular *in vitro* e *in vivo* de células de LLA atuando sobre PrxII. Entretanto, não se tem informações de seus efeitos na leucemia linfóide aguda. O projeto tem como objetivos avaliar efeitos inibitórios em PrxII humana de moléculas isoladas em projetos anteriores, incluindo aquelas similares a Adn, oriundas da biota brasileira e também moléculas disponíveis comercialmente e também de avaliar os efeitos da ligação de moléculas sobre a estrutura de PrxII. Inicialmente foi avaliado o potencial inibitório de 33 moléculas selecionadas. Neste contexto, foram identificadas três moléculas com potencial inibitório significativo: 2,4 metoxichalcona (MCN), colina ácido fosfórico (CPA) e o ácido acetilsalicílico (ASA). Neste estudo foram detectadas maiores diferenças estruturais do complexo enzima-inibidor na seguinte ordem CPA > MCN > Adn > ASA. Cabe ressaltar que para CPA as diferenças foram bastante relevantes, sendo detectadas grandes divergências na quantidade de α hélices (15.9%) e fitas β (31.5 %) quando comparado com a enzima selvagem (25.2 e 27 %, respectivamente). A avaliação da estrutura quaternária revela que a proteínas tratadas com CPA apresentou duas forma oligoméricas de baixo peso molecular ao passo que a enzima sem CPA se mostrou decamérica. Ensaio em SDS-PAGE demonstraram forte interferência na formação de dissulfetos entre os monômeros da proteína quando exposta a CPA e MCN. Ensaio de citotoxicidade no entanto não demonstraram atividade citotóxica nas condições do ensaio.

1. Introdução.

1.1. Leucemia Linfoblástica Aguda.

Células neoplásicas diferem-se das células normais do organismo por apresentarem mutações em seu genoma, que resultam em alterações em diversas funções celulares (Ertel et al., 2006). Fatores distintos podem levar à translocação e mutações cromossomais, como alterações no microambiente celular devido a fatores externos, obesidade, aumento no nível de expressão de fatores de crescimento e mutação ao acaso, gerando células tumorais (Ertel et al., 2006; INCA, 2016). Nas leucemias, as células neoplásicas são as sanguíneas, com intensa multiplicação de células das linhagens linfóide e mieloide na medula óssea. A leucemia linfoblástica/linfóide aguda (LLA) tem como principal característica o acúmulo de células jovens (linfoblásticas) anormais na medula, que substituem as células sanguíneas normais (Larson, 2014). A LLA é uma doença heterogênea por requisitar múltiplas e específicas drogas para um tratamento eficiente, apresentando ainda diversos efeitos colaterais e malignidades mais agressivas quando manifestada em crianças e adolescentes (Avramis, 2012).

Nos Estados Unidos a LLA é o tumor pediátrico mais comum, alcançando 25% dos tumores antes dos 15 anos e 19% dos tumores antes dos 20 anos (Hunger et al., 2012). A prevalência por sexo (homem: mulher) é 1.3: 1 (Inaba et al., 2013), com cerca de 6.500 casos estimados para 2016 (ACS, 2016) sendo mais comum em crianças de países desenvolvidos, com cerca de 35 casos/milhão de crianças com menos de 15 anos de idade. Apesar de não ser possível sua prevenção, o tratamento precoce e drogas atuais elevam a chance de sobrevivência, após cinco anos de confirmação da doença, para até 80%. Contudo, esse excelente prognóstico só está disponível para 16% das crianças acometidas pela LLA, aquelas que vivem em países desenvolvidos. Devido a gastos com tratamento que podem chegar a 100.000 dólares por paciente, países em desenvolvimento como o Brasil perfazem o total de 96% das mortes mundiais de câncer infantil (Stefan, 2014). Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), são estimados no Brasil mais de 12.600 casos de câncer infanto-juvenil para 2016, sendo a LLA também aqui a neoplasia mais frequente nesta faixa etária, correspondendo de 30 a 35% dos casos, com pico de incidência entre 2 e 5 anos de idade, sendo quatro vezes mais frequente que a leucemia mieloide aguda (LMA). Estudos realizados no Ceará (Lustosa de Sousa et al., 2015) com 76 crianças e adolescentes portadores de LLA apontam que a taxa de mortalidade após tratamento foi até 2% maior que países

desenvolvidos, sendo que a taxa de ausência de complicações pós-tratamento, *ESF* (*event-free-survival*), até 7% maior.

1.2. L-Asparaginase no tratamento da LLA.

O aminoácido L-asparagina (Asn ou N) é conhecido como não essencial, pois muitas células são capazes de sintetizá-lo através da Asn sintase (ASNS), no entanto alguns tecidos (e.g. timo) dependem de fontes extracelulares de Asn para as suas atividades metabólicas, uma vez que este aminoácido é fundamental para a síntese de proteínas e consequentemente de DNA e RNA, sendo absolutamente necessário na fase G1 da divisão celular (Eliem et al., 1970; Gong et al., 1991). Alguns tipos de células tumorais, dentre elas as células leucêmicas, também são dependentes da disponibilidade de Asn extracelular. Desta forma, a administração de L-asparaginases (L-ASPase) bacterianas, uma enzima que depleta Asn convertendo-a em aspartato (Asp) e amônia (NH₃), em pacientes com LLA resulta em uma queda acentuada nos níveis séricos de Asn (Hanahan & Harbor, 1983; Jarrar et al., 2008; Ollenschläger, 1988), sendo que a depleção na corrente sanguínea compromete a síntese de proteínas em células linfoblásticas malignas, comprometendo severamente suas funções celulares, resultando em apoptose (Mehta & Vemuganti, 2014; Story et al., 1993). Desde 1970, a L-ASPase tornou-se um componente essencial na quimioterapia para o tratamento de LLA infantil. Cabe ressaltar que a taxa de sobrevivência em países desenvolvidos com o advento da inclusão da ASNase no protocolos para tratamento da LLA subiu de ~20% para ~90%, o que demonstra a importância da utilização deste biofármaco (Washington, 2016).

Em adultos, embora a L-ASPase esteja incluída na maioria dos protocolos para o tratamento de linfomas, a sua utilização tem sido mais limitada e menos estudada em outras neoplasias, devido a preocupações relacionadas com a toxicidade (Douer, 2008), incluindo severa hipertrigliceridemia quando associada a monometoxipoliétileno glicol (PEG) (Galindo et al., 2016), e também variadas reações alérgicas devido a resistência ao tratamento devido a diferenças genéticas dos pacientes (Lopes et al., 2015, Shrivastava et al., 2016).

Além de sua utilização no tratamento da LLA, as L-ASPases bacterianas também são utilizadas terapeuticamente para outros tipos de câncer do sistema linfático, doença de Hodgkin, Leucemia mieloide aguda (LMA), Leucemia linfocítica crônica (LLC), reticulossarcoma e melanossarcoma (Avramis, 2012; Colby et al., 2008; Kumar et al., 2014; Lopes et al., 2016; Pui 2006). Adicionalmente, estudos recentes têm demonstrado que as L-ASPases possuem potencial terapêutico em cânceres ovarianos, pancreáticos, nasais dentre outros (Dufour, et al., 2012; Greif et al., 2012; Wang et al., 2012; Yong, 2015). De fato, já se

sabe há bastante tempo que o alto peso molecular das ASPases bacterianas (140kDa) limita sua utilização para determinados tipos de câncer (Mccredie, 1953). Estudos indicam que no fluido cerebrospinal a concentração de ASPase é somente de 1% da encontrada na corrente sanguínea e somente traços da enzima são detectados na urina de pacientes em tratamento. Já foi demonstrado que moléculas com peso molecular superior a 90 kDa não são capazes de passar livremente pelos capilares. Neste mesmo sentido, os glomérulos renais não permitem a passagem de moléculas de peso molecular superior a 45kDa, portanto uma ASPase de menor massa molecular seria altamente desejável para o tratamento de outros tipos de cânceres. Acredita-se que moléculas menores seriam menos imunogênicas e conseqüentemente poderiam apresentar menores efeitos colaterais (Mccredie, 1953; Offman et al., 2011).

1.3 Aspectos da LLA e utilização da L-asparaginase no Brasil

O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou que entre 2016 e 2017 haverá cerca de 12.600 novos casos de câncer por ano em pediatria e, destes, aproximadamente 25% serão de LLA. De acordo com esses números, a interrupção do fornecimento de fármacos reduziria, anualmente, as chances de cura de aproximadamente 5 mil crianças e adolescentes que, utilizando integralmente os protocolos atuais, é de 80%. A LLA nas crianças evolui muito rapidamente, de forma que a interrupção ou adiamento de qualquer etapa da terapia implica em prejuízo irremediável no prognóstico que atualmente é de grande eficiência (INCA).

A L-asparaginase autorizada pela ANVISA para o tratamento de neoplasias no Brasil é totalmente importada e em 2013 se instalou uma crise na razão da interrupção da produção pelo fabricante no exterior (Metck Sharp & Dohme). Desta maneira, visando evitar o desabastecimento do medicamento foram feitos esforços no intuito de iniciar a produção no medicamento no Brasil através do Ministério da Saúde por meio de Parceria para o Desenvolvimento Produtivo (PDP) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014) entre a FIOCRUZ e os laboratórios privados NT Pharma e Unitec Biotec para que, a partir de 2015, a L-asparaginase fosse produzida nacionalmente. Entretanto em razão de diversas adversidades técnicas e burocráticas, em 2014 a L-asparaginase foi retirada da lista (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). De fato, atualmente toda a ASNase utilizada no tratamento de neoplasias no Brasil é fornecida pela farmacêutica Bago que a importa dos Estados Unidos da América (<https://www.bago.com.br>).

O quadro descrito acima demonstra a grande fragilidade no setor produtivo de biofármacos, cabe ressaltar que a asparaginase distribuída no Brasil é somente a de *E.coli* (ELSPAR), uma vez que foi a única cuja patente expirou. Sendo assim, a intercambiabilidade

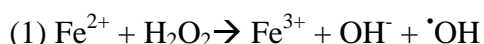
com a enzima de *Erwinia chrysanthemi* ou a forma peguilhada da enzima não é possível pois não possuem certificado da ANVISA, não podendo serem comercializadas no país. Cabe ressaltar que uma vez que estas enzimas estão protegidas por patentes o custo do tratamento é significativamente maior (entre 15-60 ×). Desta maneira, casos reportados na mídia revelam a morte de pacientes em razão da falta de alternativas de medicamento o que aumenta a judicialização para obtenção dos medicamentos no Brasil (G1, 2016)

Pelo exposto acima, apesar da produção do biofármaco ASNase no Brasil ser de grande importância, não é suficiente. De fato, mesmo se a produção da enzima de *E. coli* por meio da parceria com empresas privadas se concretizar ficaria uma grande lacuna por medicamentos que permitam a intercambiabilidade com outras enzimas, a qual no contexto atual são de alto custo e todas importadas.

1.4 Drogas de baixa massa molar para o tratamento de cânceres.

Adicionalmente ao uso de L-asparaginases, os protocolos de tratamento incluem drogas de baixa massa molar como antraciclina, alcalóides e oxazoforinas os quais interferem de diferentes formas na proliferação celular, impedindo a montagem dos microtúbulos (Vincristina), intercalando com o DNA e interferindo na atividade da topoisomerase II (Daunorrubicina), ainda alquilação de bases do DNA impedindo a ação da DNA polimerase (Ciclofosfamida), inibidor da topoisomerase II (Mitoxantrone) e inibindo a ação proteossomal (Bortezomib) (Carta & Ferlin, 2014; Colvin, 1999; Yeo et al., 2016). Entretanto, todas as drogas acima possuem diversos efeitos colaterais como mutagenicidade, teratogenicidade e efeitos citotóxicos em células neuronais, renais e hepáticas, sendo premente a necessidade de novas drogas com reduzidos efeitos indesejados.

Novas abordagens para o tratamento do câncer têm focado no metabolismo peculiar das células neoplásicas (Benhar et al., 2016; Gorrini et al., 2013; Hu et al., 2013; Vander Heiden, 2011). Neste contexto, já é bem conhecido que células tumorais apresentam níveis elevados de espécies reativas de oxigênio (EROs) como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (Gutteridge & Halliwell, 2010). A decomposição destas espécies por enzimas antioxidantes é fundamental para a sobrevivência de células tumorais, uma vez que são capazes de formar o radical hidroxila ($\cdot OH$), uma espécie extremamente tóxica para a célula a partir de reações químicas do $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 com metais de transição através da reação de Fenton (1) ou diretamente através da reação de Harber-Weiss (2) (Gutteridge & Halliwell, 2010).



Já foi demonstrado que enzimas antioxidantes capazes de decompor $\text{O}_2^{\bullet-}$ (superóxido dismutase citosólica e mitocondrial, Sod1 e Sod2, respectivamente) e o H_2O_2 (catalase, Cat; glutationa peroxidase, Gpx; e peroxirredoxinas, Prx) estão superexpressas nos mais distintos tipos de cânceres, incluindo a LLA (Bae et al., 2011; Dickinson & Chang, 2011; Liou & Storz, 2010; Ray et al., 2012). Neste quadro, trabalhos recentes têm chamado a atenção para enzimas de metabolismo de $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 como candidatos para a ação de quimioterápicos visando o tratamento dos mais distintos tipos de câncer (Gorrini et al., 2013; Hu et al., 2013; Vander Heiden, 2011).

Já foi demonstrado que MLN4924, uma molécula de baixa massa molar análoga a adenosina 5' monofosfato, é capaz de inibir a enzima ativadora de Nedd8 (NAE), envolvida na degradação de proteínas via o proteassomo, resultando na supressão da expressão de Sod2, que resulta no aumento de $\text{O}_2^{\bullet-}$, culminando na apoptose de células tumorais de leucemia mieloide aguda (LMA) (Swords et al., 2010). Também foi demonstrado em células tumorais de próstata que miR-17* (um pequena molécula de RNA aberrante) é capaz de inibir a expressão de enzimas antioxidantes como Sod2 e GPx suprimindo o crescimento celular e induzindo a apoptose em células cancerosas (Xu et al., 2010). Novas pesquisas demonstraram que o resveratrol, um polifenol naturalmente encontrado em sementes e cascas de uvas, é capaz de aumentar a expressão de Sod2, levando a um aumento do H_2O_2 na mitocôndria, resultando na apoptose de células tumorais em cultura (Khan et al., 2013).

Se por um lado níveis elevados de H_2O_2 intracelulares induzem a morte celular por meio de apoptose e autofagia, por outro o peróxido de hidrogênio em níveis moderados atua como um mensageiro celular em eventos biológicos relacionados ao câncer como proliferação, diferenciação, e migração celular (Khan et al., 2013; López-Lázaro, 2007). Sendo assim, as peroxidases atuam regulando os níveis celulares de hidroperóxidos de modo que sejam adequados para a proliferação celular, mas insuficientes para promover a apoptose. Dentre as enzimas antioxidantes capazes de decompor o H_2O_2 as Prx merecem destaque em razão de sua alta reatividade, abundância, distribuição celular envolvimento com processos proliferativos, aspectos que serão abordados no próximo tópico.

1.5 Peroxirredoxinas: características, envolvimento no crescimento celular, apoptose e alvos para quimioterápico em cânceres.

As peroxirredoxinas representam a última grande família de enzimas antioxidantes descrita, sendo encontradas em todos os organismos já estudados desde procariotos e archae até eucariotos multicelulares (Perkins et al., 2014). Adicionalmente a sua grande representatividade entre os organismos, em eucariotos estas enzimas estão presentes nos mais distintos ambientes celulares como citosol, mitocôndria, peroxissomos, núcleo, e também associadas a estruturas celulares como membranas e citoesqueleto (Perkins et al., 2014). Outro aspecto de grande importância e sua elevada abundância. Em leveduras, a isoforma citosólica Tsa1 possui 378.000 cópias por célula, muito superior a outras peroxidases como Cat (8.000 cópias/cel) e a Gpx (10.000 cópias/cel) (Ghaemmaghami et al., 2003). Em humanos a isoforma PrxII está entre as 10 enzimas mais abundantes em alguns tipos celulares (Low et al., 2008). Por fim, a atividade catalítica extremamente elevada das Prx sobre hidroperóxidos, na ordem de $10^{7-8} \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, a qual é equivalente a de Gpx e superior a da Cat ($10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) indica também a importância destas enzimas na célula (Tairum et al., 2012; Tairum et al., 2016).

As Prx, em contraste com outras peroxidases como Cat e Gpx, não possuem grupamentos prostéticos ou resíduos de selenocisteína (Flohe, 2011). Na decomposição de hidroperóxidos estas enzimas fazem uso de um resíduo de cisteína altamente reativo denominado de cisteína peroxidásica (C_P), a qual é mantida na forma de tiolato (C_P-S^-) em razão do microambiente do sítio ativo, numa conformação chamada de *Fully Folded* (FF) (Flohe, 2011; Tairum et al., 2012; Tairum et al., 2016). C_P é capaz de atacar a ligação O-O do hidroperóxidos formando cisteína ácido sulfênico (C_P-SOH), o que resulta em um desenovelamento local (*Locally Unfolded LU*) e formação um dissulfeto intermolecular com um segundo resíduo de cisteína do monômero adjacente denominado de cisteína de resolução (C_R). Para que a enzima seja capaz de decompor outra molécula de peróxido, é necessária a redução do dissulfeto, uma tarefa frequentemente executada por uma proteína de baixa massa molar (11kDa) denominada de tiorredoxina (Rhee & Woo, 2011).

O enxofre de C_P pode se apresentar em variados estados oxidativos, dependendo dos níveis de estresse oxidativo celular. Além da formação de C_P-SOH durante seu ciclo catalítico e posterior redução pela C_R , a formação de C_P-SO_2H (ácido sulfínico) e C_P-SO_3 (ácido sulfônico) em altas concentrações de peróxido são possíveis, ambos abolindo a atividade peroxidásica da proteína pela incapacidade de serem novamente reduzidos por C_R , sendo chamados de estados hiperoxidados de C_P (Jung et al., 2008; Yang et al., 2002). A

hiperoxidação de C_p é um evento raro em organismos procariotos devido a rápida formação do dissulfeto, impedindo novas oxidações de C_p -SOH. As Prx de eucariotos porém contam com a presença de um motivo denominado YF, próximo ao sítio ativo, o qual torna as Prx muito mais sensíveis a hiperoxidação, mesmo com níveis relativamente moderados de peróxido intracelular, por dificultar a formação do dissulfeto (Jönsson *et. al*, 2009). A enzima Sulfiredoxina (Srx) pode reverter C_p -SO₂H (mas não C_p -SO₃) para C_p -S⁻, novamente, restaurando sua atividade catalítica. Um resumo do seu ciclo catalítico é mostrado na figura 1.

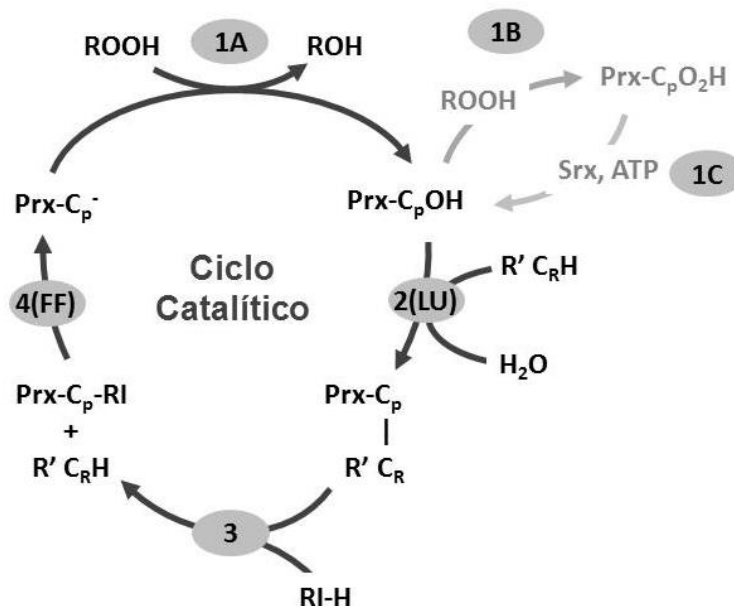


Figura 1 - Resumo da atividade catalítica das Prxs 2-Cys. (1) A enzima se encontra no estado totalmente enovelado, referido como *Fully Folded* (FF) é oxidada pelo peróxido formando C_p -SOH. Em seguida, é possível ser atacada por outro peróxido, formando C_p -SO₂H. (1B). O estado hiperoxidado pode ser revertido pela enzima Srx (1C). Caso o enxofre sofra apenas uma oxidação, C_p -OH se desenovela localmente (2, *Locally Unfolded* LU) formando uma ponte dissulfeto com C_R , liberando peróxido de hidrogênio, podendo então ser reduzida por outro agente redutor intracelular (RI,3; geralmente Tiorredoxina), desprendendo-se da cisteína de resolução, e retornando a forma FF inicial com enxofre ativo (S⁻) (4).

As Prxs podem ser categorizadas em três tipos quando a presença de C_R (figura 2). As Prx 2-Cys típicas, Prx 2-Cys atípicas e as 1-Cys Prx. As Prx 2-Cys típicas sofrem a redução de C_p por uma C_R presente no homodímero adjacente, na porção c-terminal da proteína, constituindo-se de um dissulfeto intermolecular. Já as Prx 2-Cys atípicas realizam a redução de C_p com a C_R de seu próprio monômero, constituindo-se portanto de um dissulfeto intramolecular. As Prx 1-Cys não possuem C_R , sofrendo redução de C_p por outros agentes redutores do ambiente celular (Chae *et al.*, 1994; Perkins *et al.*, 2014)

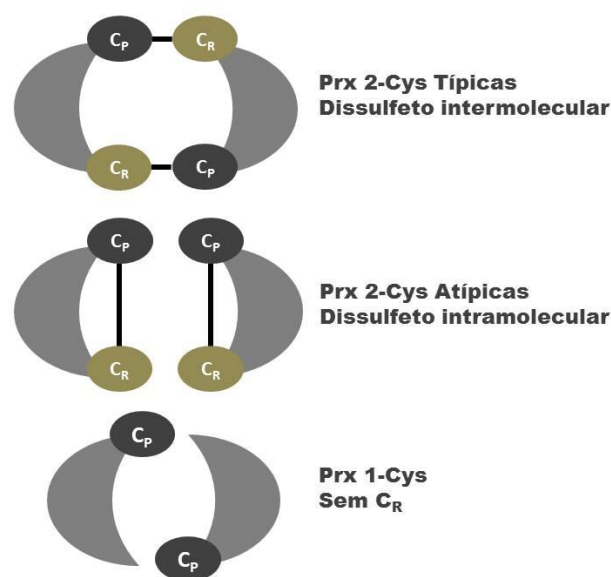


Figura 2 - Classificação geral das Prx. Esquema ilustrativo mostrando a formação (ou não) do dissulfeto decorrente da oxidação de C_P , nas três categorias de Prx descritas em mamíferos.

1.6 Envolvimento das Prx em eventos de morte celular e câncer.

Mamíferos possuem seis isoformas Prx (Prx I-VI) e já foi demonstrado que as PrxI e PrxII, duas formas citosólicas de Prx de mamíferos, são capazes de eliminar o H_2O_2 intracelular gerado como resultado de estimulação de receptores. Neste ponto destacaremos as PrxI e PrxII as quais estão envolvidas em diversas neoplasias. Estas enzimas são homodímeros obrigatórios e após a decomposição do hidróperóxido formam um dissulfeto entre C_P e C_R intermolecular, sendo consideradas 2-Cys típicas. Apesar de serem homodímeros estas enzimas podem formar decâmeros do tipo $\alpha_2(5)$, pela união de 5 dímeros através de ligações de caráter fraco (ligações de hidrogênio e interações apolares) (Tairum et al., 2016). A superexpressão de PrxI e PrxII em células em cultura reduzem drasticamente os níveis intracelulares de H_2O_2 gerados em resposta ao PDGF, EGF (fator de crescimento epidérmico), TSH (tiotropina) e TRAIL (ligantes indutores de apoptose relacionados à TNF) (Hee et al., 2016). A PrxII foi considerada um biomarcador de elevada expressão em câncer mamário (Kurono et al., 2016). Adicionalmente, a expressão destas proteínas também levou ao bloqueio da atividade do ativador de transcrição $NF\kappa B$, o qual é induzido pela adição extracelular de H_2O_2 ou $TNF-\alpha$ (fator de necrose tumoral α) (Kang et al., 2005). Também foi demonstrado que PrxII regula MAP quinases distintas. Sob estimulação de TNF na qual a atividade de PrxII foi bloqueada ou parcialmente abolida (*knockout* e *knockdown*), a atividade de JNK e P 38 MAP quinase foi aumentada (Guyton et al., 1996; Kang et al., 2005). Peroja e

colaboradores (2016) considera o papel protetor das Prx, incluindo a PrxII, na sobrevivência de pacientes com linfoma folicular como essencial, não sendo compensado por nenhum outro mecanismo antioxidante endógeno.

Devido ao envolvimento de PrxI e PrxII em eventos de crescimento celular, vários trabalhos têm demonstrado que essas isoformas apresentam níveis elevados em tipos distintos de cânceres em diferentes órgãos e tecidos como esôfago, do pâncreas, tireoide, pulmão e mama (Kang et al., 2005; Peroja et al., 2016), devido à elevada taxa metabólica causando maior dependência de glicólise anaeróbica (Zhao et al., 2013). A elevada expressão de PrxI/PrxII também confere um fenótipo mais agressivo a células cancerosas, em razão de conferir maior resistência à quimioterapia e à radioterapia (Kang et al., 2005). Estes níveis elevados de expressão das PrxI/II e também Srx nos mais variados tipos de câncer e sua correlação com sobrevivência de pacientes está bem estabelecida, reforçando o papel das Prx nessas patologias, também no seu estado hiperoxidado, fazendo do sistema Prx-Srx também um potencial alvo para tratamentos (Mishra et al., 2016).

A presença de um motivo YF na região c-terminal, anteriormente tida como um fator aparentemente deletério por impedir a degradação de peróxido pela enzima quando eles estão justamente elevados, foi recentemente demonstrada como essencial para recrutamento de chaperonas em levedura, através de ação conjunta com Srx. Em estados de estresse oxidativo celular estas atuam na transição funcional para chaperona, que recrutam proteínas desoveladas/agregadas devido ao estresse oxidativo e também estão relacionadas com a sinalização celular mediada por hidropéroxidos (Netto e Antunes, 2016). A deleção experimental tanto de Prx e Srx tem efeitos negativos na longevidade celular (Hanzén et al., 2016). A nitrosilação da cisteína ativa, formando o grupo SNO, a qual também impede o ciclo catalítico, ocorrendo em altos níveis as espécies reativas de nitrogênio (RNS) relacionadas com patologias. No caso específico da doença de Parkinson as RNS, são responsáveis por reduzir sensivelmente a capacidade de neurônios dopaminérgicos sobreviverem a morte celular mediada por esse tipo de estresse (Sunico et al., 2016).

Um crescente grupo de evidências suporta a noção de que a cascata de sinais celulares promovidos pelas ROS/RNS desempenham um papel importante nos sistemas hematopoiéticos, que potencialmente convergem para o conceito de que a modulação da abundância de ROS/RNS, em particular do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), é crítico na regulação do equilíbrio entre a auto-renovação e diferenciação de células-tronco hematopoiéticas (HSC). De fato, já foi proposto o aumento do nível de H_2O_2 ser um fator

intracelular pivotal para a diferenciação de HSC em células mieloides e linfoides (Tothova et al., 2007). Investigações também indicam que os mecanismos de sinalização dependentes por EROs contribuem para a interrupção do crescimento e/ou indução de diferenciação de linhagens de células leucêmicas induzidas por agentes químicos como de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) (Liu et al., 2013).

1.7 Inibidores de Prx e moléculas oriundas da biota costeira brasileira como potenciais inibidores de Prx

Devido a sua importância em processos biológicos já foram identificadas moléculas capazes de inibir a atividade das diferentes classes de peroxirredoxinas (Brizuela et al., 2014; Liu et al., 2013; Liu et al., 2010).

Recentemente, foi demonstrado que a adenantina (Adn), um diterpenóide natural isolado das folhas de *Isodon adenanthus*, tem a propriedade de inibir a atividade enzimática das 2-Cys Prx humanas I e II, tendo como alvo seus resíduos de cisteína de resolução (C_R) (Liu et al., 2013). Um dos possíveis mecanismos de ação é a reação de Michael entre o grupo tiolato da enzima e as ligações alfa-beta-insaturadas de possíveis inibidores (figura 3A). O modo de ligação proposto da adenantina a C_R esta representado na figura 3B. Sendo assim, as Prx não são capazes de formar um dissulfeto intramolecular e conseqüentemente sua atividade enzimática para redução de peróxidos é abolida.

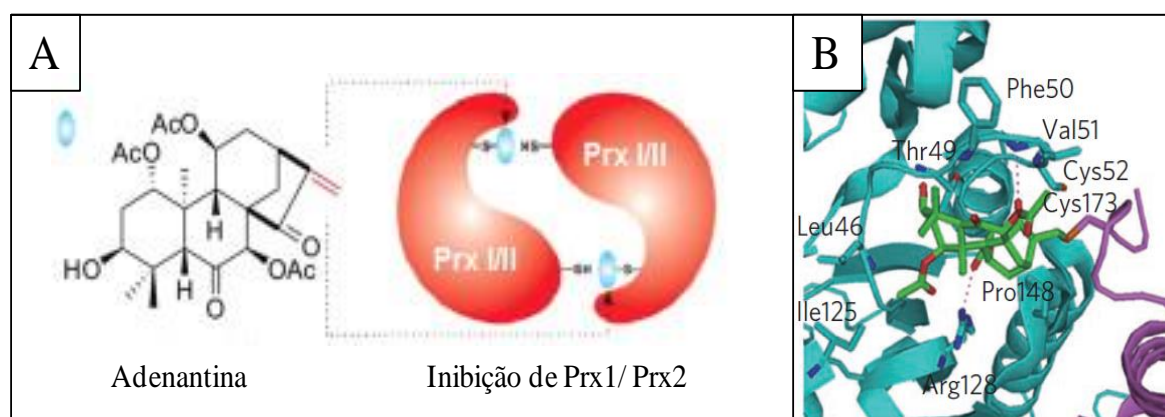


Figura 3 - Estrutura da adenantina e interação com as peroxirredoxinas. A) Estrutura química adenantina, esta contém duplas ligações que servem como aceptores de Michael (vermelho), as quais podem reagir com proteínas semelhantes a tiorredoxina, em mecanismos que envolvem o bloqueamento de cisteínas. B) Modelo de ligação da adenantina e PrxI. Pontos vermelhos representam pontes de hidrogênio entre adenantina e PrxI (Retirado Liu et al., 2012 e Liu et al. 2013).

Foi demonstrado que sua utilização *in vitro* em células tumorais de leucemia mieloide aguda é capaz de induzir a diferenciação de células neoplásicas em células mieloides pela via de H_2O_2 -ERK1/2-C/EBPb, ou mesmo promover a apoptose das células tumorais (Liu et al., 2012). Estudos *in vitro* revelaram que a utilização adenantina é capaz de promover apoptose de hepatocarcinomas, e sua administração *in vivo* em ratos contendo xenoenxertos de

hepatocarcinomas humanos resultou na regressão de tumores hepáticos com poucos efeitos colaterais (Hou et al., 2014). Os autores também demonstraram que o *knockout* de PrxI e PrxII em células de hepatocarcinomas diminui a citotoxicidade da Adn enquanto que a expressão ectópica de PrxI/PrxII é capaz de resgatar a toxicidade da Adn (Hou et al., 2014). Neste contexto, é importante salientar que a inibição de PrxI e PrxII pela Adn não está relacionada somente a decomposição de hidroperóxidos, mas talvez também esteja relacionada a transdução de sinal com participação de Prx, uma vez que a citotoxicidade é dependente destas enzimas.

Posteriormente, utilizando uma molécula similar a adenantina denominada de SK053, a qual previamente havia sido identificada com um inibidor de Tiorredoxina-1(Trx1), demonstrou que esta molécula também é capaz de inibir a atividade peroxidásica utilizando um grupo cetona α,β -insaturado o qual serve como acceptor de Michael (Hou et al., 2014). Apesar dos autores clamarem que a adenantina bloqueia especificamente a C_R das PrxI/PrxII, Soethoudt e colaboradores (2014) relataram que a adenantina é capaz de ligar em ambas as cisteínas das Prx (C_P e C_R) além de se ligar ao peptídeo antioxidante GSH e as enzimas Trx e Tiorredoxina redutase (Trr). Neste contexto, mais estudos são necessários para se chegar a alguma conclusão pertinente.

Mais recentemente (Trzeciecka et al., 2015), foi demonstrado a eficácia da SK053 no controle do crescimento em células tumorais do linfoma de Burkitt. Regulando a expressão de PrxI e PrxII atenuou-se o crescimento dessas linhagens celulares. Além disso, o mesmo estudo comprovou a eficácia de um inibidor específico para PrxI capaz desencadear o processo de apoptose por acúmulo de ROS intracelular. Também foi demonstrado que a conjugação da Adn com 1,25-dihidroxitamina D3 (VD3), é capaz de aumentar significativamente o efeito inibitório da molécula conjugada, entretanto os mecanismos de ação não são bem compreendidos (Wei et al., 2016), sendo que o caráter hidrofóbico do bolsão do sitio ativo das Prx pode estar associado com esta característica (Tairum et al., 2012; Tairum et al., 2016; Wei et al., 2016). Outra molécula sintética derivada de produto natural, denominada pelos autores de H7, foi recentemente usada com sucesso na inibição da atividade de PrxI, reduzindo a viabilidade celular de células leucêmicas, em um estudo comparativo a ação da adenantina (Wei et al., 2016)

Os resultados discutidos acima exemplificam a utilização de produtos naturais como inibidores de diversas classes de enzimas, o qual vem crescendo a cada dia. Como exemplos,

podemos citar inibidores da síntese de proteínas bacterianas (Harvey, 2008), na síntese de lipídios (Newman et al., 2000) e outros processos catalíticos (Koehn & Carter, 2005), assim como no tratamento de tumores (Ying et al., 2015). No âmbito dos projetos temáticos FAPESP “Uso sustentável da biodiversidade brasileira: prospecção químico-farmacológica de plantas superiores” (Proc. n° 02/05503-6) e “Fitoterápicos padronizados para o tratamento de doenças crônicas” (Proc. n°09/52237-9) foram isoladas e identificadas centenas de moléculas provenientes de plantas brasileiras. Numa visão panorâmica, as espécies avaliadas possuem perfis baseados em flavonóides, catequinas, taninos, alcalóides, terpenos, saponinas, compostos fenólicos e outros. Muitos dos resultados de atividades biológicas avaliados nesses dois projetos (anti-inflamação, antiúlceras, antioxidante, antiofídica, anticâncer, etc.) puderam ser correlacionados às estruturas químicas de seus constituintes: derivados fenólicos apresentaram significativa atividade antioxidante, anti-hemorrágica, antiúlceras, algumas vezes acompanhado de mutagenicidade; extratos contendo moléculas apolares, como terpenos, apresentaram significativa atividade anti-*Mycobacterium tuberculosis*, anti-inflamatória e antidiarreica. Apesar de diversas destas moléculas estarem disponíveis até o presente momento nenhuma foi utilizada para inibição de PrxII. Deste modo, moléculas selecionadas de forma racional baseada em características estruturais similares a Adn ou pelas características do sitio ativo seriam de grande importância para buscar novas moléculas com propriedades inibitórias sobre PrxII. A molécula fosfoetanolamina foi escolhida devido a sua recente polêmica envolvendo atividade cancerígena, do qual ainda não se tem dados robustos sobre o mecanismo de ação e sua possível eficácia.

2. Objetivos

Os objetivos deste trabalho residiram na utilização de moléculas previamente isoladas em projetos anteriores, assim como sintéticas a partir de produtos naturais e outras, obtidas comercialmente; e avaliação de sua capacidade inibitória *in vitro* sobre a enzima humana PrxII recombinante.

4. Material e métodos

4.1. Expressão e purificação de proteínas recombinantes

A expressão e purificação das proteínas recombinantes de PrxII foram efetuadas como descrito anteriormente por nosso grupo (Tairum et al., 2012).

4.2. Quantificação de proteínas

As proteínas purificadas foram quantificadas através do coeficiente de extinção molar.

4.3. Moléculas utilizadas

Inicialmente foram avaliadas 33 moléculas isoladas em projetos anteriores, e que possuem características físico-químicas similares a adenantina ou escolhidas com bases nas características estruturais da estrutura cristalográfica de PrxII (pdb=1QMV).

4.4. Determinação da atividade antioxidante

Para a determinação de inibição por moléculas bioativas da atividade tiol peroxidásica da PrxII de humanos, foi empregado ensaio FOX para *screening* inicial. Ensaio FOX: Esse ensaio possibilita a determinação direta do consumo de peróxidos por tiol peroxidases. O princípio do método é baseado na oxidação do íon ferroso (Fe^{2+}) a íon férrico (Fe^{3+}) por peróxidos em meio ácido. Na presença do reagente Xilenol orange, há formação do complexo Fe^{3+} /Xilenol-orange que pode ser medido espectrofotometricamente à 560nm, como descrito por Jiang et al. (1992).

4.5 Espectroscopia de dicroísmo circular

Os efeitos sobre a estrutura secundária da ligação de adenantina com PrxII foram realizados em espectropolarímetro de dicroísmo circular Jasco J-720. A enzima (5 μM) foi submetida redução previa com DTT (1mM) em tampão Tris-HCl (12.5mM) por 30 minutos e posteriormente o DTT foi retirado por gel filtração em colunas PD10 (GE Healthcare). Em seguida PrxII incubada com os seguintes compostos (250 μM): Adn; 2,4-metoxichalcona, ácido acetilsalicílico e colamina ácido fosfórico por 1h a 37°C. A leitura do tampão + moléculas testadas foi subtraída dos resultados.

4.6 Cromatografia de exclusão molecular (SEC)

Para avaliação dos efeitos da ligação do controle positivo adenantina sobre a estrutura quaternária de PrxII foi usado como controle interno a proteína reduzida com DTT (20mM DTT) e não desalinizada. Também foi utilizado como controle a proteína previamente tratada com DTT, desalinizada e tratada com H₂O₂ (200µM) para avaliação do estado oxidado. Para avaliação das moléculas-alvo, a PrxII previamente reduzida com DTT foi tratada Adn como controle positivo de interação física entre a molécula e PrxII, MCN, ASA e CPA. As cromatografias foram efetuadas utilizando coluna Phenomenex BioSep-SEC-S3000, tampão Tris-HCl 0.1mM, NaCl 0.1mM fluxo 1 ml.min⁻¹, com tempo total da corrida 20 min. Os padrões de massa molecular utilizados nos experimentos de SEC foram tioglobulina bovina (670 kDa), γ globulina bovina (158 kDa) e ovalbumina de galinha (44 kDa).

4.7 Análises de formação de dissulfeto em SDS-PAGE

A interferência na formação de dímeros pelos compostos foi avaliada em SDS-PAGE em condições não redutoras. A PrxII foi primeiramente reduzida com 20mM DTT em tampão 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) contendo Hepes 150 mM e 1 mM DTPA, por 30 minutos a 37°C. A Prx reduzida foi desalinizada duas vezes, concentrada e incubada (10µM) com os referidos inibidores em diferentes concentrações, também a 37°C. Após o período, adicionou-se 15 µM de H₂O₂ durante 30 min adicionando-se NEM em seguida, visando evitar a formação de bissulfetos inespecíficos no procedimento de SDS-PAGE.

4.8 Ensaios de citotoxicidade

Estes experimentos foram conduzidos em colaboração com a Dra. Patrícia Leo (IPT-SP) e Profa. Dra. Cristiane Ottoni. Foram utilizadas a linhagem celular normal Huvec (células endoteliais de cordão umbilical humano) e as linhagens tumorais U87 (glioblastoma), HepG2 (hepatocarcinoma humano), HeLa (adenocarcinoma de cervix humano). As células Huvec e U87 foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas-FMUSP. As células HepG2 e HeLa pertencentes ao banco de células do IPT foram adquiridas do Hemocentro de Ribeirão Preto-USP.

As células foram cultivadas em meios de cultura DMEM D7777 (SIGMA-Aldrich) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB, Invitrogen) em ausência de antibióticos e incubadas a 37°C, em atmosfera de 5 % de CO₂ (3110, Thermo Forma, EUA). As linhagens foram criopreservadas em solução composta por 50 % SFB e 10 % DMSO (SIGMA-Aldrich) e 40% de DMEM.

Para os experimentos de citotoxicidade foi utilizado o método de captura do vermelho neutro (NRU, *neutral red uptake*) de acordo com o Anexo A (*neutral red uptake – NRU – cytotoxicity test*) do documento DIN EN ISO 10993-5:2009-10/EN ISO 10993-5:2009. O surfactante SDS foi utilizado como controle positivo de citotoxicidade nas concentrações de 426; 213; 106; 53; 26; 13; 6 e 3 µg/mL em todas as linhagens avaliadas e em paralelo aos testes com os ativos Ade, MCN e CPA.

Após 24 horas de crescimento celular em meio DMEM, 10 % de soro, as células foram expostas a diferentes concentrações dos compostos Ade, MCN, CPA diluídos em meio 5 % de SFB e cultivadas por mais 24 horas em incubadora com atmosfera de 5 % de CO₂ (3110, Thermo Forma, EUA). No dia seguinte, as células foram incubadas por 3 horas com o corante vital vermelho neutro (50 µg/mL). Em seguida, o meio foi removido e depois de extração do vermelho neutro intracelular a partir de etanol / ácido acético / água (50 % / 1 % / 49 %) a absorbância foi medida a 540 nm no espectrofotômetro (Titertek Multiskan placa, EUA). As medições de absorbância de células expostas apenas ao meio foram consideradas como 100 % de viabilidade celular. A viabilidade celular após ação dos ativos avaliados foi calculada a partir da absorbância relativa das células do controle não tratadas a 540 nm.

5. Resultados e Discussão

5.1 Expressão e purificação da enzima PrxII humana

Para a realização dos testes de expressão, o plasmídeo pET28a/PrxII foi utilizado para transformar células da linhagem de expressão de *E. coli* BL21 DE3 (Tuner) e foram realizados padronizações dos protocolos de expressão e purificação. A melhor condição de expressão foi obtida a 20°C/16h/250rpm com adição de 0.3 mM de IPTG. A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade a metal (IMAC) e foi obtido um rendimento médio de 20 mg por litro de cultura. Um resultado representativo das condições ideais de expressão é apresentado na Figura 4.

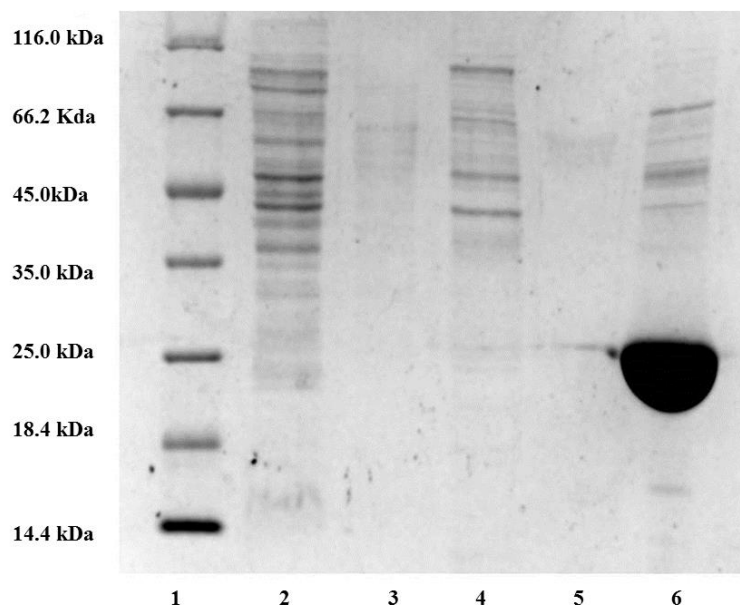


Figura 4 - SDS-PAGE contendo o resultado da purificação da proteína PrxII humana. A Purificação da proteína em foi realizada em concentrações crescentes de imidazol por IMAC. *Lane 2 e lane 3, 5 mM de imidazol; lane 4 e 5, 50 mM de imidazol; Lane 6, 500 mM imidazol após concentração em filtro Amicon Ultra 10kDa (Millipore).* Na *lane 1* foi aplicado marcador de peso molecular *Unstained Protein Molecular WeightMarker* (Thermo).

5.2 Padronização da avaliação da atividade peroxidásica por meio do ensaio FOX

Uma vez obtida PrxII em quantidades suficientes e grau de pureza adequado foram iniciados os ensaios de atividade. O ensaio FOX é utilizado para monitorar concentrações de peróxido decrescentes, na presença de Fe(III) e xilenol orange. O DTT em excesso permite ciclos de redução continuada da enzima, mimetizando seu redutor biológico, eventualmente degradando todo peróxido. Sem o DTT, a enzima não é capaz de degradar o peróxido e observa-se apenas um consumo residual de hidroperóxido. O DTT também é capaz de consumir o peróxido diretamente, porém muito mais lentamente. A figura 5 mostra a atividade da enzima sobre peróxido com o tempo, assim como o consumo de peróxido pelo DTT. Os inibidores foram diluídos em etanol 70% e quando necessário devido ao caráter hidrofóbico da molécula foi acionado dimetilsulfóxido (DMSO) [5%].

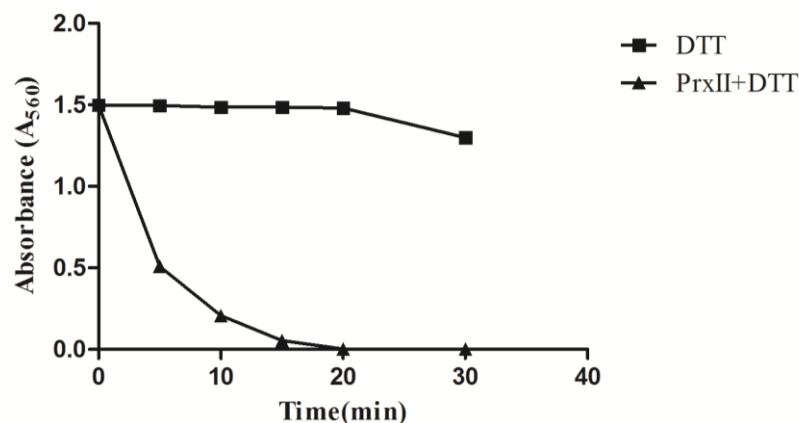


Figura 5 – Atividade da enzima recombinante PrxII sobre o peróxido no teste FOX. PrxII foi primeiramente reduzida com 100mM DTT em tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7.4) contendo NaCl (50 mM) e DTPA (1 mM), por 30 minutos a 37°C. Em seguida o excesso de DTT foi removido por cromatografia de filtração em gel (PD 10m-m - GE Healthcare) e foi realizado o ensaio enzimático em tampão Tris-HCl (50mM; pH 7.4); DTPA (100 µM); PrxII (5 µM), DTT (1mM) e de H₂O₂ (150 µM) e a quantidade de hidróperóxido remanescente foi dosada espectrofotometricamente pelo método de FOX nos tempos indicados ($\lambda = 560\text{nm}$).

Após a padronização da metodologia foram efetuados os ensaios de decomposição de peróxido e foram avaliadas 33 diferentes moléculas selecionadas para estimar-se o potencial inibitório dessas moléculas. Como controles negativos de decomposição de H₂O₂ foram feitas reações sem a adição de PrxII e com a PrxII tratada com foi previamente tratada com N-etilmaleimida (NEM), um alquilante de cisteínas e que portanto, aniquila a atividade peroxidásica de PrxII de forma irreversível (figura 6).

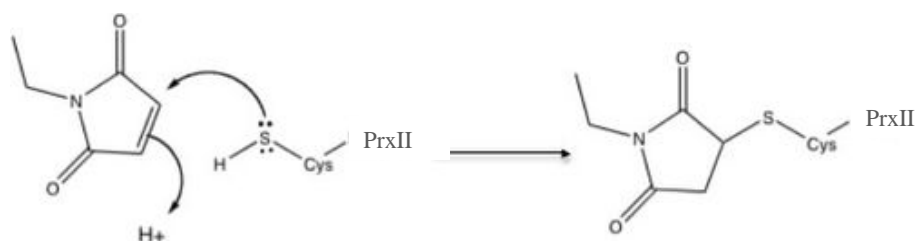


Figura 6 – Representação da reação de NEM com tióis de PrxII. Uma molécula de NEM é capaz de alquilar um tiól proteico via uma reação de adição através de uma dupla ligação para formar um derivado de tioéter.

Uma vez que o NEM é um alquilante altamente potente, também utilizamos como controle interno de inibição a enzima PrxII tratada com o inibidor comercial adenantina (Adn) (Chemfaces). A concentração tanto de Adn quanto das moléculas avaliadas foram fixadas em 100µM. Dentre as moléculas avaliadas 3 se destacaram por uma sensível redução na atividade da enzima: 2,4 metoxichalcona (MCN), ácido acetilsalicílico (ASA) e colamina ácido fosfórico (CPA) (figura 7). Cabe ressaltar que nas condições testadas a Adn foi capaz de inibir ~30% da atividade da enzima o que está de acordo com o descrito por Liu e colegas (2012). As demais moléculas apresentaram atividade inibitória similares a Adn de acordo com a seguinte ordem CPA <MCN < Adn <ASA. Apesar de o ASA apresentar maior potencial

inibitório nas condições do ensaio, é interessante salientar que sua estrutura muito similar ao ácido benzóico, o qual já foi observado no sítio ativo da PrxV em estruturas cristalográficas (Evrard et al., 2004, Hall et al., 2010). Entretanto cabe mencionar que em condições de crescimento de cristal as concentrações destes químicos podem alcançar molaridades extremamente elevadas (0.5M) o que facilita seu assentamento em cavidades proteicas. As demais moléculas na triagem utilizadas bem como suas estruturas químicas são apresentadas na tabela 2, ao final desta seção.

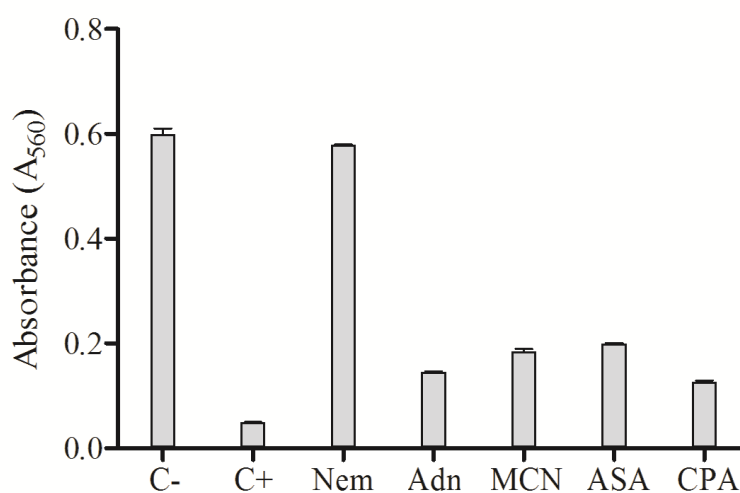


Figura 7 - Resultado de triagens de moléculas com potencial inibitório da atividade peroxidásica da PrxII humana pelo método FOX. Na figura as legendas inferiores significam: C = Controle negativo de consumo do hidroperóxido (sem adição de PrxII); C+ = controle positivo do consumo de peróxido (enzima + DTT), N = controle negativo de consumo de H₂O₂, onde a enzima PrxII foi previamente tratada com NEM e em seguida a enzima foi adicionada a reação contendo H₂O₂ e DTT; MCN = enzima incubada com 2,4-metoxichalcona (MCN + PrxII + DTT+ peróxido de hidrogênio); ASA = enzima incubada com ácido acetilsalicílico (ASA + PrxII + DTT+ peróxido de hidrogênio) e CPA = enzima incubada com colamina ácido fosfórico (CPA + PrxII + DTT+ peróxido de hidrogênio); Adn = controle interno de inibição. Nesta reação foi utilizada a PrxII tratada com adenantina comercial (ASA + PrxII + DTT+ peróxido de hidrogênio). A PrxII foi primeiramente reduzida com 100mM DTT em tampão 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) contendo NaCl 50 mM e 1 mM DTPA, por 30 minutos a 37°C e o excesso de DTT foi removido por cromatografia de filtração em gel utilizando colunas PD10 (GE Healthcare). A Prx reduzida foi incubada com todos os compostos (34) a 37°C. Após o período, foi realizado ensaio com tampão Tris-HCl (50mM, pH 7.4); DTPA (100 µM); de PrxII (5 µM), DTT (1mM) e H₂O₂ (100 µM). A absorbância foi monitorada a 560nm após 1h. A inibição foi determinada por depleção do peróxido. Gráfico mostrando apenas inibidores que apresentaram melhor atividade inibitória.

Uma vez que as moléculas CPA, MCN, Adn e ASA apresentaram efeito inibitório, investigamos possíveis alterações estruturais de PrxII em razão da interação com as moléculas e os resultados são apresentados nos próximos tópicos.

5.3 Avaliação de alterações na estrutura secundária em razão da interação com moléculas inibitórias

A espectroscopia de dicroísmo circular (CD) é um excelente método para avaliação da estrutura secundária de enzimas, baseando-se no princípio da absorção diferenciada da luz polarizada circular dessas estruturas, medidas em elipticidade molar (Greenfield, 2009). Neste

contexto, o CD estima a diferença de absorção, da luz circularmente polarizada à esquerda e à direita em macromoléculas como proteínas. Quando moléculas proteicas interagem com a luz circularmente polarizada provocam uma alteração nessa luz incidente, resultando na atipicidade provocando alterações dos mínimos e máximos de absorção em de acordo com o comprimento de onda utilizado em razão da quantidade de estruturas secundárias presentes na estrutura de uma proteína. Faz-se assim uma varredura em diversos comprimentos de onda (normalmente de 180-260 nm) sendo possível estimar a quantidade de estruturas secundárias de uma proteína (figura 8). Neste contexto se a interação da proteína com uma molécula produz uma alteração estrutural significativa é possível detectar esta alteração através da análise do espectro de CD.

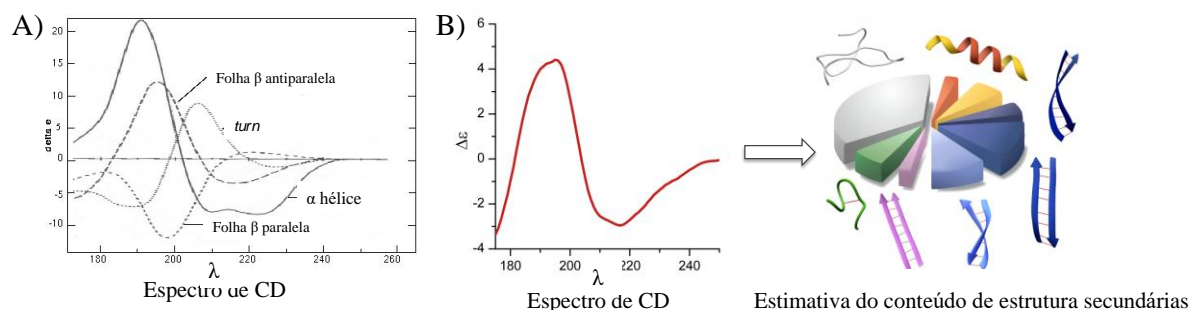


Figura 8 - A técnica de espectroscopia de dicroísmo circular na determinação do conteúdo de estruturas secundárias de proteínas. A) Representação dos máximos de absorção para diferentes tipos de estruturas secundárias proteicas. **B)** Espectro de dicroísmo circular de uma proteína cuja a análise dos dados é capaz de gerar uma estimativa do conteúdo global de elementos secundários presentes na proteína.

Recentemente, esta metodologia foi utilizada para enzima PrxII por Randall e colaboradores (2016) para verificar sua oxidação por peroxinitritos. Nossos estudos avaliaram as potenciais mudanças na estrutura decorrentes da interação com os compostos de inibição significativa no ensaio FOX.

Após o tratamento com as moléculas, as proteínas foram submetidas ao CD. Entretanto, quando na presença de determinados compostos o sinal fica bastante comprometido em razão da absorção do feixe de luz pelas moléculas testadas (isto também inviabilizou a execução de experimentos de atividade de decomposição de hidroperóxidos baseados na oxidação do NADPH ou DTT, devidos as moléculas apresentaram forte absorbância nos comprimentos de onda testados). De fato esta foi uma das maiores dificuldades encontradas no decorrer do trabalho. Este problema foi resolvido por meio do tratamento prévio com as moléculas (100 equivalentes molares 3hs /4°C) e decorrido este período foi efetuado uma cromatografia de gel filtração utilizando a coluna PD 10 (GE Healthcare) para retirada do excesso de supostos inibidores, e a concentração das amostras

proteicas foi ajustada para 50 μ M. Após estes procedimentos as amostras foram acondicionadas a 4°C até a utilização nos procedimentos experimentais.

Como controle dos experimentos de CD foram obtidos espectros de PrxII reduzida e oxidada. Este controle é necessário, pois no ciclo de decomposição de hidroperóxidos de PrxII estas enzimas se alternam entre os dois estados estruturais denominados *fully folded* (FF) e *locally unfolded* (LU). De fato no estado reduzido a C_P encontra-se a cerca de 10 Å da cisteínas de resolução e para a formação do dissulfeto ocorre um remodelamento proteico que promove a aproximação de C_P com C_R e permite a condensação de C_P-SOH com C_R-SH, liberando uma molécula de H₂O e culminando na formação do dissulfeto entre os dois dímeros (Figura 9A e 9B).

Cabe salientar que a oxidação também leva a alterações na estrutura quaternária da enzima. Como mencionado anteriormente a Prx II de humanos no estado reduzido se apresenta como um decâmero do tipo $\alpha_2(5)$ (figura 9C, i), entretanto a oxidação das cisteínas a dissulfeto (Figura 9C, ii e iii) pode promover a dissociação dos decâmeros em dímeros ou oligômeros de massa intermediária (Figura 9C, iv) (Tairum et al., 2012; Tairum et al., 2016).

Como pode ser observado nos gráficos apresentados na figura 10 e tabela 1 é possível detectar claras alterações da estrutura secundária de PrxII, quando reduzida ou oxidada principalmente em relação ao conteúdo de hélices α e folhas β entre o estado reduzido (25.2 e 27-%, respectivamente) e oxidado (27.9 e 20.6-%, respectivamente). É interessante salientar que o estado reduzido apresenta uma leve aumento no conteúdo de hélices α , (~3,0 %) ao passo que ocorre uma diminuição significativa de folhas β (~7,0 %). Para a execução dos experimentos, os tratamentos com as moléculas foram efetuados após redução com DTT e retirada do redutor para a garantia que as cisteínas estivessem aptas a reagir com as moléculas.

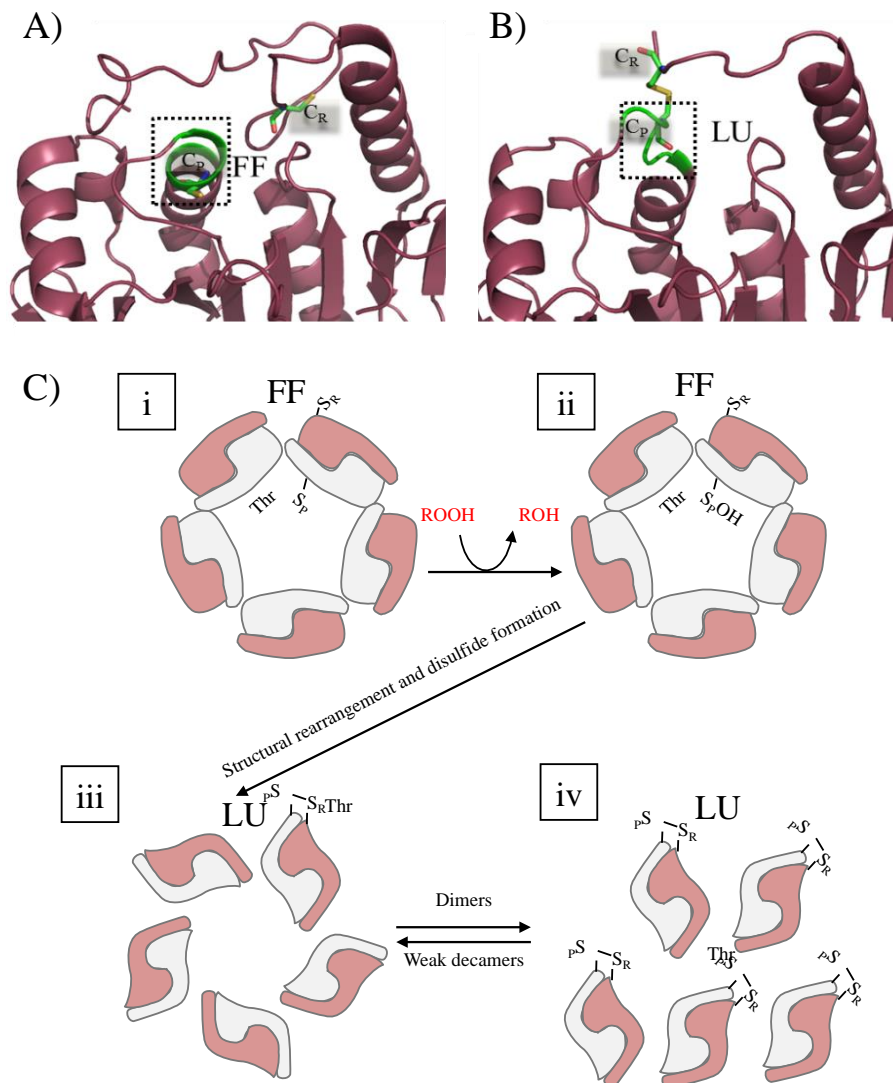


Figura 9 – Alterações estruturais de 2-Cys Prx. **A)** Representação do estado *Fully folded* (FF) de 2-Cys Prx na forma reduzida (código PDB: 4MA9). **B)** Representação do estado *Locally unfolded* (LU) de 2-Cys Prx no estado oxidado (código PDB: 1YEP). Nas figuras A e B a região que sofre um desenovelamento parcial é destacada pelo retângulo pontilhado. A C_P e C_R são representadas no modo *sticks* coloridas por CPK (C: verde; O: vermelho, N: azul e S: laranja). **C)** Alterações da estrutura quaternária de 2-Cys Prx em razão da redução de hidroperóxidos, onde cada monômero do dímero é representado por uma cor distinta (branco e salmão). As 2-Cys Prx, como a Prx II, se encontram como decâmero no estado FF (i). Após a decomposição do hidroperóxido a C_P e oxidada a C_P-SOH (cisteína ácido sulfênico) (ii) o que dispara o desenovelamento da α hélice que contém a cisteína peroxidásica e outras modificações estruturais com consequente formação de um dissulfeto intermolecular (iii). A formação do dissulfeto pode levar a dissociação do decâmero em oligômeros de menor massa molar como dímeros tetrâmeros e outros intermediários (iv). Figura adaptada de Tairum et al., 2012.

Como controle interno dos experimentos foi utilizada a Adn, uma vez que ela é capaz de se ligar nas cisteínas de PrxII inibindo sua atividade (Liu et al., 2013). Na utilização da Adn houve redução no conteúdo de hélices do tipo α (22.65%) e aumento de fitas β (23.68%) (Figura 10A e tabela 1) o que indica que a enzima está em uma conformação similar a observadas para a PrxII oxidada, apesar da proteína ter sido previamente tratada com DTT, o que sugere que a Adn induz alterações da estrutura secundária. Cabe ressaltar que o conteúdo de folhas beta na enzima oxidada e bastante superior ao observado na molécula tratada com Adn (PrxII_{oxi} ~ 27%; PrxII_{Adn} ~ 23%) o que deve indicar uma baixa afinidade. No caso de

2,4'-metoxichalcona (MCN) também houve uma redução no conteúdo de hélices α (23.19%) e aumento de fitas β (23.82%), novamente revelando que a proteína se assemelha a proteína oxidada (Figura 10B e tabela 1). No caso do ASA também foi observado alteração no conteúdo de estruturas secundárias em especial de fitas β (21.62% de hélice e 26.16% de fitas β) (Figura 10C e tabela 1). No caso da colamina ácido fosfórico (CPA) sua incubação com PrxII provocou a alteração mais significativa no conteúdo de estruturas secundárias. O conteúdo de hélices α baixou para 15.90% enquanto o de fitas β aumentou de forma significativa alcançando 31.52% (Figura 10D e tabela 1). Conjuntamente os resultados indicam que o tratamento com as moléculas selecionadas induzem alterações na estrutura secundária de PrxII.

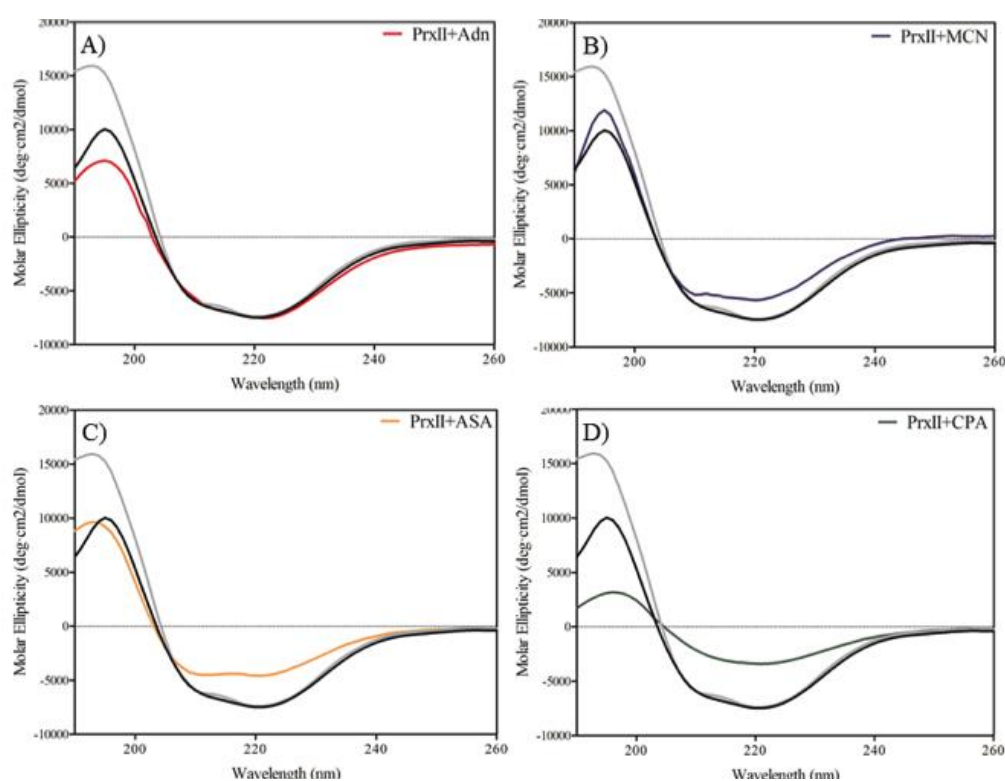


Figura 10 – Resultado de análise de espectroscopia dicroísmo circular (CD) da enzima PrxII com potenciais inibidores. A) adenantina (Adn), B) 2,4-metoxichalcona (MCN), C) ácido acetilsalicílico (ASA) e D) colamina ácido fosfórico (CPA). A enzima (5 μ M) foi submetida redução previa com DTT (1mM) em tampão Tris-HCl (12.5mM) por 30 minutos e posteriormente o DTT foi retirado por gel filtração em colunas PD10 (GE Healthcare). Em seguida PrxII incubada com os seguintes compostos (250 μ M): Adn, 2,4-metoxichalcona, ácido acetilsalicílico e colamina ácido fosfórico por 1h a 37°C. Linha tracejada clara: enzima somente reduzida, linha tracejada escura: enzima reduzida e posteriormente oxidada, ambas com mesmo procedimento sem adição dos potenciais inibidores. A leitura do tampão + moléculas testadas foi subtraída dos resultados. As amostras foram diluídas em álcool (70%) ou DMSO (5%) quando necessário, que foi acrescentado ao controle.

Tabela 1. Estimativa da estrutura de PrxII secundária por CD. Foram utilizados os estados reduzido oxidado e após tratamento com as possíveis moléculas inibitórias .

190-260 nm	Reduzida	Oxidada	Adn	MCN	ASA	CPA
α hélice	28.02%	24.11%	22.65%	23.19%	21.62%	15.90%
β sheet	18.11%	22.64%	23.68%	23.82%	26.16%	31.52%
β turn	15.94%	16.41%	14.82%	16.49%	16.46%	12.64%
Random.coil	37.92%	36.85%	36.19%	36.59%	35.85%	34.86%

O conteúdo de estruturas secundárias foi estimado utilizando o CDNN.

Vale ressaltar aqui que a PrxII e a colamina ácido fosfórico são encontradas naturalmente nas membranas de eritrócitos de mamíferos, e uma eventual interação é factível (Rocha et al., 2009; Sandhoff et al., 2009).

5.4 Análise de estrutura quaternária por cromatografia de exclusão molecular (SEC)

O próximo passo foi a investigação do comportamento oligomérico da proteína em resposta ao tratamento pelas moléculas por cromatografia de exclusão molecular (SEC). Esta técnica permite avaliar proteínas de diferentes massas moleculares, assim como seus estados oligoméricos e agregados proteicos ou mesmo seu grau de compactação de acordo com tempo eluição. Para tanto, a coluna cromatográfica é preenchida com resinas de poros de tamanho diversos que visam a resolução de proteínas de massas distintas. Proteínas maiores e agregados não passam pelos poros e eluem mais rapidamente ao passo que de acordo com a massa de cada proteína ela pode interagir coma coluna entrando nos poros da resina e percorrendo canalículos que atrasam sua eluição (Hong et at., 2012).

Nossos resultados revelam que a estrutura quaternária de Prx II responde de forma significativa a adição das moléculas selecionas. Como mencionado anteriormente Prx II possui estrutura decamérica quando reduzida (~250 kDa) e uma mistura de dímeros (~50 kDa), estruturas de massa intermediária e decâmeros quando oxidada. Após o tratamento com as moléculas as proteínas foram submetidas a cromatografia de exclusão molecular (SEC) entretanto, quando na presença de determinados compostos o sinal de fluorescência fica bastante comprometido em razão fluorescência intrínseca dos compostos (o que inviabilizou a execução de experimentos de atividade baseados na detecção de decomposição de hidroperóxidos em razão das moléculas apresentarem forte absorbância e fluorescência).

Assim como no procedimento anterior as proteínas foram tratadas com DTT, e o excesso foi removido por gel filtração e alíquotas de PrxII foram tratadas com colamina ácido

fosfórico (CPA), 2,4'-methoxychalcona (MCN) e ácido salicílico (ASA). Novamente para termos comparativos realizamos também este procedimento para PrxII tratada com adenantina (Adn). Cabe ressaltar, que até o presente momento nenhum grupo de pesquisa se atentou para a investigação da estrutura quaternária em razão da interação com Adn (Liu et al., 2012 e Liu et al. 2013).

Para a proteína selvagem, no tratamento com Adn foram observados tanto dímeros quanto decâmeros de forma similar a enzima selvagem oxidada, entretanto ambos se mostraram mais compactos o que sugere também interferência na estrutura quaternária (Fig. 11A). No caso de MCN os resultados foram mais divergentes pois a PrxII tratada com a molécula se apresentou unicamente como dímero (Fig. 11B). Como pode ser observado na Figura 11C para o ASA foi observado uma diferença nos oligômeros enquanto PrxII oxidada se apresentou majoritariamente como dímeros e um pequena proporção de decâmeros. Os dados para a enzima tratada com ASA revela que PrxII decaamérica é mais volumosa que migra mais rapidamente situação similar ao dímero. Resultado semelhante foi obtido para CPA, entretanto foram detectadas duas formas de dímero uma mais relaxada e outra mais compacta sugerindo alterações estruturais ainda mais significativas do que as determinadas para MCN (Fig. 11D).

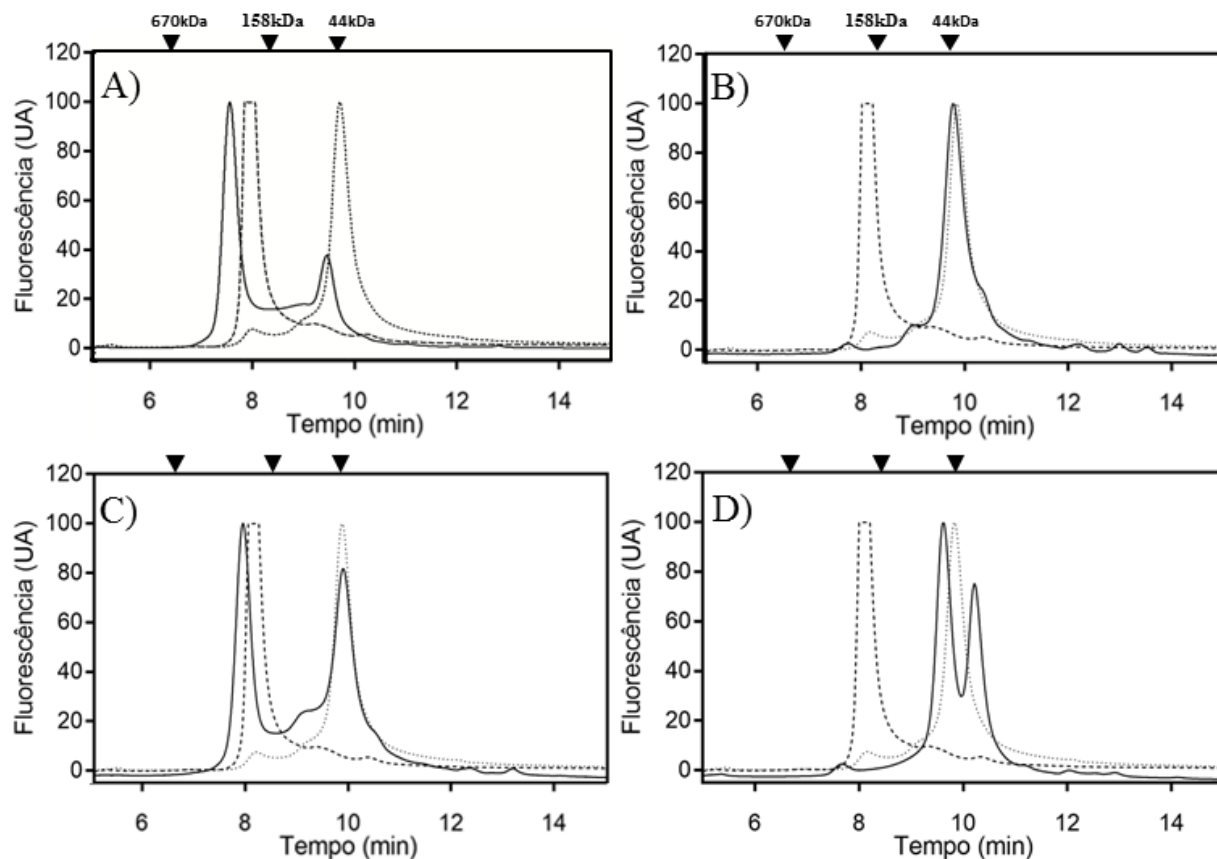


Figura 11– Cromatografia de Exclusão Molecular (SEC) para a avaliação do efeito do tratamento com as moléculas selecionadas sobre a estrutura quaternária de PrxII. Como controle interno do experimento foi utilizada a proteína PrxII reduzida com DTT (20mM DTT) e não desalinizada o que resulta predominantemente em estruturas decâméricas do tipo $\alpha 2(5)$ de ~250kDa (linha pontilhada). Neste caso a proteína possui suas cisteínas reduzidas e o decâmero é estabilizado por ligações fracas entre os dímeros. Também foi utilizado como controle a proteína previamente tratada com DTT, desalinizada e tratada com H_2O_2 (200 μ M), o que resulta predominantemente na proteína oxidada em dissulfeto representada por um dímero $\alpha 2$. Este dímero é unido por ligações covalentes representadas por pontes dissulfetos intermoleculares. Para avaliação das moléculas utilizadas PrxII previamente reduzida com DTT foi tratada Adn como controle positivo de interação física entre a molécula e PrxII (linha contínua, **A**); MCN (linha contínua, **B**) ASA (a linha contínua, **C**) e CPA (linha contínua, **D**). As cromatografias foram efetuadas utilizando coluna Phenomenex BioSep-SEC-S3000, tampão Tris-HCl 0.1mM, NaCl 0.1mM fluxo 1 ml.min⁻¹, com tempo total da corrida 20 min. Os padrões de massa molecular utilizados nos experimentos de SEC foram tioglobulina bovina (670 kDa), γ globulina bovina (158 kDa) e ovalbumina de galinha (44 kDa), e estão indicados por setas na parte superior da figura.

5.5 Avaliação da formação de dissulfetos intermoleculares

Uma vez que durante o ciclo catalítico inibidores de Prx como a adenantina, que são capazes de se ligar a cisteína e impedir a formação dos dissulfetos intermoleculares, inviabilizam a formação de dímeros unidos por ligações covalentes como um dissulfeto. Neste contexto, cabe salientar que no decâmero de PrxII as interações entre os dímeros são do tipo hidrofóbica e eletrostática, e em metodologias e como eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) denaturante (SDS PAGE) e não redutor (sem adição de DTT) as proteínas em seu estado reduzido, sem dissulfeto, são detectadas como monômeros ao passo que aquelas oxidadas em dissulfeto são detectadas como dímeros (Nagy et al., 2011; Tairum et al., 2012; Tairum et al., 2016). Para se obter o padrão da proteína monomérica foi aplicado

no gel a proteína contendo DTT (Figura 12A e 12B, *lanes* 1). Nas *lanes* 2, após remoção do DTT por dessalinização, foi aplicado 15 μM de H_2O_2 , uma quantidade baixa para evitar a hiperoxidação. É possível observar a não oxidação completa da proteína, com bandas monoméricas e díméricas visíveis.

Inicialmente avaliamos se a molécula ASA era capaz de interferir na formação do dissulfeto. Para tanto foi feita uma reação onde foi adicionado ASA em concentrações crescentes (10 μM , 20 μM , 50 μM , 100 μM , 500 μM , 1000 μM ; Figura 12B, *lanes* 3-9) e em seguida adicionado peróxido de hidrogênio (15 μM). Neste contexto, caso a molécula testada se ligue a uma das cisteínas envolvidas na catálise isto impossibilita a formação do dímero contendo um dissulfeto intermolecular que migra como uma banda de $\sim 50\text{kDa}$ e resulta no aparecimento de uma banda monomérica ($\sim 25\text{kDa}$). Como controle interno do experimento foi utilizada o inibidor Adn.

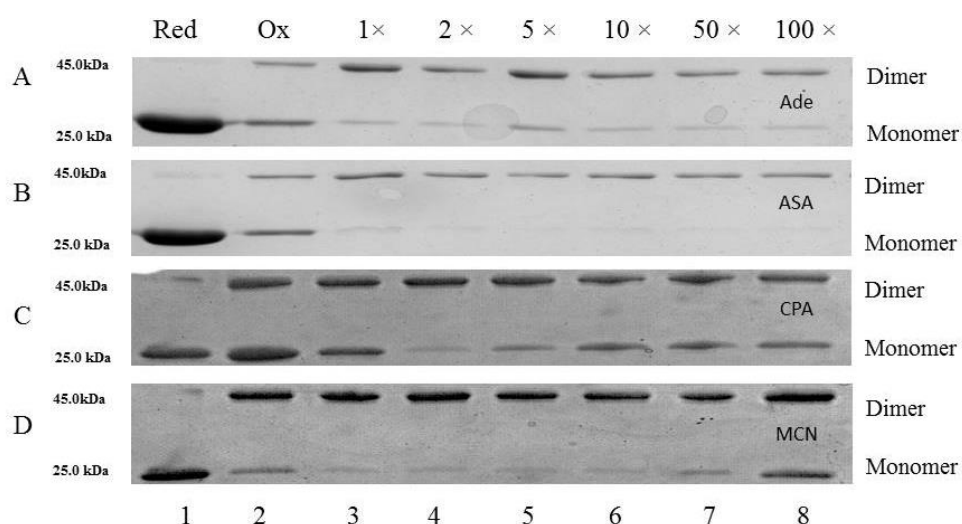


Figura 12 – Gel SDS-PAGE mostrando formação de monômeros com A) adenantina B) Ácido Acetil-Salicílico C) Colamina Ácido-Fosfórico D) 2,4'-methoxychalcona. PrxII foi primeiramente reduzida com 20mM DTT em tampão 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) contendo NaCl 50 mM e 1 mM DTPA, por 30 minutos a 37°C. A Prx reduzida foi dessalinizada duas vezes, concentrada e incubada (10 μM) com os referidos inibidores em diferentes concentrações, também a 37°C. Após o período, adicionou-se 15 μM de H_2O_2 durante 30 min adicionando-se NEM em seguida. Lane 1- Proteína após reduzida (com DTT), 2 –proteína oxidada com 15 μM H_2O_2 , 4-9 – Concentrações de Ade/ASA/CPA/MCN: 10 μM , 20 μM , 50 μM , 100 μM , 500 μM , 1000 μM .

Como pode ser observado na figura 12A (*lanes* 3-9) a adição de Adn inibiu a total formação de dímeros pela oxidação com peróxido de hidrogênio ao passo que na PrxII tratada com ASA a oxidação com H_2O_2 levou ao aparecimento de bandas diméricas mesmo em concentrações elevadas (1000 μM , *lane* 8), indicando que a interação com PrxII não ocorre por meio das cisteínas envolvidas na catálise. Nos procedimentos utilizando CPA como inibidor,

a *lane 2* mostra uma proteína não completamente oxidada (possivelmente devido a baixa concentração de peróxido utilizado, para evitar hiperoxidação). Porém, a *lane 3* uma banda monomérica (reduzida) menor que a *lane 2*. É possível, embora o DTT residual esteja presente em todas as amostras, que uma pequena quantidade de proteína interagiu com o inibidor, formando monômeros inativos, diminuindo a quantidade total de monômeros livres para formarem dímeros, os quais puderam ser oxidados em maior número, com a mesma quantidade de peróxido. Aumentando-se a concentração de CPA nas outras *lanes* observa-se uma quantidade crescente de monômeros formados, em relação direta a crescente concentração de CPA. Após utilizar uma concentração 10 × maior que a de proteína a formação de monômeros alcançou uma aparente saturação, formando bandas semelhantes nas concentrações 50 × e 100 ×. MCN obteve resultados semelhantes a CPA, porém obtendo saturação na formação de monômeros somente na concentração máxima de inibidor usado (1000µM), mostrando-se menos eficiente que CPA para o propósito de formação de monômeros da proteína.

5.6 Avaliação de Citotoxicidade

Os experimentos para avaliação da citotoxicidade dos ativos Adn, MCN e CPA foram realizados pelo Laboratório de Biotecnologia Industrial do Núcleo de Bionanomanufatura do IPT. O composto ASA não foi utilizado devido a ampla literatura disponível sobre assunto (Kutuk & Basaga, 2004; Yu et al., 2002).

A primeira etapa para o entendimento de como um agente irá agir no corpo frequentemente envolve estudos em cultura celulares. Comparado aos estudos em animais, os testes em células são eticamente mais aceitos, de controle e reprodução mais fáceis e ainda, mais econômicos. No entanto, é necessário reconhecer que os ensaios *in vitro* são suscetíveis às mínimas perturbações do sistema. As células são mais sensíveis a mudanças em seu ambiente, tais como flutuações de temperatura, pH, nutrientes e concentração de subprodutos do metabolismo, além da concentração de um agente potencialmente tóxico em teste. Portanto, o controle das condições experimentais é crucial para assegurar que a morte das células corresponda à toxicidade do material teste e não das condições instáveis do cultivo.

O ensaio de citotoxicidade por captação de vermelho neutro (NRU, neutral red uptake) é um ensaio de viabilidade celular baseado na habilidade de células viáveis em incorporar e ligar o vermelho neutro (NR), um corante supravital. O vermelho neutro é um fraco corante catiônico que penetra a membrana celular por difusão não iônica e acumula intracelularmente

nos lisossomos ligando-se eletrostaticamente com a matriz lisossomal aniônica (Repetto et al., 2008). Alterações na membrana lisossomal levam a fragilidade do lisossomo e outras mudanças que gradualmente começam ser irreversíveis. Estas alterações resultam na diminuição da capacidade de captação do vermelho neutro. A concentração do corante vermelho neutro dissolvido das células determinado pela absorvância a 540nm é diretamente proporcional à quantidade de células vivas. Este efeito permite distinguir entre viabilidade e morte celular. Neste teste a viabilidade celular das células exposta à substância teste é comparada à viabilidade celular das células controle pela medida da absorvância do corante vermelho neutro capturado pelas células. O valor médio de absorvância medido nas células controle é considerado como sendo o valor que corresponde a 100% de viabilidade celular. Para as células expostas à substância teste, o valor de viabilidade será relativo às células controle. A concentração da substância testada que provocar a morte de 50% das células baseados nas medidas de absorvância representará o valor de IC_{50} (índice citotóxico de 50%).

A viabilidade das células após exposição de 24 horas com as diferentes concentrações dos ativos Adn, MCN e CPA foi determinada pela coloração com o corante vital vermelho neutro (NR, *neutral red* - SIGMA) e leitura da absorvância a 540 nm no equipamento *Multiskan MCC340*. Em todos os experimentos foi utilizado o SDS como controle positivo de citotoxicidade nas concentrações de 426; 213; 106; 53; 26; 13; 6 e 3 $\mu\text{g/mL}$.

As porcentagens de células viáveis foram determinadas pela leitura da absorvância (média de 6 ou 8 réplicas de cada concentração) das células expostas às substâncias teste e comparadas com a absorvância do controle negativo (apenas células), considerado como 100 % de viabilidade. Para a determinação do IC_{50} , os valores de absorvâncias obtidos após a leitura das placas de 96 poços no leitor *Multiskan MCC340* de acordo com as concentrações testadas foram plotados no programa *3T3 NRU Phototox*.

Todas as linhagens avaliadas foram sensíveis ao controle positivo de citotoxicidade SDS com valores variáveis de IC_{50} (Tabela 2).

Tabela 2. Sensibilidade a SDS das linhagens celulares testadas. Todas as linhagens foram sensíveis ao controle positivo de citotoxicidade SDS com valores variáveis de IC₅₀

Linhagem Celular	IC ₅₀ SDS (µg/mL)
Huvec	30.4
HeLa	78.3
U87	79,8
HepG2	93,2

Estes resultados indicam que as células tumorais necessitam concentrações mais elevadas de SDS em relação as células normais Huvec para obter a morte de 50% das células. Quando as moléculas foram avaliadas (figuras 13-16), os resultados dos ensaios de captura do vermelho neutro mostraram que nas linhagens tumorais HeLa e U87, a viabilidade celular manteve-se acima de 80% em todas as concentrações das 3 moléculas avaliadas. Para a linhagem celular normal Huvec acentuada ação citotóxica da Adn foi observada permitindo a determinação do IC₅₀ de aproximadamente 5,0 µg/mL. Na linhagem tumoral HepG2 foi observado viabilidade inferior a 80% nas concentrações de 17,5 e 20 µg/mL de adenantina indicando atividade citotóxica. Com as concentrações avaliadas não foi possível determinar o IC₅₀ desta molécula. As demais moléculas não apresentaram efeito citotóxico contra a HepG2.

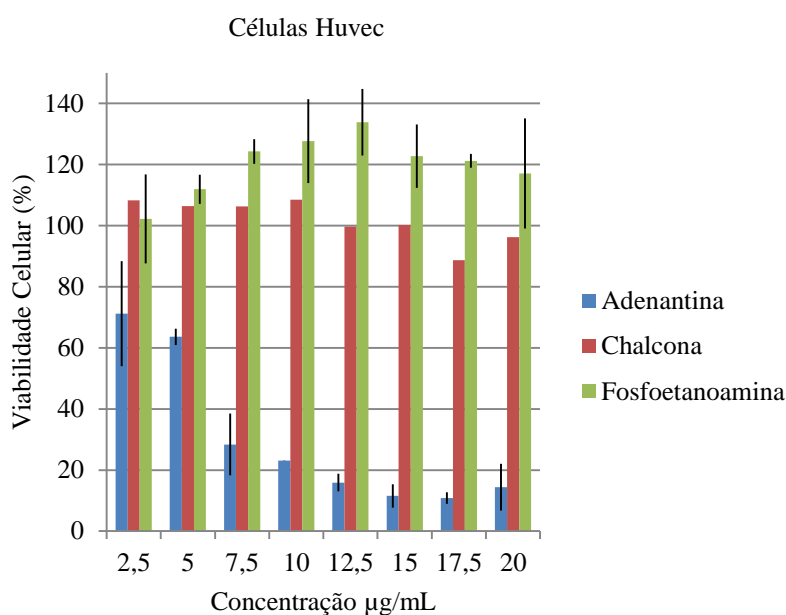


Figura 13 – Linhagem HUVEC. Viabilidade celular da linhagem Huvec após exposição de 24 horas às concentrações de 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0; 17,5 e 20,0 µg/mL dos ativos adenantina, chalcona e fosfoetanolamina. A viabilidade celular foi estimada por absorvância após captação do vermelho neutro.

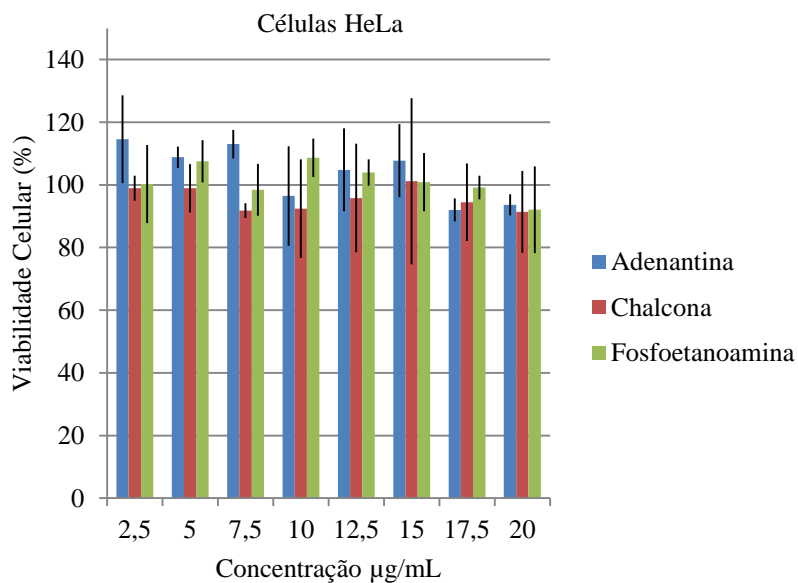


Figura 14- Linhagem HeLa. Viabilidade celular da linhagem tumoral HeLa após exposição de 24 horas às concentrações de 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0; 17,5 e 20,0 µg/mL dos ativos adenantina, chalcona e fosfoetanolamina. A viabilidade celular foi estimada por absorvância após captação do vermelho neutro.

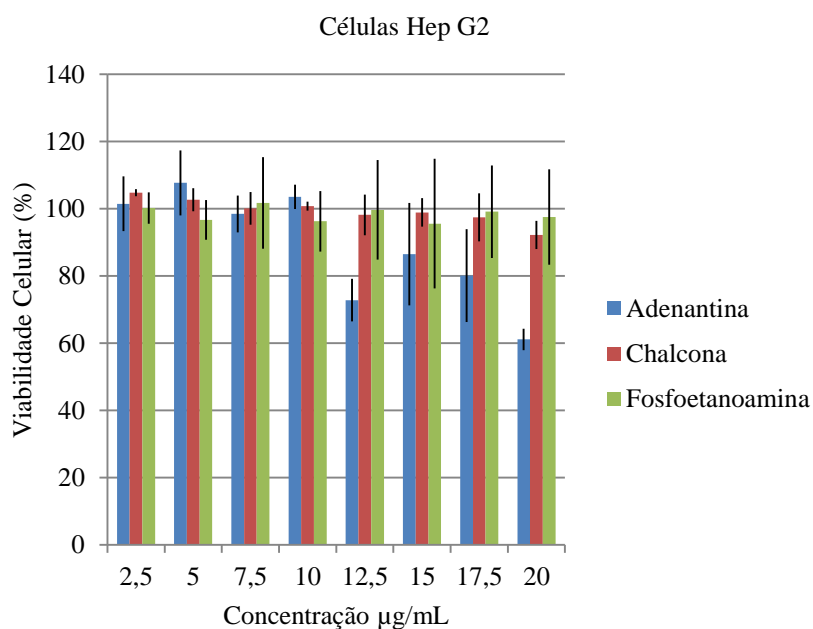


Figura 15 – Linhagem HepG2. Viabilidade celular da linhagem tumoral Hep G2 após exposição de 24 horas às concentrações de 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0; 17,5 e 20,0 µg/mL dos ativos adenantina, chalcona e fosfoetanolamina. A viabilidade celular foi estimada por absorvância após captação do vermelho neutro.

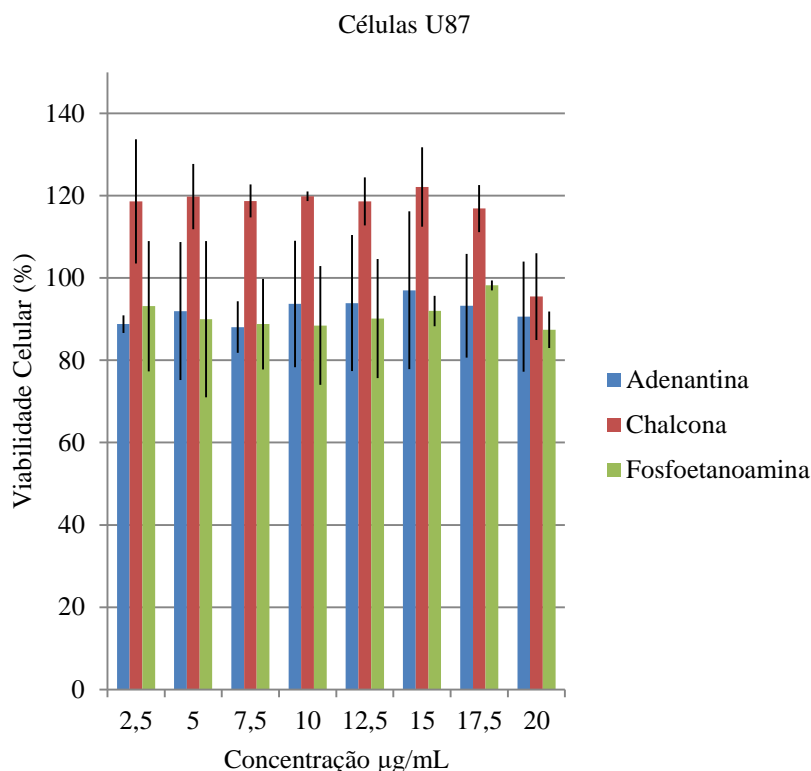


Figura 16 – Linhagem U87. Viabilidade celular da linhagem tumoral U87 após exposição de 24 horas às concentrações de 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0; 17,5 e 20,0 µg/mL dos ativos adenantina, chalcona e fosfoetanolamina. A viabilidade celular foi estimada por absorbância após captação do vermelho neutro.

Liu et al. (2013) determina um IC_{50} de $4.97\mu M$ para Adn durante tratamento de 24h, $2.31\mu M$ durante tratamento de 48h, para HepG2. O mesmo autor considera que duas linhagens celulares de células hepáticas humanas normais foram relativamente insensíveis ao tratamento com adenantina, apresentando valores de IC_{50} acima de $25\mu M$. Em nosso estudo, mortalidade semelhante foi encontrada para células normais HUVEC após 24h de exposição e redução de viabilidade celular das células HepG2 após concentrações de $17\mu M$, sendo dados compatíveis para estas células cancerosas, porém diferentes para células normais HUVEC. Devido a falta do reagente Adn não foi possível testes de citotoxicidade em maiores concentrações, dificultando a identificação do IC_{50} .

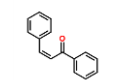
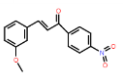

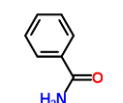
Para comparação, a molécula tiazolidinediona (fármaco para diabetes) e seus derivados apresentam citotoxicidade para células HepG2 por volta de $200\mu M$ para 24h (Frederick et al., 2011). Clitocina, um nucleosídeo recentemente extraído de cogumelos, com atividade antitumoral, apresenta valores de IC_{50} para células HeLa de $14.9\mu M$ e HepG2 de $0.45\mu M$ após 48h de exposição (Sun et al., 2012). Para atividade citotóxica de vários alcalóides com atividade antitumoral foram encontrados valores entre 1 e $20\mu M$ para as

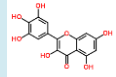
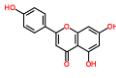
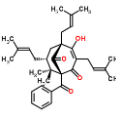
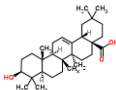
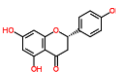
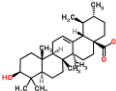
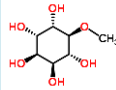
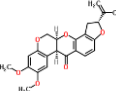
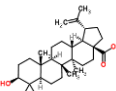
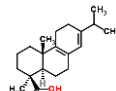
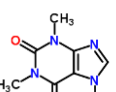
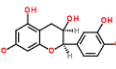
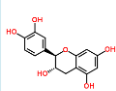
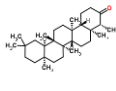
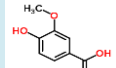
linhagens HepG2, HeLa e U87 (Jiang et al., 2015), incluindo o fármaco anti-câncer Vincristina (Chalovich & Eisenberg, 2005). Daunorrubicina, outro potente fármaco utilizado no tratamento de câncer, apresenta IC_{50} de $0,4\mu M$ para células pancreáticas cancerosas, após um período de 72h (Gervasoni et al., 2004)

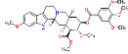
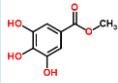
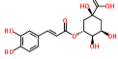
A exposição de 24h adotada para os ensaios pode ter ocultado a possível atividade citotóxica de MCN e CPA, já que efeitos mais significativos na mortalidade celular são encontrados para adenantina após 48h de exposição. A citotoxicidade da adenantina para células normais HUVEC deve ser reavaliada, já que é ausente na literatura.

Um resumo dos inibidores avaliados e resultados obtidos neste trabalho são apresentados na tabela 3.

Tabela 3. Resumo dos resultados obtidos neste projeto em diferentes ensaios bioquímicos e biofísicos. A tabela exibe a estrutura química das moléculas avaliadas bioquimicamente e por métodos que avaliam características estruturais. ND = não determinado.

Molécula (nome)	Estrutura química	Atividade inibitória	Interferência dissulfetos	Alteração estrutura secundária	Alteração estrutura quaternária	Efeito citotóxico
Adenantina		Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Ácido acetil-salicílico		Sim	Não	Sim	Sim	Não
2,4-metoxichalcona		Sim	Sim	Sim	Sim	Não
Colamina ácido fosfórico (Fosfoetanolamina)		Sim	Sim	Sim	Sim	Não
Ácido trans-cianâmico		Sim	ND	Sim	ND	ND
4-bromochalcona		Sim	ND	Sim	ND	ND
2-clorochalcona		Não	ND	ND	ND	ND
benzalacetofenona		Não	ND	ND	ND	ND
3-metoxi-4'-nitrochalcona		Não	ND	ND	ND	ND
2-metoxi-4'-nitrochalcona		Não	ND	ND	ND	ND
3-metoxichalcona		Não	ND	ND	ND	ND
3-cloro-4'-nitrochalcona		Não	ND	ND	ND	ND
Ácido Salicílico		Não	ND	ND	ND	ND
Benzamida		Não	ND	ND	ND	ND
Ácido Benzoico		Não	ND	ND	ND	ND
Peróxido Benzoílo		Não	ND	ND	ND	ND

Mircetina		Não	ND	ND	ND	ND
Apigenina		Não	ND	ND	ND	ND
7-epi-Nemerosona		Não	ND	ND	ND	ND
Ácido oleanóico		Não	ND	ND	ND	ND
Naraginina		Não	ND	ND	ND	ND
Ácido Ursólico		Não	ND	ND	ND	ND
D-Pinitol		Não	ND	ND	ND	ND
Rotenona		Não	ND	ND	ND	ND
Ácido Betulínico		Não	ND	ND	ND	ND
Ácido Palústrico		Não	ND	ND	ND	ND
Cafeína		Não	ND	ND	ND	ND
Epicatequina		Não	ND	ND	ND	ND
Catequina		Não	ND	ND	ND	ND
Friedelina		Não	ND	ND	ND	ND
Ácido Vanílico		Não	ND	ND	ND	ND

Reserpina		Não	ND	ND	ND	ND
Galato de Metila		Não	ND	ND	ND	ND
Ácido Clorogênico		Não	ND	ND	ND	ND

6. Conclusões

A presente pesquisa visou a prospecção de moléculas com potencial inibitório sobre PrxII de *H. sapiens*, uma enzima largamente relacionada com a progressão de neoplasias e cuja recentemente um inibidor denominado adenantina foi capaz de induzir apoptose em células tumorais (Liu et al., 2012). A busca de inibidores foi feita de forma racional através da utilização de moléculas oriundas da biota brasileira ou de moléculas comerciais similares ao inibidor Adn ou que fosse propenso a realizar interações químicas com resíduos do sítio ativo.

Apesar do número pequeno de moléculas testadas até o presente momento (33) foi possível identificar três moléculas que apresentaram capacidade inibitória sobre PrxII, o que indica que a abordagem utilizada é bastante promissora. De fato as três moléculas identificadas (2,4 metoxichalcona - MCN, colina ácido fosfórico - CPA e o ácido acetilsalicílico - ASA) como potenciais inibidores possuem qualidades distintas

A 2,4 metoxichalcona (MCN) pertence a classe das chalconas que são precursoras de muitos biocidas e intermediárias de compostos heterocíclicos. Seus derivados estão associados com diferentes atividades biológicas, entre elas inseticida, anticâncer, anti-inflamatória, bactericida, fungicida, antiviral antitumoral e antimalária (Mohammed, 2015). Em sua estrutura ocorre uma carbonila insaturada, assim como a adenantina, que contribui para que sejam biologicamente ativas, o que foi um dos critérios para sua escolha dentre as moléculas disponíveis. Ao todo foram testadas 9 chalconas sintetizadas a partir de compostos naturais, sendo a 2,4-metoxichalcona a que apresentou melhor inibição nos ensaios. Seus resultados na inibição da atividade da enzima e interferência na formação de monômeros lhe confere características muito semelhantes a da adenantina, a qual se mostra menos apta para ligar-se a PrxII do que a PrxI. Os resultados de citotoxicidade demonstraram que MCN é inócua nas concentrações usadas para células normais, sendo tendo nesse ponto um melhor potencial para biofármaco que a adenantina, que demonstrou toxicidade nos nossos ensaios. No entanto, MCN e Adn não demonstraram diferença significativa na atividade citotóxica para células cancerosas. Devido a estudos já existentes da ação da Adn em células cancerosas, uma revisão do método pode ser necessária para certificar a atividade anti-tumoral tanto de MCN quanto da Ade.

Por sua vez, o ácido acetilsalicílico (ASA) já é largamente conhecido e utilizado como fármaco desde o século XIX, entretanto, o seu alvo biológico só foi determinado no final do século XX (Vane, 1971). O ASA é capaz de inativar a cicloxigenase através da ligação com

um resíduo de arginina (Arg) presente em um canal hidrofóbico da enzima através do estabelecimento de uma ponte salina com o grupo hidroxila do ASA. De fato PrxII possui próximo a C_P um resíduo de Arg que está envolvido na desprotonação de C_P o que deixa o S_γ da cisteína na forma de tiolato (S⁻) o que aumenta em 1.000.000 de vezes sua reatividade em relação a outros tióis proteicos (Hall et al., 2010). Existe a possibilidade de que o efeito inibitório observado pelo ASA sobre PrxII não seja efetuado diretamente na cisteína mas de forma indireta através de uma interação com o resíduo de Arg. Entretanto são necessárias investigações adicionais.

Por fim nossos resultados indicam que a colina ácido fosfórico - CPA foi a molécula que apresentou os efeitos mais destacados sobre a estrutura de PrxII. A CPA também recebe o nome de fosfoetanolamina, e recentemente recebeu grande cobertura pela mídia brasileira em razão de sua utilização para o tratamento de neoplasias sem ter sido aprovado pelos testes clínicos necessários. Entretanto, estudos indicam que esta molécula apresenta efeitos bastante pronunciados no tratamento de melanoma (Ferreira et al, 2011; Ferreira et al., 2013).

A CPA é um precursor central na biossíntese dos fosfolipídios da membrana como fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina, ambos constituintes de membranas celulares. Estes fosfolipídios participar nas vias de sinalização lipídica e pode induzir seus efeitos, quer por estimulação direta dos receptores de membrana ou através da geração de segundos mensageiros (Eyster, 2007). É importante salientar que PrxII já foi detectada em associação com membranas celulares e a PrxII é capaz de decompor hidroperóxidos de lipídeos com grande eficiência (Matte et al., 2013; Wood et al., 2003), entretanto até o presente a interação de Prx com as membranas celulares ainda é bastante elusiva.

Enxergamos que as interações identificadas neste trabalho das moléculas testadas e a PrxII são promissoras, todas parecendo interagir de modo particular com a proteína, alterando sua estrutura e atividade diferentemente. Ensaio de *Differential Scanning Fluorimetry* (DSF) e oxidação do DTT estão em andamento para confirmar os resultados obtidos, assim como testes inibitórios de novas moléculas adquiridas recentemente com outros colaboradores, que apresentam características semelhantes as utilizadas, assim como outras bem particulares, que podem ajudar a elucidar os tipos de estruturas químicas mais propensas a interações com a enzima PrxII, com potencial utilização no tratamento da LLA e outras malignidades relacionadas a esta enzima e sua ampla família, onnipresentes na natureza.

7. Bibliografia

- American Cancer Society. (2016). *Cancer Facts & Figures*. American Cancer Society.
- Avramis, V. I. (2012). Asparaginases: Biochemical Pharmacology and Modes of Drug Resistance. *Anticancer Research*, 32(7), 2423–2437.
- Bae, Y. S., Oh, H., Rhee, S. G., & Yoo, Y. Do. (2011). Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling. *Molecules and Cells*, 32(6), 491–509.
- Benhar, M., Shytaj, I. L., Stamler, J. S., & Andrea, S. (2016). Dual targeting of the thioredoxin and glutathione systems in cancer and HIV. *The Journal of Clinical Investigation*, 126(5).
- Brizuela, M., Huang, H. M., Smith, C., Burgio, G., Foote, S. J., & McMorran, B. J. (2014). Treatment of erythrocytes with the 2-Cys peroxiredoxin inhibitor, conoidin A, prevents the growth of *Plasmodium falciparum* and enhances parasite sensitivity to chloroquine. *PLoS ONE*, 9(4), 1–8.
- Carta, D., & Ferlin, M. G. (2014). An Overview on 2-arylquinolin-4 (1 H) -ones and Related Structures as Tubulin Polymerisation Inhibitors. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2322(14), 2322–2345.
- Chae, H. Z., Robison, K., Poole, L. B., Church, G., Storz, G., & Rhee, S. G. (1994). Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(15), 7017–21.
- Chalovich, J. M., & Eisenberg, E. (2005). Microtubule disrupting chemotherapeutics result in enhanced proteasome-mediated degradation and disappearance of tubulin in neural cells. *Biophysical Chemistry*, 257(5), 2432–2437.
- Colby, D. W., Zhang, Q., Wang, S., Groth, D., Legname, G., Riesner, D., ... Lukacs, R. U. (2008). Sustained suppression of Bcr-Abl-driven lymphoid leukemia by microRNA mimics. *Critical Reviews in Biotechnology*, 105(5), 45–62.
- Colvin, O. M. (1999). An Overview of Cyclophosphamide Development and Clinical Applications. *Curr Pharm Des*, 5(22), 6.
- Dickinson, B. C., & Chang, C. J. (2011). Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. *Nature Chemical Biology*, 7(8), 504–11.
- Douer, D. (2008). Is asparaginase a critical component in the treatment of acute lymphoblastic leukemia? *Best Practice & Research. Clinical Haematology*, 21(4), 647–58.
- Dufour, J., Viennois, E., De Boussac, H., Baron, S., & Lobaccaro, J.-M. (2012). Oxysterol receptors, AKT and prostate cancer. *Current Opinion in Pharmacology*, 12(6), 724–8.
- Eliem, K. A., Fabrizio, A., & Jackson, L. (1970). The Dependence of DNA and RNA Synthesis on Protein Synthesis in Asparaginase-treated Lymphoma Cells. *Cancer Research*, 1(February), 515–528.
- Ertel, A., Verghese, A., Byers, S. W., Ochs, M., & Tozeren, A. (2006). Pathway-specific differences between tumor cell lines and normal and tumor tissue cells. *Molecular Cancer*, 5(1), 55.
- Evrard, C., Smeets, A., Knoop, B., & Declercq, J. (2004). Crystal structure of the C47S mutant of human peroxiredoxin 5. *Journal of Chemical Crystallography*, 34(8), 1–6.
- Eyster, K. M. (2007). The membrane and lipids as integral participants in signal transduction : lipid signal transduction for the non-lipid biochemist The membrane and lipids as integral participants in signal transduction : lipid signal transduction for the non-lipid biochemi. *Adv Physiol Educ*, 31(5), 5–16.
- Ferreira, A. K., Meneguelo, R., Neto, S. C., Chierice, G. O., & Maria, D. A. (2011). Synthetic Phosphoethanolamine Induces Apoptosis Through Caspase-3 Pathway by Decreasing Expression

- of Bax / Bad Protein and Changes Cell Cycle in Melanoma. *Cancer Science and Therapy*, 3(3), 53–59.
- Ferreira, A. K., Rego, E. M., Filho, O. M. R., Chierice, G. O., & Maria, D. A. (2013). Synthetic phosphoethanolamine has in vitro and in vivo anti-leukemia effects. *British Journal of Cancer*, 109(11), 2819–2828.
- Flohe, L. (2011). FORUM REVIEW ARTICLE A Comparison of Thiol Peroxidase Mechanisms. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(3).
- Frederick, D. M., Jacinto, E. Y., Patel, N. N., Rushmore, T. H., Tchao, R., & Harvison, P. J. (2011). Cytotoxicity of 3-(3,5-dichlorophenyl)-2,4-thiazolidinedione (DCPT) and analogues in wild type and CYP3A4 stably transfected HepG2 cells. *Toxicology in Vitro*, 25(8), 2113–2119.
- G1. (2016). Mãe comove nas redes sociais após morte de menina com câncer. Retrieved from <http://g1.globo.com/to/tocantins/noticia/2016/09/mae-comove-nas-redes-sociais-apos-morte-de-menina-com-cancer.html>
- Galindo, R. J., Yoon, J., Devoe, C., & Myers, A. K. (2016). PEG-asparaginase induced severe hypertriglyceridemia. *Arch Endocrinol Metab*, 60(2), 173–177. <https://doi.org/10.1590/2359-3997000000068>
- Gervasoni, J. E., Hindenburg, A. A., Vezeridis, M. P., Schulze, S., Wanebo, H. J., & Mehta, S. (2004). An effective in vitro antitumor response against human pancreatic carcinoma with paclitaxel and daunorubicin by induction of both necrosis and apoptosis. *Anticancer Research*, 24(5 A), 2617–2626.
- Ghaemmaghami, S., Huh, W., Bower, K., Howson, R. W., Belle, A., Depheure, N., ... Welssman, J. S. (2003). Global analysis of protein expression in yeast. *Nature*, 108(1997), 737–741.
- Gong, S. S., Guerrini, L., & Basilico, C. (1991). Regulation of Asparagine Synthetase Gene Expression by Amino Acid Starvation. *Molecular and Cellular Biology*, 11(12), 6059–6066.
- Gorrini, C., Harris, I. S., & Mak, T. W. (2013). Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 12(12), 931–47. <https://doi.org/10.1038/nrd4002>
- Greenfield, N. J. (2009). Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat Protoc*, 1(6), 2876–2890. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.202>.Using
- Greif, J. M., Pezzi, C. M., Klimberg, V. S., Bailey, L., & Zuraek, M. (2012). Gender differences in breast cancer: analysis of 13,000 breast cancers in men from the National Cancer Data Base. *Annals of Surgical Oncology*, 19(10), 3199–204. <https://doi.org/10.1245/s10434-012-2479-z>
- Gutteridge, J. M. C., & Halliwell, B. (2010). Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 393(4), 561–4. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.02.071>
- Guyton, K. Z., Liu, Y., Gorospe, M., Xu, Q., & Holbrook, N. J. (1996). Activation of Mitogen-activated Protein Kinase by H₂O₂. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(8), 4138–4142.
- Hanahan, D., & Harbor, C. S. (1983). Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids Department of Biochemistry and Molecular Biology, 0, 557–580.
- Harvey, A. L. (2008). Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 13(19–20), 894–901.
- Hee, M., Jo, M., Ri, Y., Lee, C., & Tae, J. (2016). Pharmacology & Therapeutics Roles of peroxiredoxins in cancer, neurodegenerative diseases and in inflammatory diseases. *Pharmacology and Therapeutics*, 163, 1–23.
- Hong, P., Koza, S., Bouvier, E. S. P., & Corporation, W. (2012). A review size-exclusion chromatography for the analysis of protein biotherapeutics and their aggregates. *Journal of*

Liquid Chromatography and Related Technologies, 2923–2950.

- Hou, J.-K., Huang, Y., He, W., Yan, Z.-W., Fan, L., Liu, M.-H., ... Chen, G.-Q. (2014). Adenanthin targets peroxiredoxin I/II to kill hepatocellular carcinoma cells. *Cell Death & Disease*, 5(1400), e1400.
- Hu, J., Locasale, J. W., Bielas, J. H., O'Sullivan, J., Sheahan, K., Cantley, L. C., ... Vitkup, D. (2013). Heterogeneity of tumor-induced gene expression changes in the human metabolic network. *Nature Biotechnology*, 31(6), 522–9.
- Hunger, S. P., Lu, X., Devidas, M., Camitta, B. M., Gaynon, P. S., Winick, N. J., ... Carroll, W. L. (2012). Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: a report from the children's oncology group. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 30(14), 1663–9.
- Inaba, H., Greaves, M., & Mullighan, C. G. (2013). Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*, 381(9881), 1943–55.
- INCA. (2014). Retrieved from <http://www.inca.gov.br/>
- Jarrar, M. H., Baranova, a, Collantes, R., Ranard, B., Stepanova, M., Bennett, C., ... Younossi, Z. M. (2008). Adipokines and cytokines in non-alcoholic fatty liver disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 27(5), 412–21.
- Jönsson, T. J., Johnson, L. C., & Lowther, W. T. (2009). Essential Repair Embrace, 451(7174), 98–101.
- Jung, C. L., Choi, H. I., Yu, S. P., Hyung, W. N., Hyun, A. W., Kwon, K. S., ... Ho, Z. C. T. (2008). Irreversible oxidation of the active-site cysteine of peroxiredoxin to cysteine sulfonic acid for enhanced molecular chaperone activity. *Journal of Biological Chemistry*, 283(43), 28873–28880.
- Kang, S. W., Rhee, S. G., Chang, T.-S., Jeong, W., & Choi, M. H. (2005). 2-Cys peroxiredoxin function in intracellular signal transduction: therapeutic implications. *Trends in Molecular Medicine*, 11(12), 571–8.
- Khan, M. A., Chen, H.-C., Wan, X.-X., Tania, M., Xu, A.-H., Chen, F.-Z., & Zhang, D.-Z. (2013). Regulatory effects of resveratrol on antioxidant enzymes: a mechanism of growth inhibition and apoptosis induction in cancer cells. *Molecules and Cells*, 35(3), 219–25.
- Koehn, F. E., & Carter, G. T. (2005). The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 4(3), 206–20.
- Kumar, V., Palermo, R., Talora, C., Campese, a F., Checquolo, S., Bellavia, D., ... Screpanti, I. (2014). Notch and NF- κ B signaling pathways regulate miR-223/FBXW7 axis in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 28(12), 2324–35.
- Kurono, S., Kaneko, Y., Matsuura, N., Oishi, H., Noguchi, S., Kim, S. J., ... Matsuura, S. (2016). Identification of potential breast cancer markers in nipple discharge by protein profile analysis using two-dimensional nano-liquid chromatography / nanoelectrospray ionization-mass spectrometry. *Proteomics Clin*, 10(1), 605–613.
- Kutuk, O., & Basaga, H. (2004). Aspirin inhibits TNF α - and IL-1-induced NF- κ B activation and sensitizes HeLa cells to apoptosis. *Cytokine*, 25(5), 229–237.
- Larson, R. A. (2014). Acute lymphoblastic leukemia (ALL) treatment in adults. Retrieved January 12, 2014, from <http://www.uptodate.com/contents/acute-lymphoblastic-leukemia-all-treatment-in-adults-beyond-the-basics?view=print#>
- Liou, G.-Y., & Storz, P. (2010). Reactive oxygen species in cancer. *Free Radical Research*, 44(5), 479–96.
- Liu, C.-X., Yin, Q.-Q., Zhou, H.-C., Wu, Y.-L., Pu, J.-X., Xia, L., ... Chen, G.-Q. (2012). Adenanthin

- targets peroxiredoxin I and II to induce differentiation of leukemic cells. *Nature Chemical Biology*, 8(5), 486–93.
- Liu, C., Zhou, H.-C., Yin, Q.-Q., Wu, Y.-L., & Chen, G.-Q. (2013). Targeting peroxiredoxins against leukemia. *Experimental Cell Research*, 319(2), 170–6.
- Liu, G., Botting, C. H., Evans, K. M., Walton, J. A. G., Xu, G., Slawin, A. M. Z., & Westwood, N. J. (2010). Optimisation of conoidin A, a peroxiredoxin inhibitor. *ChemMedChem*, 5(1), 41–45.
- Lopes, A. M., Oliveira-nascimento, L. De, Ribeiro, A., Jr, A. T., Breyer, C. A., Oliveira, M. A. De, ... Cavaco-paulo, A. M. (2015). Critical Reviews in Biotechnology Therapeutic l-asparaginase : upstream , downstream and beyond. *Critical Reviews in Biotechnology*, 8551(December).
- López-Lázaro, M. (2007). Dual role of hydrogen peroxide in cancer: possible relevance to cancer chemoprevention and therapy. *Cancer Letters*, 252(1), 1–8.
- Low, F. M., Hampton, M. B., & Winterbourn, C. C. (2008). Peroxiredoxin 2 and peroxide metabolism in the erythrocyte. *Antioxidants & Redox Signaling*, 10(9), 1621–30.
- Lustosa de Sousa, D. W., de Almeida Ferreira, F. V., Cavalcante Félix, F. H., & de Oliveira Lopes, M. V. (2015). Acute lymphoblastic leukemia in children and adolescents: prognostic factors and analysis of survival. *Revista Brasileira de Hematologia E Hemoterapia*, 37(4), 223–9.
- Matte, Bertoldi, M., Mohandas, N., Bugatti, A., Brunati, A., Rusnati, M., ... Perrotta, F. (2013). Membrane association of peroxiredoxin-2 in red cells is mediated by the N-terminal cytoplasmic domain of band 3. *Free Radic Biol Med*, 55(2), 27–35.
- Mccredie, K. B. (1953). L-Asparaginase forthe Treatmentof Cancer. *A cancer journal for clinicians*.
- Mehta, S., & Vemuganti, R. (2014). Review Article. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 2(8), 438–446.
- Mishra, M., Jiang, H., Wu, L., Chawsheen A, H., & Wei, Q. (2016). The Sulfiredoxin-Peroxiredoxin (Srx-Prx) Axis in Cell Signal Transduction and Cancer Development. *Cancer Letters*, 116(8), 1477–1490. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.303790>.The
- Mohammed, J. H. (2015). Biological Activities Importance of Chalcone Derivatives Biological Activities of, 1(3), 107–112.
- Nagy, P., Karton, A., Betz, A., Peskin, A. V, Pace, P., Reilly, R. J. O., ... Winterbourn, C. C. (2011). Model for the Exceptional Reactivity of Peroxiredoxins 2 and 3 with Hydrogen Peroxide. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(20), 18048–18055.
- Nelson, K. J., & Parsonage, D. (2013). Measurement of Peroxiredoxin Activity. *Curr Protoc Toxicol*, 7(8).
- Newman, D. J., Cragg, G. M., & Snader, K. M. (2000). The influence of natural products upon drug discovery (Antiquity to late 1999). *Natural Product Reports*, 17(3), 215–234.
- Offman, M. N., Krol, M., Patel, N., Krishnan, S., Liu, J., Saha, V., & Bates, P. A. (2011). Rational engineering of L-asparaginase reveals importance of dual activity for cancer cell toxicity. *Blood*, 117(5), 1614–1622.
- Ollenschläger, G. (1988). [Unrecognized primary hyperparathyroidism in simultaneous presence of insulin-dependent diabetes mellitus. Joint occurrence of parathyroid adenoma, type I diabetes mellitus, Basedow disease, pernicious anemia and stomach carcinoid]. *Medizinische Klinik*, 83(24).
- Perkins, A., Poole, L. B., & Karplus, P. A. (2014). Tuning of Peroxiredoxin Catalysis for Various Physiological Roles. *Biochemistry*, 53(49), 7693–705.
- Peroja, P., Haapasaari, K., Mannisto, S., & Miinalainen, I. (2016). Total peroxiredoxin expression is associated with survival in patients with follicular lymphoma. *Virchows Arch*, 468, 623–630.

- Pui, C.-H., & Evans, W. E. (2006). Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 354(2), 166–78.
- Qi-Wei Jiang, Mei-Wan Chen, Ke-Jun Cheng, Pei-Zhong Yu, Xing Wei, Z. S. (2015). Therapeutic Potential of Steroidal Alkaloids in Cancer and Other Diseases Qi-Wei. *Medicinal Research Reviews*, 36(6), 119–143.
- Randall, L., Manta, B., Nelson, K. J., Santos, J., Poole, L. B., & Denicola, A. (2016). Structural changes upon peroxynitrite-mediated nitration of peroxiredoxin 2 ; nitrated Prx2 resembles its disulfide-oxidized form. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 590, 101–108.
- Ray, P. D., Huang, B.-W., & Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling*, 24(5), 981–90.
- Repetto, G., del Peso, A., & Zurita, J. L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols*, 3(7), 1125–31.
- Rhee, S. G., & Woo, H. A. (2011). Multiple Functions of Peroxiredoxins : Peroxidases , Sensors and Regulators of the Intracellular. *Antioxidants and Redox Signaling*, 15(3).
- Rocha, S., Costa, E., Coimbra, S., Nascimento, H., Catarino, C., Rocha-pereira, P., ... Santos-silva, A. (2009). Blood Cells , Molecules , and Diseases Linkage of cytosolic peroxiredoxin 2 to erythrocyte membrane imposed by hydrogen peroxide-induced oxidative stress. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 43(1), 68–73.
- Sandhoff, K., Eggeling, C., Ringemann, C., Medda, R., Hell, S. W., Polyakova, S., ... Scho, A. (2009). Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell. *Nature Letters*, 457(2).
- Shrivastava, A., Arif, A., Khurshid, M., Abul, M., Jain, S. K., & Singhal, P. K. (2016). Critical Reviews in Oncology / Hematology Recent developments in l -asparaginase discovery and its potential as anticancer agent. *Critical Reviews in Oncology / Hematology*, 100, 1–10.
- Soethoudt, M., Peskin, A. V, Dickerhof, N., Paton, L. N., Pace, P. E., & Winterbourn, C. C. (2014). Interaction of adenanthin with glutathione and thiol enzymes: Selectivity for thioredoxin reductase and inhibition of peroxiredoxin recycling. *Free Radical Biology & Medicine*, 77C, 331–339.
- Stefan, D. C. (2014). *Pediatric Hematology-Oncology in Countries with Limited Resources*. (D. C. Stefan & C. Rodriguez-Galindo, Eds.). New York, NY: Springer New York.
- Story, R. M., Bishop, D. K., Kleckner, N., & Steitz, T. A. (1993). Structural relationship of bacterial RecA proteins to recombination proteins from bacteriophage T4 and yeast. *Science*, 259(5103), 1892–1896. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0027322196&partnerID=tZOtx3y1>
- Sun, J., Yeung, C. A., Co, N. N., Tsang, T. Y., Yau, E., Luo, K., ... Liu, F. (2012). Clitocine reversal of P-glycoprotein associated multi-drug resistance through down-regulation of transcription factor NF- κ B in R-HepG2 cell line. *PLoS ONE*, 7(8), 1–11.
- Swords, R. T., Kelly, K. R., Smith, P. G., Garnsey, J. J., Mahalingam, D., Medina, E., ... Carew, J. S. (2010). Brief report Inhibition of NEDD8-activating enzyme : a novel approach for the treatment of acute myeloid leukemia. *The American Society of Biology*, 115(18), 3796–3801.
- Tairum, C. A., Santos, M. C., Breyer, C. , Geyer, R., Ferrer-Suetta, G., Nieves, C., ... Oliveira, M. . (2016). Catalytic Thr or Ser residue modulates structural switches in 2-Cys peroxiredoxin by distinct mechanisms. *Nature Scientific Reports*, (August), 1–12.
- Tairum, C. a, de Oliveira, M. a, Horta, B. B., Zara, F. J., & Netto, L. E. S. (2012). Disulfide biochemistry in 2-cys peroxiredoxin: requirement of Glu50 and Arg146 for the reduction of yeast Tsa1 by thioredoxin. *Journal of Molecular Biology*, 424(1–2), 28–41.

- Tothova, Z., Kollipara, R., Huntly, B. J., Lee, B. H., Castrillon, D. H., Cullen, D. E., ... Gilliland, D. G. (2007). FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. *Cell*, 128(2), 325–39.
- Trzeciacka, A., Klossowski, S., Bajor, M., Zagodzón, R., Gaj, P., Muchowicz, A., ... Firczuk, M. (2015). Dimeric peroxiredoxins are druggable targets in human Burkitt lymphoma. *Oncotarget*, 7(2).
- Vander Heiden, M. G. (2011). Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 10(9), 671–84.
- Vane, J. R. (1971). © 1971 Nature Publishing Group. *Nature New Biology*, 231(6), 232–235.
- Wang, X.-S., Gong, J.-N., Yu, J., Wang, F., Zhang, X.-H., Yin, X.-L., ... Zhang, J.-W. (2012). MicroRNA-29a and microRNA-142-3p are regulators of myeloid differentiation and acute myeloid leukemia. *Blood*, 119(21), 4992–5004.
- Washington, M. P. L. (2016). MODELAGEM DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DA L-ASPARAGINASE RECOMBINANTE UTILIZANDO A ABORDAGEM DINÂMICA DA ANÁLISE DO BALANÇO DE FLUXOS METABÓLICOS.
- Wei, W., Ma, C., Cao, Y., Yang, L., Huang, Z., Qin, D., ... Wu, Y.-L. (2016). Identification of H7 as a novel peroxiredoxin I inhibitor to induce differentiation of leukemia cells. *Oncotarget*, 7(4),
- Wei W, L. C., D, Q., Song L, X. L., H, L., Y, Y., W, W., ... S., H. (2016). Targeting peroxiredoxin I potentiates 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced cell differentiation in leukemia cells. *Mol Med Rep*, 13(3).
- Winterbourn, C. C. (2008). Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat Chem Biol*, 4(5), 278–286.
- Wood, Z., Schröder, E., J, H., ZA, W., E, S., & LB, P. (2003). Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci*, 28(1), 32–40.
- Xu, Y., Fang, F., Zhang, J., Jossion, S., St Clair, W. H., & St Clair, D. K. (2010). miR-17* suppresses tumorigenicity of prostate cancer by inhibiting mitochondrial antioxidant enzymes. *PloS One*, 5(12), e14356.
- Yang, K. S., Kang, S. W., Woo, H. A., Hwang, S. C., Chae, H. Z., Kim, K., & Rhee, S. G. (2002). Inactivation of human peroxiredoxin I during catalysis as the result of the oxidation of the catalytic site cysteine to cysteine-sulfinic acid. *Journal of Biological Chemistry*, 277(41), 38029–38036.
- Yeo, K. K., Gaynon, P. S., Fu, C. H., Wayne, A. S., & Sun, W. (2016). Vinorelbine (BDMV): An Active Reinduction Regimen for Children With Relapsed Acute Lymphoblastic Leukemia and Asparaginase Intolerance. *Pediatr Hematol Oncol*, 38(5).
- Ying, X. U., Jinbao, L. I. U., Yingli, W. U., Qinglong, G. U. O., & Handong, S. U. N. (2015). Life Sciences Natural products against hematological malignancies and. *Science China*, 58(12).
- Yong, W. (2015). Clinical study of L -asparaginase in the treatment of extranodal NK / T-cell lymphoma , nasal type. *Hematological Oncology*, 34(2), 59–117.
- Yu, H. G., Huang, J. A., Yang, Y. N., Huang, H., Luo, H. S., Yu, J. P., ... Schmitz, F. (2002). The effects of acetylsalicylic acid on proliferation, apoptosis, and invasion of cyclooxygenase-2 negative colon cancer cells. *European Journal of Clinical Investigation*, 32(11), 838–846.
- Zhao, Y., Butler, E. B., & Tan, M. (2013). Targeting cellular metabolism to improve cancer therapeutics. *Cell Death & Disease*, 4(3), e532.