

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Instituto de Química

Campus de Araraquara

ESTUDO DE NOVOS COMPOSTOS GUANIDÍNICOS INIBIDORES DA
ENZIMA DESOXI-HIPUSINA SINTASE (DHPS) COMO AGENTES
ANTIPROLIFERATIVOS E ANTIFÚNGICOS

ALEXANDRA DANIELA BARRIOS EGUILUZ

Araraquara - SP

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Instituto de Química

Campus de Araraquara

ESTUDO DE NOVOS COMPOSTOS GUANIDÍNICOS INIBIDORES DA
ENZIMA DESOXI-HIPUSINA SINTASE (DHPS) COMO AGENTES
ANTIPROLIFERATIVOS E ANTIFÚNGICOS

ALEXANDRA DANIELA BARRIOS EGUILUZ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Biotecnologia, do Instituto de
Química da Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre
em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli

Co-orientadora: Dra. Tatiana Maria de Souza Moreira

Araraquara - SP

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

B276e Barrios Eguiluz, Alexandra Daniela
Estudo de novos compostos guanidínicos inibidores da
enzima desoxi-hipusina sintase (DHPS) como agentes
antiproliferativos e antifúngicos / Alexandra Daniela Barrios
Eguiluz. – Araraquara: [s.n.], 2018
72 p.: il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química

Orientador: Cleslei Fernando Zanelli

Coorientador: Tatiana Maria de Souza Moreira

1. Fungos patogênicos. 2. Citotoxicidade. 3. Inibidores
enzimáticos. 4. Proteínas – Síntese. 5. Células - Proliferação.

I. Título



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Estudo de novos compostos guanidínicos inibidores da enzima Desoxi-Hipusina Sintase (DHPS) como agentes antiproliferativos e antifúngicos"

AUTORA: ALEXANDRA DANIELA BARRIOS EGUILUZ

ORIENTADOR: CLESLEI FERNANDO ZANELLI

COORIENTADORA: TATIANA MARIA DE SOUZA MOREIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:

Tatiana Maria de Souza Moreira

Dr^a. TATIANA MARIA DE SOUZA MOREIRA

Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Alexandra Ivo de Medeiros

Prof^a. Dr^a. ALEXANDRA IVO DE MEDEIROS

Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Geisiany Maria de Queiroz-Fernandes

Prof^a. Dr^a. GEISIANY MARIA DE QUEIROZ-FERNANDES

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde / Universidade do Sagrado Coração - USC - Bauru

Araraquara, 20 de abril de 2018

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Alexandra Daniela Barrios Eguiluz

Nome em citações bibliográficas: Eguiluz, A. D. B.

e-mail: alexandra_be88@hotmail.com

ENDEREÇO PROFISSIONAL

Laboratório de Biologia Molecular e Celular de Microrganismos

Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP

Rodovia Araraquara-Jaú Km 1

Cep 14 801-902

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

Graduação em Engenharia Biotecnológica.

Universidad Catolica de Santa Maria, U.SANTA MARIA, Peru

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2017 - 2017 Curso de curta duração em Perícia Criminal: Biologia Forense e Análises Laboratoriais. (Carga horária: 10h).

Instituto Biomédico de Aprimoramento Profissional, IBAP, Jacarei, Brasil

2017 - 2017 Curso de curta duração em Introdução à Necropsia. (Carga horária: 10h).

Instituto Biomédico de Aprimoramento Profissional, IBAP, Jacarei, Brasil

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Apresentação de trabalho

2017 IV Simpósio de Microbiologia da UFMG Novos compostos benzoilguanidínicos com potencial inibitório para desoxi-hipusina sintase humana.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, ao Divino Ninho, por me dar a força para continuar apesar dos inconvenientes, porque dia a dia me acompanha e me fortalece para realizar um dos meus grandes objetivos.

Para meu pai José por todo o seu amor, compreensão, por acreditar em mim e me dar exemplos de melhoria, por que a pesar da distancia, me alentou a continuar quando parecia que as coisas não estavam indo bem, quem me apoiou e me ajudou alcançar meu objetivo.

Para minha mãe Teresa Graciela que cuida de mim desde o céu e é meu impulso para me levantar e continuar sempre que há dificuldades.

Para minhas irmãs Tania, Verónica, Joyce e Katlin por serem minhas amigas, porque são um exemplo a seguir, por confiar em mim e me alentar.

Para as minhas sobrinhas e meus sobrinhos, eu amo todos e além do laço familiar nos une uma grande amizade.

Para toda a minha família por mostrar-me o seu apoio e a sua confiança, obrigada por estar do meu lado.

Para eles é essa dedicatória, porque é para eles que devo, pelo seu apoio incondicional.

Alexandra Daniela Barrios Eguiluz

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me fortalecer dia a dia e me dar forças para seguir em frente.

À minha família e amigos, pela confiança e além da distância, dar-me seu apoio nos momentos difíceis.

Ao meu orientador Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli, pela aceitação no laboratório, a oportunidade de realizar esse projeto e os conhecimentos e discussões para realizar o presente trabalho.

Um agradecimento especial à Profa. Dra. Tatiana Maria de Souza, que me coorientou com paciência e empenho nesta nova etapa da minha vida e proporcionou inúmeros conhecimentos e reflexões que foram primordiais para a conclusão desse trabalho.

Aos professores Dra. Alexandra Ivo de Medeiros, Dr. Eduardo René Perez Gonzalez, Dr. Paulo Inácio da Costa e Dra. Ana Marisa Fusco Almeida, pela fundamental colaboração no projeto.

À doutoranda Ana Carolina Salinas, à pós-doutoranda Dra. Caroline Barcelos Costa Orlandi, à mestranda Suélen Fernandes Silva e à técnica Ana Paula Munhoz pelo empenho constante no desenvolvimento de experimentos e análises importantes para a conclusão deste trabalho.

A todos os colegas de trabalho do laboratório BiomolVZ, pelo apoio e parceria.

A meus amigos Carla e Juan Carlos por alentar-me e escutar-me nos momentos que pareciam difíceis.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Instituto de Química da UNESP de Araraquara e Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara, pelo apoio financeiro e institucional, que foi essencial para a realização desse trabalho.

Aos funcionários do Instituto de Química da UNESP de Araraquara sempre prontos para ajudar no que fosse preciso e a muitas pessoas que fizeram parte da minha vida profissional que gostaria de agradecer-las pela amizade, conselho e companheirismo. Alguns estão aqui comigo e outros em minha memória e em meu coração, quero agradecer por serem parte de mim, por tudo o que me deram e por todas as suas bênçãos.

“Viver é enfrentar um problema atrás do outro. O modo como você o encara é que faz a diferença.”

Benjamin Franklin

RESUMO

O fator de tradução de eucariotos eIF5A é descrito como a única proteína que apresenta o aminoácido hipusina, o qual é gerado por uma modificação pós-traducional essencial para a proliferação celular em todos os eucariotos estudados até o momento, sendo que a enzima desoxi-hipusina sintase (DHPS) é responsável pela primeira etapa da formação desse aminoácido em eIF5A. Portanto, a inibição de DHPS também impede a modificação de eIF5A, tornando esta proteína não funcional, o que pode ter aplicação no tratamento dos tipos de câncer em que o fator está envolvido. Embora M1-guanil-1,7-diamino-heptano (GC7) seja potente inibidor da enzima DHPS, foram observados outros efeitos na célula devido à atuação do composto em alvos não específicos. Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo a busca por novos inibidores de DHPS, com baixa citotoxicidade e que reduzam a proliferação celular ou que inibam o crescimento de micro-organismos eucarióticos patogênicos, como algumas espécies de fungos. Primeiramente, foi avaliada a citotoxicidade de diferentes compostos com núcleo guanidínico frente a macrófagos murinos. Entre os compostos testados, aqueles que apresentaram menor citotoxicidade foram o composto GC7 e os compostos de núcleo guanidínico com um grupo fenil substituído em *para* por uma metila e outro por um flúor. A partir deste resultado, os compostos foram submetidos à avaliação de sua atividade antiproliferativa frente às mesmas células. GC7 promoveu inibição da proliferação como já descrito na literatura, mas os compostos testados não tiveram efeito na proliferação. Por meio de avaliação *in vitro* da inibição direta sobre a enzima DHPS, os compostos de núcleo guanidínico com um grupo fenil substituído em *para* por Br, I e sem substituição mostraram inibição da atividade enzimática com uma resposta dose-dependente. Pela avaliação da susceptibilidade, o composto TrisBrEsp, com três grupos guanidínicos substituídos, apresentou as menores concentrações inibitória e fungicida mínimas contra espécies de *Candida*, *Cryptococcus* e *Paracoccidioides*, enquanto que GC7 mostrou inibição do crescimento apenas para as espécies de *Cryptococcus*. Assim, embora GC7 e os compostos testados com núcleo guanidínico contendo uma fenila substituída por um grupo halogênio ou um apolar apresentem inibição direta sobre a enzima DHPS, não foi possível, nas concentrações testadas, confirmar a atividade que o inibidor GC7 possui, que é a de retardar a proliferação celular. Por outro lado, o mecanismo da inibição do crescimento dos fungos aqui testados deve ser melhor estudado, visto que GC7 apresentou pouco efeito inibidor e o composto com melhor atividade não inibiu a DHPS diretamente nas concentrações testadas.

Palavras chave: Desoxi-hipusina sintase. eIF5A. Composto guanidínico. Citotoxicidade. Proliferação celular. Fungos patogênicos. Concentração inibitória mínima.

ABSTRACT

Eukaryotic translation factor eIF5A is described as the only protein that presents the amino acid hypusine that is generated by a post-translational modification, which is essential for cell proliferation in all the eukaryotes studied to date. The enzyme deoxyhypusine synthase (DHPS) is responsible for the first stage of formation of this amino acid in eIF5A. Therefore, the inhibition of DHPS also prevents the modification of the eIF5A, making this protein non-functional, which may have application in the treatment of cancer kinds in which this factor is involved. Although *N1-guanyl-1,7-diaminoheptane* (GC7) is a strong inhibitor of the DHPS enzyme, other effects on the cell were observed due to the acting of the compound on non-specific targets. Thus, the present work aims to search for new DHPS inhibitors, with low cytotoxicity and able to reduce cell proliferation or inhibit the growth of pathogenic eukaryotic microorganisms such as some fungal species. Firstly, the cytotoxicity of different compounds with guanidinic nucleus against murine macrophages was evaluated. Among the compounds tested, those that showed the lowest cytotoxicity were the GC7 compound and the guanidine core compounds with a phenyl group substituted in *para* for one methyl and another with fluorine. From these data, the antiproliferative activity of the compounds towards the same cells was evaluated. GC7 promoted inhibition of proliferation as already described in the literature, but the compounds tested had no effect on proliferation. By means of *in vitro* evaluation of direct inhibition on the DHPS enzyme, the guanidine core compounds with a phenyl group substituted in the *para* position by Br, I and without substitution showed inhibition of enzyme activity with a dose-dependent response. By the susceptibility evaluation, the TrisBrEsp compound with three-substituted guanidine groups showed the lowest concentrations for inhibitory and minimum fungicidal against *Candida*, *Cryptococcus* and *Paracoccidioides species*. Whereas, the GC7 showed inhibition of growth only for *Cryptococcus species*. Thus, although GC7 and compounds tested with a guanidine nucleus containing a phenyl substituted by a halogen or a nonpolar group show direct inhibition on the DHPS enzyme, it was not possible, at the concentrations tested, to confirm the activity of the GC7 inhibitor, which is to retard cell proliferation. On the other hand, the mechanism of inhibition of the growth of the fungi tested here should be better studied, since the GC7 showed little inhibitory effect and the compound with the best activity did not inhibit the DHPS directly at the tested concentrations.

Key words: Deoxyhypusine synthase. eIF5A. Guanidine compounds. Cytotoxicity. Cell proliferation. Pathogenic fungi. Minimal inhibitory concentration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo do tetrâmero da enzima DHPS.	14
Figura 2. Modelo representativo da estagnação do ribossomo (<i>ribosome stalling</i>) em sequências que codificam prolinas consecutivas.	16
Figura 3. Via de hipusinação de eIF5A.	17
Figura 4 Representação da conservação de eIF5A e suas enzimas modificadoras	18
Figura 5. Representação da distribuição dos controles e compostos testados para citotoxicidade celular.	31
Figura 6. Posicionamento do composto GC7 no sítio ativo de um dos monômeros de DHPS.	38
Figura 7.. Viabilidade celular (%) de RAW 264.7 frente à anfotericina B.	40
Figura 8. Dose-resposta da viabilidade celular de macrófagos RAW 264.7 tratados com os derivados guanidínicos testados e GC7.	43
Figura 9.. Influencia dos compostos com núcleo guanidínico sobre a proliferação de células RAW 264.7	46
Figura 10. Inibição enzimática nas diferentes concentrações testadas dos compostos guanidínicos	49
Figura 11. Interação de GC7 com DHPS e demais compostos inibidores da enzima.	51
Figura 12 Alinhamento múltiplo entre as isoformas das diferentes espécies em estudo	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Compostos guanidínicos testados neste trabalho.	29
Tabela 2. Viabilidade celular (% \pm desvio padrão) de RAW 264.7 frente aos compostos com núcleo guanidínico e CC ₅₀ calculada.	39
Tabela 3. Viabilidade celular (% \pm desvio padrão) de RAW 264.7 frente aos compostos com núcleo guanidínico e CC ₁₅ calculada.	42
Tabela 4. Dados de potencial de inibição e IC ₅₀ dos compostos guanidínicos.	48
Tabela 5. Valores da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração fungicida mínima (CFM) contra espécies de <i>Candida</i> , <i>Cryptococcus</i> e <i>Paracoccidioides</i> .	54
Tabela 6. Determinação do IS dos compostos que apresentaram atividade inibitória sobre <i>Candida</i> spp.	56
Tabela 7. Determinação do IS dos compostos que apresentaram atividade inibitória sobre <i>Cryptococcus</i> spp.	56
Tabela 8. Determinação do IS dos compostos que apresentaram atividade inibitória sobre <i>Paracoccidioides</i> spp.	57
Tabela 9. Isoforma de DHPS humana e de diferentes espécies fúngicas e similaridade entre elas.	59

LISTA DE ABREVIATURAS

4E-BP1	proteína de ligação 1 do fator de iniciação eucariótico 4
eIF5A	fator de tradução de arqueas
ANOVA	Análise de variância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CC ₁₅	Concentração citotóxica sobre 15% das células
CC ₅₀	Concentração citotóxica sobre 50% das células
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CFSE	Carboxi-fluoresceína succinimidil ester
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DHPS	desoxi-hipusina sintase
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	dimetilsulfóxido
DOHH	desoxi-hipusina hidroxilase
eIF2	fator de iniciação eucariótico 2
eIF4D	fator de iniciação eucariótica 4D
eIF5A	fator de tradução 5A
FITC	isotiocianato de fluoresceína
GC7	<i>N</i> 1-guanil-1,7-diamino-heptano
HIV-1	vírus da imunodeficiência humana
IC ₅₀	Concentração inibitória sobre 50% da atividade enzimática
IL-6	interleucina 6
iNOS	óxido nítrico sintase induzível
IS	Índice de seletividade
LPS	lipopolissacarídeo
MTT	3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio
NAD	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	dinucleotídeo nicotinamida adenina reduzido
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (solução salina tamponada com fosfato)
pH	potencial hidrogeniônico
SFB	Soro fetal bovino
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α

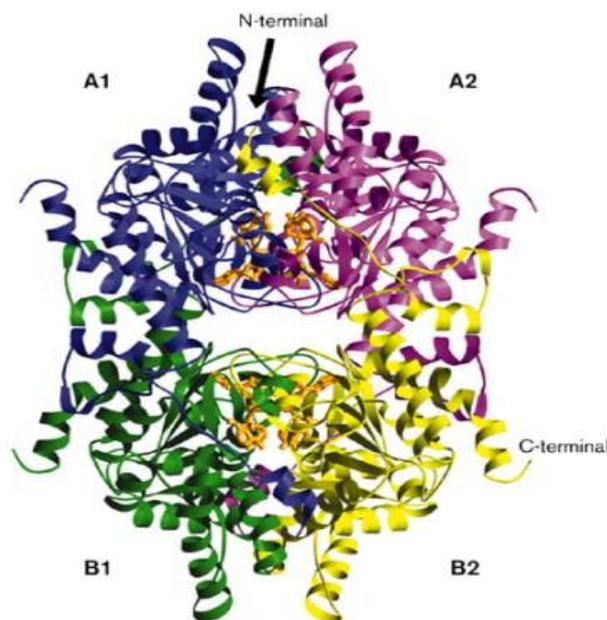
SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 <i>Fator de tradução de eucariotos (eIF5A) e hipusinação</i>	15
1.2 <i>Proliferação e compostos inibidores da enzima DHPS</i>	20
1.3 <i>Doenças causadas por fungos e procura por novos tratamentos</i>	23
2. OBJETIVOS	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Compostos guanidínicos testados	28
3.2 Cultura de células de mamífero	30
3.3 Avaliação da atividade citotóxica em células RAW 264.7	30
3.4 Ensaio de proliferação das células RAW 264.7	32
3.5 Ensaio bioquímico com a enzima DHPS	33
3.6 Testes de sensibilidade dos compostos frente a fungos patogênicos.	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1 Compostos com núcleos guanidínicos e avaliação da citotoxicidade	38
4.2 Proliferação de células RAW 264.7 frente ao tratamento com compostos guanidínicos.....	45
4.3 Ensaio bioquímico com a enzima DHPS	47
4.4 Testes de sensibilidade dos compostos frente a fungos patogênicos	52
5. CONCLUSÕES	62
6. REFERÊNCIAS	63

1. INTRODUÇÃO

A enzima Desoxi-Hipusina Sintase (DHPS) é conservada evolutiva e funcionalmente, estando presente tanto em eucariotos quanto em arqueas e possui tamanho de aproximadamente 40-43 kDa, dependendo da espécie (LIAO *et al.*, 1998; CHAWLA *et al.*, 2010). Esta enzima catalisa a primeira etapa da modificação pós-traducional chamada hipusinação, a qual ocorre apenas no fator de tradução de eucariotos (eIF5A) e é essencial para sua atividade em todos os organismos testados até o momento. DHPS é composta por quatro monômeros associados em dois pares de dímeros (A1A2 e B1B2), totalizando quatro sítios ativos por molécula (Figura 1) (LIAO *et al.*, 1998). A atividade de DHPS é específica, uma vez que catalisa a formação do intermediário desoxi-hipusina através da adição do grupo aminobutil da espermidina a um resíduo específico de lisina da proteína eIF5A. Na sua forma hipusinada, eIF5A foi relacionada com a proliferação celular e é altamente expressa em diferentes tipos de câncer, o que coloca a hipusinação como um alvo terapêutico importante (MATHEWS e HERSHEY, 2015; NAKANISHI e CLEVELAND, 2016).

Figura 1: Modelo do tetrâmero da enzima Desoxi-Hipusina Sintase (DHPS).



O tetrâmero consiste em dois pares de dímeros associados fortemente (dímero A: A1 em azul e A2 em magenta, dímero B: B1 em verde e B2 em amarelo). Duas moléculas de NAD (cor laranja) ligadas em cada interface de dímero (LIAO *et al.*, 1998).

1.1 Fator de tradução de eucariotos (eIF5A) e hipusinação

Da sigla em inglês *eukaryotic translation initiation factor 5A*, eIF5A foi inicialmente chamado de fator de iniciação eucariótica 4D (eIF4D) e foi originalmente purificado a partir de ribossomos extraídos de lisados de reticulócitos de coelho (BENNE *et al.*, 1979; GERNER *et al.*, 1986). A denominação dada a esta proteína foi devido à sua capacidade de estimular de 2 a 3 vezes a síntese de metionil-puromicina, um ensaio *in vitro* utilizado como modelo para avaliar fatores envolvidos na formação da primeira ligação peptídica durante a tradução (BENNE *et al.*, 1979; PARK *et al.*, 1993).

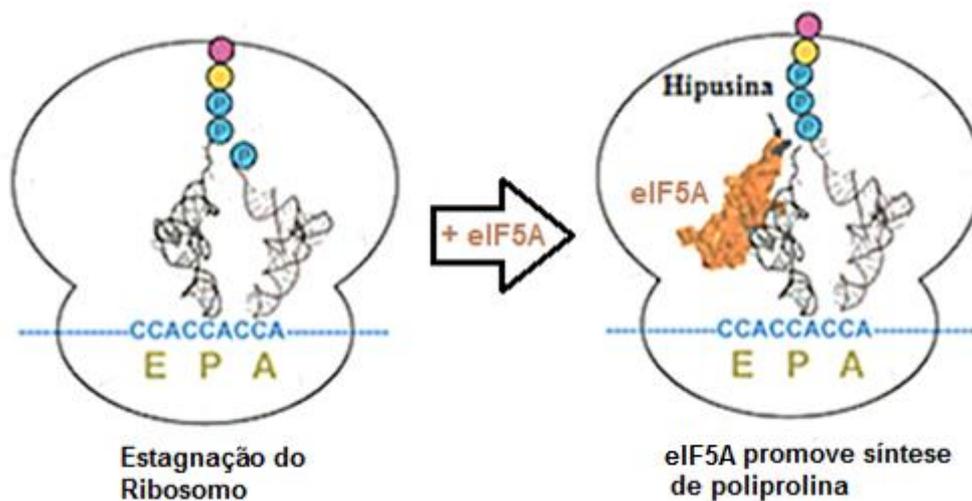
Posteriormente, foi proposto que eIF5A seja um fator envolvido na tradução de um grupo específico de mensageiros, por exemplo, daqueles envolvidos na transição G1/S do ciclo celular (KANG; HERSHEY, 1994). Esta hipótese foi levantada devido à observação de que a inibição da modificação pós-traducional de eIF5A bloqueia a proliferação celular de diferentes linhagens de células de mamíferos (HANAUSKE-ABEL *et al.*, 1994).

Embora a função de eIF5A como fator de início de tradução nunca tenha sido claramente demonstrada, a comprovação de que eIF5A associa-se com ribossomos ativamente engajados na tradução e que mutantes condicionais de eIF5A apresentam defeitos claros na síntese de proteínas, estabeleceu uma função para este fator no processo de tradução (JAO; CHEN, 2006; ZANELLI *et al.*, 2006; DIAS *et al.*, 2008). Interessantemente, defeitos observados nos perfis polissomais de mutantes de eIF5A de *Saccharomyces cerevisiae* sensíveis à temperatura, sugeriram um papel para eIF5A na etapa da elongação da tradução ao invés do início (ZANELLI *et al.*, 2006; GREGIO *et al.*, 2009; SAINI *et al.*, 2009).

Resultados para mutantes de eIF5A em *S. cerevisiae* também demonstraram que proteínas repórteres de luminescência, fusionadas por sequências ricas em prolinas (PPP) e proteínas com sequências múltiplas de poliprolinas têm sua tradução dependente de eIF5A e de hipusinação (GUTIERREZ *et al.*, 2013; MÉMIN *et al.*, 2014). Estes resultados estão de acordo com os estudos realizados tanto *in vitro* quanto *in vivo*, em que foi

observado que a sequência de pelo menos três prolínas consecutivas causa a estagnação do ribossomo (*ribosome stalling*) durante a elongação da tradução de proteínas. Foi demonstrado que eIF5A se liga entre os sítios P e E do ribossomo, com seu resíduo de hipusina próximo ao acceptor tRNA do sítio P, o que contribui para a atividade de formação da ligação peptídica pelo Centro de Peptidil-Transferase (*Peptidyl-Transferase Center* - PTC) do ribossomo, como mostrado na Figura 2 (GUTIERREZ *et al.*, 2013).

Figura 2. Modelo representativo da estagnação do ribossomo (*ribosome stalling*) em sequências que codificam prolínas consecutivas.

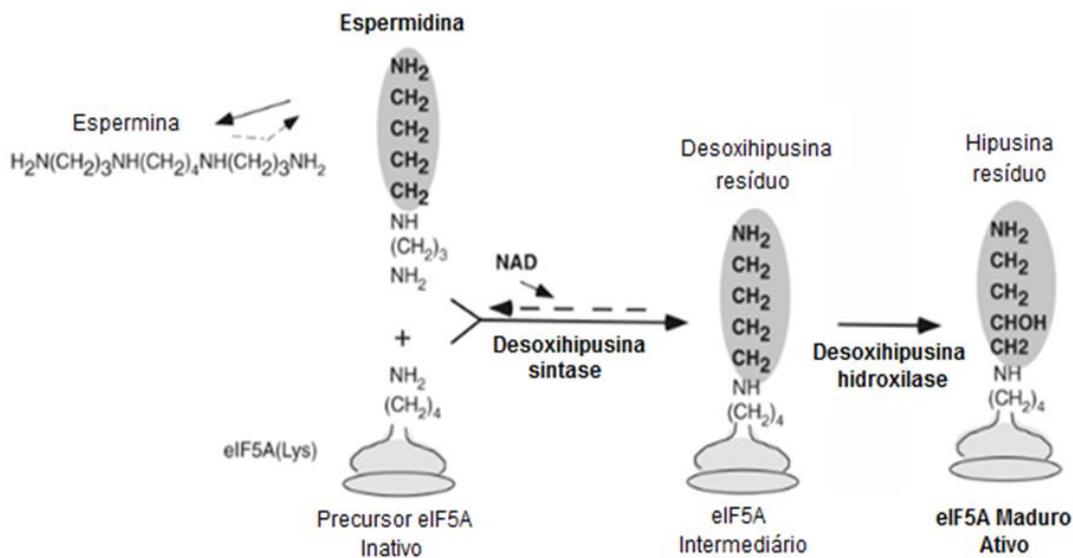


Neste modelo, dois resíduos de prolínas foram recém adicionados ao polipeptídio nascente, ligado ao tRNA do sítio P, e o terceiro resíduo de prolina encontra-se no tRNA^{Pro}, no sítio A do ribossomo. A entrada de eIF5A no sítio E do ribossomo deixaria sua cadeia lateral de hipusina adjacente ao peptidil-tRNA do local P, promovendo o estabelecimento da ligação peptídica com a prolina localizada no local A (adaptado de GUTIERREZ *et al.*, 2013).

Mais recentemente, outros estudos demonstraram que eIF5A tem uma participação ainda mais ampla tanto na elongação quanto na terminação da tradução. Na elongação, alivia o atraso ou a parada de diversos *motifs* de tripeptídeos, não estando sua função apenas relacionada a sequências ricas em prolínas. Na terminação, por sua vez, eIF5A estimula a hidrólise da ligação peptidil-tRNA mediada por eRF1 (fator de liberação eucariótico) (PELECHANO e ALEPUZ, 2017; SCHULLER *et al.*, 2017).

eIF5A sofre uma modificação única, essencial para sua função na célula. Esta modificação leva à formação do resíduo de aminoácido chamado de hipusina (Figura 3). Para a formação do aminoácido hipusina (hidroxi-putrescina-lisina), são necessárias duas reações enzimáticas sequenciais. Na primeira reação, a enzima desoxi-hipusina sintase (DHPS) catalisa, de forma reversível e dependente de NAD⁺ (nicotinamida adenina dinucleotídeo), a desidrogenação da espermidina e a consequente clivagem e transferência do grupo 4-aminobutil para o grupo ε-amino do resíduo de lisina de eIF5A, gerando o intermediário desoxi-hipusina. Na segunda reação, o resíduo intermediário é hidroxilado de maneira irreversível, por ação da enzima desoxi-hipusina hidroxilase (DOHH), gerando o resíduo de hipusina (PARK, 2006; PARK *et al.*, 2010).

Figura 3. Via de hipusinação de eIF5A.

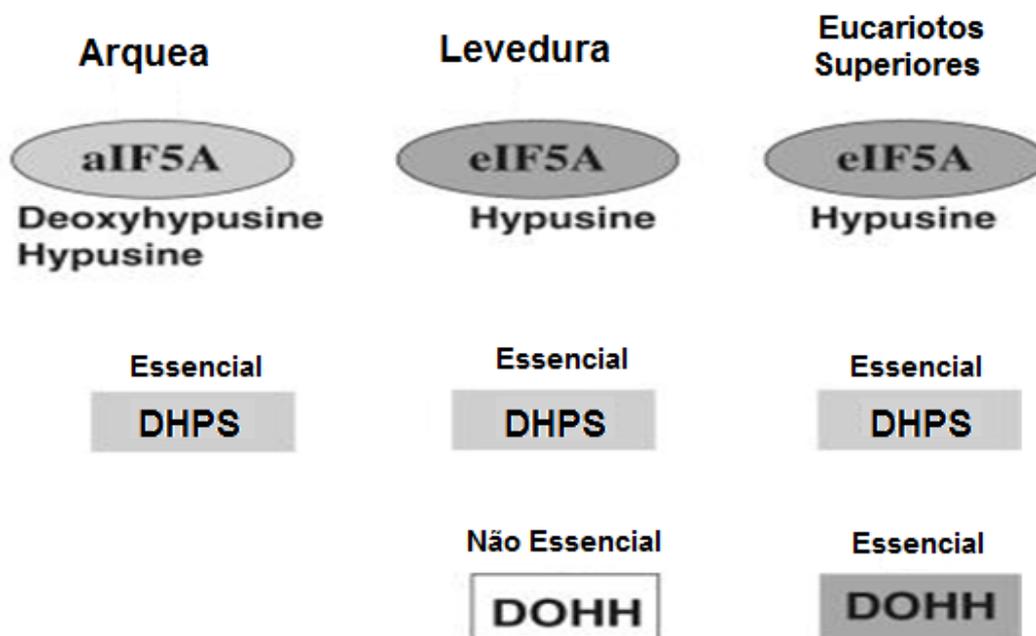


Para a formação do aminoácido hipusina são necessárias duas reações enzimáticas sequenciais. A primeira catalisada pela enzima desoxi-hipusina sintase (DHPS) e, subsequentemente, a hidroxilação pela enzima desoxi-hipusina hidroxilase (DOHH) (adaptado de PARK *et al.*, 2010).

Tanto eIF5A quanto a desoxi-hipusina sintase são conservadas ao longo da evolução sendo encontradas de arquea a eucariotos (Figura 4). No entanto, ao contrário da desoxi-hipusina sintase, nenhuma hidroxilase é encontrada nas

espécies de arquea. Em levedura a etapa de hidroxilação não é essencial, em contraste aos organismos eucarióticos superiores, em que eIF5A não é capaz de desempenhar sua atividade se o resíduo não for totalmente convertido a hipusina (PARK *et al.*, 2010).

Figura 4. Representação da conservação de eIF5A e suas enzimas modificadoras.



aIF5A: fator de tradução de arqueas. eIF5A: fator de tradução de eucariotos. DHPS: desoxi-hipusina sintase. DOHH: desoxi-hipusina hidroxilase. Figura adaptada de PARK *et al.*, 2010.

Como observado para eucariotos e arquea, não foi evidenciada a ocorrência dos componentes da via de formação da hipusina em eubactérias, as quais apresentam o fator de alongação P (EF-P) que é um homólogo distante de eIF5A (HANAWA-SUETSUGU *et al.*, 2004). Assim como eIF5A, EF-P estimula a síntese de metil-puromicina *in vitro* sugerindo uma similaridade tanto estrutural quanto funcional entre eIF5A e EF-P (PARK, 2006).

A investigação do fator eIF5A e das enzimas responsáveis pela reação de hipusinação está abrindo novas fronteiras na descoberta de compostos frente ao câncer e efeitos pró-inflamatórios mediados por eIF5A hipusinação

relacionados à diabetes (MAIER *et al.*, 2010), replicação viral (OLSEN; CONNOR, 2017) e doenças causadas por protozoários (ILARI *et al.*, 2015).

Em mamíferos, existem duas isoformas de eIF5A, eIF5A-1 e eIF5A-2, codificadas por dois genes diferentes, *EIF5A1* e *EIF5A2*, respectivamente (PARK *et al.*, 2010). eIF5A-1 e eIF5A-2 são 84% idênticas e 94% similares e ambas substituem eIF5A de *S. cerevisiae*, sugerindo uma grande conservação de sua função (CLEMENT *et al.*, 2003). *EIF5A1* é expresso predominantemente em todos os tecidos. Por outro lado, *EIF5A2* é expresso apenas em certos locais do cérebro e testículos e alguns tipos de linhagens celulares de câncer (PARK, 2006; CARAGLIA *et al.*, 2013). Níveis elevados de eIF5A-2 foram detectados em linhagens contendo ampliações do cromossomo 3q (onde reside *EIF5A2*), como em carcinoma de células escamosas do pulmão e em cânceres de ovário, esôfago, mama e próstata. Em tais células tumorais, o *knockdown* de *EIF5A2* geralmente prejudica o crescimento das células tumorais e seu potencial tumorigênico. Portanto, os estudos das funções específicas da eIF5A hipusinada e seu papel na tumorigênese sugerem que as vias de síntese de espermidina e hipusina são alvos de alta prioridade para a terapêutica contra o câncer (NAKANISHI e CLEVELAND, 2016). Em outro estudo, foi observado que a isoforma eIF5A-1 mostrou ser expressa ectopicamente em altos níveis em pacientes com câncer de ovário epitelial (EOC), estimulando a proliferação, migração e capacidade invasiva das células de EOC. O *knockdown* de *EIF5A1*, assim como o tratamento das células com o composto N1-guanil-1,7-diamino-heptano (GC7), inibidor da DHPS, suprimiram tais efeitos, colocando *EIF5A1* como um marcador de EOC e também como um alvo de terapias contra este câncer (ZHANG *et al.*, 2018). Da mesma forma, a superexpressão de *EIF5A1* também foi detectada em adenocarcinoma de pulmão, carcinoma colorretal, glioblastoma, adenocarcinoma do duto pancreático, câncer cervical e neoplasia vulvar intraepitelial (MATHEWS e HERSHEY, 2015). Por sua vez, a superexpressão de *EIF5A2* foi observada em câncer de ovário, carcinoma colorretal, câncer de bexiga, carcinoma hepatocelular, câncer de pulmão, de pâncreas, gástrico e carcinoma esofágico (MATHEWS e HERSHEY, 2015).

Outras investigações relacionam eIF5A hipusinada como fator importante na patogenicidade de doenças inflamatórias, como diabetes (MAIER *et al.*,

2010). O silenciamento de *EIF5A1*, bem como a inibição da hipusinação, reduziram a produção de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral α (TNF- α) (MOORE *et al.*, 2008; ALMEIDA *et al.*, 2014). Também foi observado que a tradução da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) é dependente da atividade de eIF5A hipusinada e que, por isso, a liberação de citocinas pode ser reduzida pelo controle de eIF5A, minimizando os efeitos inflamatórios sobre as células β do pâncreas (MAIER, OGIHARA, *et al.*, 2010). Assim, a inibição da hipusinação de eIF5A foi avaliada como possível alvo terapêutico contra a disfunção das células β pancreáticas, reduzindo a intolerância a glicose em modelo de inflamação e diabetes em camundongo (MAIER e OGIHARA *et al.*, 2010; MAIER e TERSEY *et al.*, 2010).

Outros estudos demonstraram que a inibição da hipusinação por Semapimod (também chamado de CNI-1493, inibidor de DHPS) ou por ciclopirox e deferiprona (inibidores da enzima DOHH) provocaram um forte efeito antirretroviral, eliminando o ciclo replicativo do vírus da imunodeficiência humana HIV-1 (HAUBER *et al.*, 2005; HOQUE *et al.*, 2009).

Além disso, dados da literatura também indicaram que a inibição das enzimas DHPS e DOHH controlou o crescimento dos parasitas da malária (KERSTING *et al.*, 2016).

1.2 Proliferação e compostos inibidores da enzima DHPS

As etapas da modificação pós-traducional de eIF5A, bem como as enzimas responsáveis por estas modificações são alvos de muitos estudos, pois representam uma estratégia muito importante na elucidação da função biológica de eIF5A na célula (MATHEWS e HERSHEY, 2015).

N¹-guanil-1,7-diamino-heptano (GC7), principal inibidor da enzima DHPS e análogo estrutural da poliamina espermidina, é capturado pelo sistema de transporte de poliaminas, causando inibição da hipusinação e, assim, apresentando efeitos antiproliferativos em células de mamíferos, incluindo linhagens tumorais (PARK *et al.*, 1994; SHI *et al.*, 1996).

A importância do composto GC7 na diminuição de agentes mediadores da inflamação (TNF- α e interleucina 6, IL-6), bem como no controle da proliferação celular já foi previamente demonstrada (ALMEIDA, 2015). No primeiro caso, as

células foram estimuladas com lipopolissacarídeos (LPS) para promover a produção de mediadores inflamatórios e, posteriormente, foram tratadas com GC7. Os resultados revelaram uma significativa redução nos níveis das citocinas TNF- α e IL-6 comparadas com as células sem tratamento. Na proliferação celular, o composto GC7 exerceu uma acentuada inibição no crescimento o qual foi evidenciado pela diminuição dos níveis de expressão dos genes envolvidos no processo de ciclo celular (ALMEIDA, 2015). Semelhante observação havia sido relatada pela utilização do composto GC7 em cultura de células de mamíferos, que levou à inibição da transição de G1/S no ciclo celular (HANAUKE-ABEL *et al.*, 1994; KANG e HERSHEY, 1994; PARK *et al.*, 1997) e induziu uma parada no início da tradução relacionada à fosforilação do fator de iniciação eucariótico 2 (eIF2) e da proteína ligante 1 do fator de início de tradução em eucariotos 4E (4E-BP1) (LANDAU *et al.*, 2010).

Em relação a linhagens de células tumorais, o uso do inibidor de DHPS, GC7, ou de DOHH, ciclopirox, exerceu efeito antiproliferativo ou reduziu a capacidade de migração e invasão e dessas células, regulando principalmente a isoforma eIF5A-2 (PREUKSCHAS *et al.*, 2012; MATHEWS e HERSHEY, 2015) Foi também demonstrado que a inibição de DHPS por GC7 atuou na resistência a medicamentos na leucemia linfoblástica aguda (ALL) quando combinado a vincristina, inibindo significativamente a viabilidade celular de duas linhagens celulares de ALL (LIU *et al.*, 2017).

Por outro lado, GC7 também está implicado na indução da autofagia das células, independentemente da atividade de eIF5A, o que implicaria no fato de que GC7 possa interferir com outros processos celulares. Esses resultados são importantes sabendo que o composto GC7 é considerado um potente inibidor da enzima DHPS e um candidato potencial para o tratamento do câncer (OLIVERIO *et al.*, 2014) e estão sendo analisados por outros estudos do nosso grupo.

Por tal motivo, a procura de novos inibidores que tenham comportamento seletivo para as enzimas responsáveis pela hipusinação (DHPS, DOHH) seria uma alternativa importante tanto para o estudo dessa modificação pós-traducional como também para o tratamento de quadros patológicos envolvendo a superexpressão de eIF5A. Semelhante estudo apresentou o Semapimod como promissor supressor da replicação do HIV por inibir a enzima

DHPS, possivelmente evitando a ativação do fator celular eIF5A de forma seletiva e, portanto, evitando efeitos adversos sobre outros componentes celulares (SCHRÖDER *et al.*, 2016).

A obtenção do cristal do complexo ternário DHPS-NAD-GC7 contribuiu para o entendimento da estrutura de possíveis inibidores da enzima, pois demonstrou a importância do grupo guanidínico na interação com o sítio ativo de DHPS, posicionado ao fundo do sítio catalítico (UMLAND *et al.*, 2004).

Compostos contendo na sua estrutura o grupo guanidina, são utilizados na química orgânica principalmente como bases neutras que possuem a característica de deslocar a carga positiva por meio de seus átomos de nitrogênio (COELHO *et al.*, 2008; ISHIKAWA, 2009; TAYLOR *et al.*, 2012). Na área de biologia, já foram utilizados como agentes anti-inflamatórios (MIYAMOTO *et al.*, 1985; OKUMURA *et al.*, 1990) antidiabéticos (MURAMATSU *et al.*, 1983), antibactericidas e antifúngicos (COQUEIRO *et al.*, 2014).

O núcleo guanidínico confere a habilidade de ligação com grupamentos carregados negativamente (fosfatos e carboxilatos) sendo que suas ligações iônicas entre os átomos de nitrogênio e os de oxigênio podem se formar simultaneamente (HIRSCH, 1984).

Observando a importância do grupamento guanidínico, em trabalhos anteriores foram sintetizados compostos contendo este grupamento ligado a substituintes benzila, ciclohexila ou butila e estes foram avaliados *in vitro* quanto à inibição da DHPS. Os estudos realizados mostraram que os compostos guanidínicos possuindo em sua estrutura o grupo benzila foram melhores inibidores da atividade da enzima e, portanto, seriam protótipos para o desenvolvimento de novos compostos (SANTO, 2013; SANTO *et al.*, 2013).

Desta forma, a avaliação de compostos derivados de grupos guanidínicos é promissora na busca de potenciais novos inibidores de DHPS, a primeira enzima envolvida na síntese de hipusina em eIF5A bem como que apresentem maior seletividade atuação na enzima do que GC7.

1.3 Doenças causadas por fungos e procura por novos tratamentos

Os fungos são seres eucarióticos e constituem um amplo grupo de microrganismos sendo que algumas espécies podem causar doenças conhecidas como micoses, que podem ser classificadas clinicamente de acordo com os tecidos e órgãos afetados: superficiais ou cutâneas quando limitadas à epiderme, subcutâneas quando a infecção penetra na pele e sistêmicas ou invasivas quando a infecção é profunda ou disseminada a órgãos internos (ARMANI, 2016).

Embora as infecções superficiais sejam comuns e, em geral, fáceis de curar, as infecções invasivas têm uma taxa de incidência menor. Entretanto, causam doenças que ameaçam a vida, particularmente em pacientes imunocomprometidos, com doenças autoimunes ou transplantados (CASSETTARI, 2014).

Dentre os principais patógenos fúngicos humanos encontram-se as leveduras *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* e o fungo filamentoso *Aspergillus fumigatus* (COLOMBO *et al.*, 2013; BENADUCCI *et al.*, 2016; GIACOMAZZI *et al.*, 2016). Estes microrganismos matam cerca de um milhão e meio de pessoas todos os anos e a falta de agentes antifúngicos mais seguros e eficazes limita o bom desenvolvimento das terapias contra as micoses, principalmente em pacientes imunocomprometidos (BROWN *et al.*, 2012).

As espécies de *Candida* fazem parte da microbiota de indivíduos saudáveis, mas quando ocorre um desequilíbrio na microbiota ou o sistema imune encontra-se comprometido, essas leveduras podem se tornar patogênicas (MONGE *et al.*, 2006). Estas espécies causam uma infecção nas mucosas denominada candidíase, enquanto que a forma invasiva da doença é denominada de candidemia (BARBEDO *et al.*, 2010). A candidíase vulvovaginal é uma das doenças fúngicas mais comuns do trato genital feminino e a principal espécie envolvida é *C. albicans*, responsável por 85 a 90% dos casos, seguida por *C. parapsilopsis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (BOATTO *et al.*, 2015).

No Brasil, são frequentes os casos de candidemia principalmente por *C.*

albicans, seguida de *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*, enquanto que casos de infecção por *Candida krusei* e *Candida guilliermondii* são menos recorrentes (COLOMBO, 2000; HINRICHSEN *et al.*, 2009; SAVASTANO *et al.*, 2016). Por se tratar de uma infecção oportunista, é preocupante a identificação do patógeno em aparatos médico-hospitalares, no pessoal de saúde e em diferentes partes do corpo dos pacientes, usualmente imunocomprometidos devido a outras doenças ou pela idade ou por transplantes (HINRICHSEN *et al.*, 2009; SAVASTANO *et al.*, 2016). Os casos de resistência vêm aumentando e espécies não-*albicans* mostraram-se menos susceptíveis a itraconazol e miconazol, enquanto que *C. glabrata* e *C. krusei* são naturalmente resistentes a fluconazol e o aumento do número de infecções por estas espécies também é um fator preocupante (COLOMBO, 2000; SAVASTANO *et al.*, 2016).

Cryptococcus neoformans é também um fungo leveduriforme, mas que diferentemente de *Candida* spp, é envolto em uma cápsula de polissacarídeos e produz melanina e urease, tidos como fatores de virulência (KWON-CHUNG *et al.*, 1982; KWON-CHUNG *et al.*, 2014). Assim como a candidíase, a criptococose é uma doença distribuída por todo o mundo, atingindo, principalmente, os indivíduos imunossuprimidos, embora indivíduos aparentemente saudáveis também se apresentaram infectados por *Cryptococcus* (SAIJO *et al.*, 2014; PANACKAL *et al.*, 2015). As células de *Cryptococcus* são inaladas e nos pulmões ocorre a ativação do sistema imune que consegue eliminar o patógeno. Em pessoas imunocomprometidas, as células proliferam podendo alcançar o cérebro e causar meningocéfalite (KWON-CHUNG *et al.*, 2014; PANACKAL *et al.*, 2015). *Cryptococcus gattii* é também um agente causador da criptococose, causando principalmente infecção pulmonar (GALANIS *et al.*, 2010; KWON-CHUNG *et al.*, 2014; PANACKAL *et al.*, 2015) e também foram reportados estudos de infecções na pele podendo apresentar lesões cutâneas secundárias à disseminação hematogênica sistêmica ou primária. A apresentação clínica das lesões cutâneas pode ser variada, não havendo, portanto, lesões típicas dessa infecção (DU *et al.*, 2015; MCKINNEY *et al.*, 2015).

No Brasil, a criptococose foi identificada como a micose mais fatal em pacientes com AIDS (ALBUQUERQUE e RODRIGUES, 2012; AGUIAR *et al.*, 2017).

Para o tratamento da criptococose, podem ser empregadas três classes de fármacos: os polienos (anfotericina B), os azóis e o análogo de pirimidina, 5-fluorocitosina. Dentre estes, emprega-se principalmente o fluconazol e, em pacientes com AIDS, uma dose de manutenção deve ser administrada a fim de evitar a recorrência da doença. Contudo, vem sendo cada vez maior o número de isolados clínicos resistentes, inclusive com resistência intrínseca, o que impede a busca por novos agentes contra estas espécies (CHEONG e MCCORMACK, 2013; KWON-CHUNG *et al.*, 2014; AGUIAR *et al.*, 2017).

Outra doença sistêmica fúngica que abrange toda a América Latina é a paracoccidioidomicose (PCM), causada na maioria das vezes pelo fungo *Paracoccidioides brasilienses*, embora a espécie *Paracoccidioides lutzii* também tenha sido isolada (MARTINEZ, 2017). O fungo vive saprofiticamente no solo, sendo o ser humano um hospedeiro acidental (MARTINEZ, 2017). PCM é uma enfermidade sistêmica que envolve primeiramente o pulmão, sem sintomas específicos e, pode ser controlada pelo sistema imune, deixando focos de células latentes do fungo. Contudo, a forma crônica da doença pode se manifestar anos depois, podendo se disseminar a outros órgãos e sistemas como as mucosas, nódulos linfáticos, pele e suprarrenais (EYER-SILVA *et al.*, 2017; MARTINEZ, 2017). A maioria dos casos de PCM (cerca de 80%) são relatados no Brasil e a doença possui uma alta taxa de letalidade (DE SOUZA *et al.*, 2014; VIEIRA *et al.*, 2014).

A taxa de desenvolvimento da doença é mais pronunciada em pessoas imunocomprometidas. Azóis, anfotericina B e sulfadiazina são fármacos de escolha para o tratamento, mas deve-se levar em consideração as disfunções de absorção, renal e hepática associadas à doença para a correta escolha terapêutica. Em casos de reincidência, o mesmo fármaco não deve ser administrado visto o desenvolvimento de formas resistentes do fungo. O tratamento é longo e com alto número de doses diárias, o que dificulta a aceitação do paciente (MENDES *et al.*, 2017). Devido a esses fatos, novos compostos ativos contra *P. brasiliensis* podem auxiliar no sucesso das terapias.

Assim, ainda são limitadas as opções disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas, dadas as semelhanças entre estas células e as de mamífero, sendo que os agentes antifúngicos disponíveis clinicamente apresentam várias desvantagens, tais como potência e espectro limitados, alta

toxicidade, tempo de tratamento e crescente número de isolados com resistência (BONGOMIN *et al.*, 2018; LYSKOVA *et al.*, 2018).

O fator eIF5A hipusinado e, por sua vez, a presença da enzima DHPS também são essenciais em fungos (PARK *et al.*, 1998; MARTINEZ-ROCHA *et al.*, 2016), sendo que DHPS foi purificada de leveduras como *S. cerevisiae* (KANG *et al.*, 1995), *Neurospora crassa* (TAO e CHEN, 1995) e *S. carlsbergensis* (ABID *et al.*, 1997) e do fungo filamentoso *Fusarium graminearum* (WORIEDH *et al.*, 2011). Embora existam poucos dados sobre a função ou a inibição de DHPS em fungos patogênicos, recentemente foi demonstrado que a superexpressão desta enzima está intimamente correlacionada com a virulência do fungo fitopatogênico *F. graminearum* sobre cereais como o trigo (WORIEDH *et al.*, 2011; MARTINEZ-ROCHA *et al.*, 2016). Tal superexpressão estimulou a formação de conídios e de micotoxina e aumentou a velocidade de infecção no tecido vegetal (MARTINEZ-ROCHA *et al.*, 2016). Por outro lado, a incubação do fungo na presença de Semapimod inibiu a germinação e, por ensaio *in vitro*, o composto inibiu a atividade enzimática de DHPS de forma dose-dependente (WORIEDH *et al.*, 2011).

Desta forma, os compostos guanidínicos podem ser também promissores agentes antifúngicos devido à inibição da enzima DHPS e consequente redução da hipusinação de eIF5A. Assim, os diferentes derivados guanidínicos testados neste trabalho, após análise do seu potencial de inibição sobre DHPS, foram ensaiados frente a diferentes espécies de leveduras, a fim de avaliar sua aplicação terapêutica como inibidores destes patógenos.

2. OBJETIVOS

O objetivo desse trabalho consistiu na análise de novos compostos guanidínicos candidatos a inibidores da enzima desoxi-hipusina sintase por meio da avaliação de atividade direta sobre a enzima, como agentes antiproliferativos ou inibidores do crescimento fúngico.

Para tanto, foram realizadas as seguintes etapas:

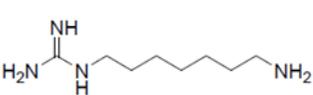
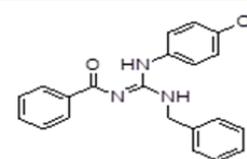
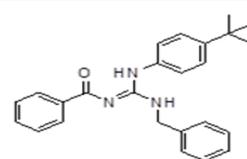
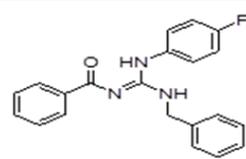
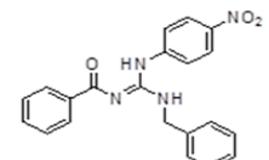
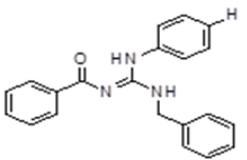
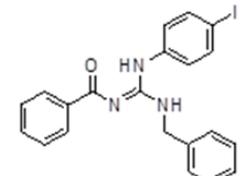
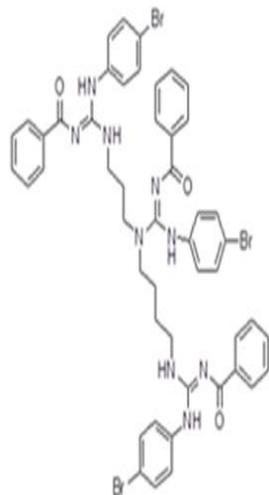
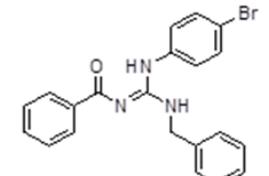
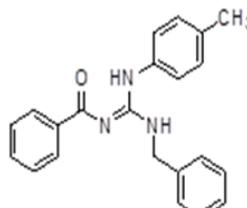
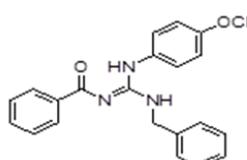
- Avaliar os efeitos citotóxicos dos compostos guanidínicos em células da linhagem de macrófago RAW 264.7.
- Avaliar o efeito antiproliferativo dos compostos sobre as células de macrófago.
- Determinar a potência de inibição direta dos novos compostos sobre a enzima DHPS por ensaio *in vitro*.
- Avaliar a susceptibilidade de fungos patogênicos frente aos compostos guanidínicos e determinação da concentração inibitória e fungicida mínima (CIM e CFM).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Compostos guanidínicos testados

Os compostos testados foram o GC7 e compostos guanidínicos cedidos pelo Prof. Dr. Eduardo René Perez Gonzalez, do Laboratório de Química Orgânica Fina da Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Campus de Presidente Prudente e sua estrutura está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Compostos guanidínicos testados neste trabalho.

Composto*	Estrutura	Composto*	Estrutura	Composto*	Estrutura	Composto*	Estrutura
GC7		LQOF-G3 (GCIBz)		LQOF-G6 (GtBuBz)		LQOF-G9 (GFBz)	
LQOF-G1 (GNO ₂ Bz)		LQOF-G4 (GAnBz)		LQOF-G7 (GIBz)		TrisBr Esp	
LQOF-G2 (GBrBz)		LQOF-G5 (GTolBz)		LQOF-G8 (GMetBz)			

* A exceção de GC7, os demais compostos guanidínicos foram identificados de acordo com o laboratório de origem, assim LQOF-G# significa Laboratório de Química Orgânica Fina-composto guanidínico e o número da série. Para facilitar o reconhecimento, neste trabalho, os compostos foram identificados pelos grupos substituintes. Por isso, GXBz significa grupamento Guanidínico ligado a um grupo benzila (Bz) e a uma fenila substituída por um dos diferentes grupos (X): nitrato (NO₂), bromo (Br), cloro (Cl), iodo (I), flúor (F), sem substituição (An), metila (Met), *terc*-butila (tBu) e tolueno (Tol). TrisBrEsp foi a identificação dada ao composto derivado da espermidina (Esp) contendo a fenila substituída por três bromos.

3.2 Cultura de células de mamífero

Foram utilizadas células com morfologia monócito/macrófago da linhagem RAW 264.7 (*American Type Culture Collection*, ATCC TIB-71), derivada do tumor Abelson de leucemia murina induzida por vírus, a partir de ascite de camundongos Balb/c, cedidas pelo Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ-0212).

As células foram armazenadas em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Gibco-Life Technologies) contendo 10% de dimetilsulfóxido (DMSO; LabSynth), a -80 °C. Para a realização dos ensaios, as células foram descongeladas e pipetadas em frasco de cultura celular em meio DMEM contendo 10% soro fetal bovino (SBF; Sigma-Aldrich) e uma solução a 1% contendo uma mistura de antibióticos (10.000 unidades penicilina, 10 mg de estreptomicina e 25 µg de anfotericina B por mL; Sigma-Aldrich) à temperatura de 37 °C, em incubadora umidificada contendo 5% de CO₂, conforme orientações do ATCC. Depois de formadas monocamadas, as células foram coletadas por deslocamento mecânico utilizando espalhador de células (300 mm com lâmina de 20 mm; TPP).

3.3 Avaliação da atividade citotóxica em células RAW 264.7

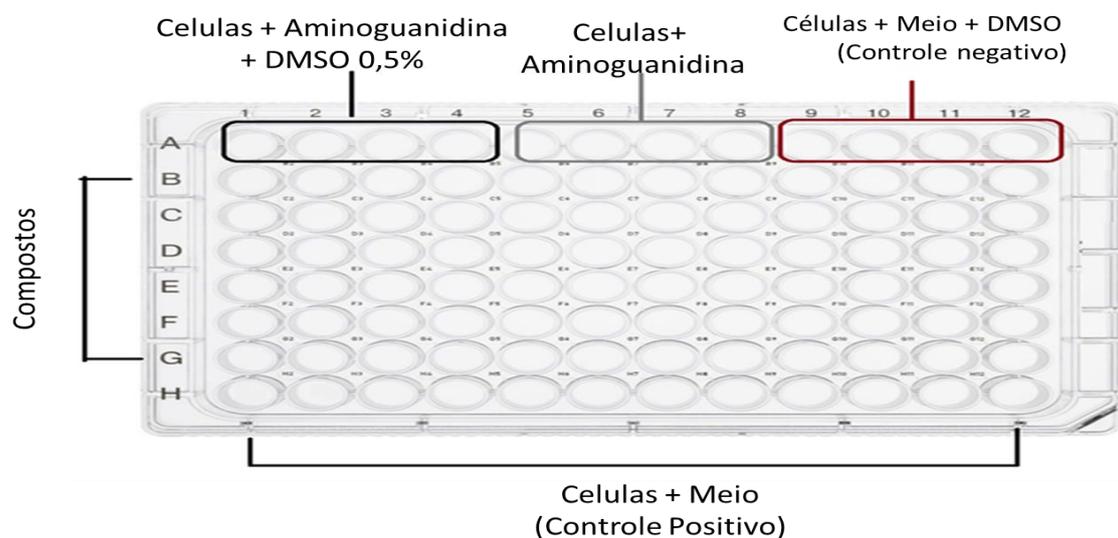
Os compostos guanidínicos foram previamente dissolvidos em DMSO em concentração estoque de 0,1 M e as soluções foram esterilizadas por filtração em membrana de nylon de 0,22 µm para a utilização experimental. Ao final, os compostos foram diluídos de tal forma que a concentração de DMSO durante o teste foi de 0,5%.

Para avaliar a atividade citotóxica, foi utilizado o método colorimétrico com brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT; Sigma-Aldrich). Primeiramente, 5x10⁴ células por poço da linhagem RAW 264.7 foram incubadas até uma confluência de 70%. As células foram testadas frente a diferentes concentrações dos compostos (62,5, 125, 250, 500 e 1000 µM), em meio DMEM contendo 1 mM de aminoguanidina (inibidor de amino-oxidases, para evitar a possível degradação dos compostos) (Sigma-Aldrich), por 24 h, em placas de cultivo celular de 96 poços, na incubadora umidificada, com 5% de CO₂, a 37 °C.

Após o período de incubação, o sobrenadante foi removido e 10 µL de solução de MTT na concentração de 5 mg/mL foram adicionados aos poços e as placas foram mantidas por mais 4 h nas mesmas condições. Após este período, foram acrescentados 100 µL de DMSO e as placas de cultivo celular foram mantidas por uma noite à temperatura ambiente, sob abrigo da luz. A avaliação da viabilidade celular foi medida em espectrofotômetro Infinite® M200 Pro (Tecan) utilizando filtro de interferência de 595 nm (MOSMANN, 1983).

Dando continuidade à avaliação da atividade citotóxica, concentrações menores dos compostos (50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 e 1,5625 µM) foram testadas na presença e ausência de 1 mM de aminoguanidina, frente a uma confluência de 70% a partir de 5×10^4 células por poço, por maior tempo de incubação (72 h) em placas de 96 poços, trocando o meio e os compostos cada 24 h nas mesmas condições. Após o período de tratamento, realizou-se o procedimento descrito anteriormente para medida da viabilidade celular. Em todas as microplacas, foram mantidos poços de controle positivo do crescimento celular e poços de controle negativo como representado na Figura 5.

Figura 5. Representação da distribuição das amostras para o teste de citotoxicidade.



Foi realizado o branco sem adição de células, mas contendo os compostos guanidínicos (colunas 4,8 e 12).

A avaliação da viabilidade foi realizada em triplicata e o cálculo da porcentagem foi realizado da seguinte forma:

$$\%viabilidade\ celular = 100 \cdot \left(\frac{\text{média do valor de colorimetria com o composto teste} - \text{média colorimetria do branco}}{\text{média colorimetria do controle positivo}} \right)$$

As concentrações dos compostos que proporcionaram 50% (CC₅₀) e 85% (CC₁₅) de citotoxicidade foram determinados por regressão linear para cada composto a partir dos dados de absorbância obtidos. A análise de variância (ANOVA) foi realizada considerando $p \leq 0,05$ como estatisticamente significativo e o teste de Tukey foi utilizado para avaliar a diferença estatística entre as diferentes amostras.

Por outro lado, também foi testada a citotoxicidade do composto anfotericina B (Sigma-Aldrich) sobre a linhagem RAW 264.7, para posteriormente calcular o índice de seletividade (IS) baseado nestes resultados e no teste de sensibilidade dos fungos patogênicos frente a os compostos. As células RAW 264.7 foram testadas frente a diferentes concentrações do composto anfotericina B de 0,03 até 69,25 μM , em meio DMEM por 24 h, em placas de cultivo celular de 96 poços, na incubadora umidificada, com 5% de CO₂, a 37 °C e o resultado de citotoxicidade foi analisado da mesma forma como descrito acima.

3.4 Ensaio de proliferação das células RAW 264.7

Foi utilizado o ensaio de proliferação com o corante carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE; Life Technologies) em colaboração com o Laboratório de Imunologia sob supervisão da Profa. Dra. Alexandra Ivo de Medeiros e do Laboratório de Imunologia Clínica e Biologia Molecular do Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa. O teste foi realizado a partir de 1×10^7 de células RAW 264.7 plaqueadas, as quais foram incubadas por 2 h para adesão na garrafa de cultura e, então, marcadas com 2 μM de CFSE (solução estoque de 5 mM diluída em tampão fosfato-salino, PBS) por 15 min. Em seguida, as células foram coletadas da garrafa de cultura por raspagem, contadas e 1×10^5 células foram distribuídas por poço em placas de 6 poços. As células foram então tratadas com diferentes

concentrações dos compostos (6,25 e 12,50 μM) em meio contendo 1 mM de aminoguanidina com incubação por 72 h.

Após a incubação, as células foram coletadas, lavadas com PBS e fixadas com solução de 4% de formaldeído por 15 min a 4 °C. Após a fixação, as células foram lavadas novamente com PBS e analisadas no citômetro de fluxo (FACS Verse, BD Biosciences), com excitação no comprimento de onda de 488 nm e filtros de emissão para fluoresceína.

3.5 Ensaios bioquímicos com a enzima DHPS

A atividade enzimática foi monitorada através de ensaio espectrofluorimétrico, em que se detecta a intensidade de fluorescência do dinucleotídeo nicotinamida adenina reduzido (NADH). O experimento ocorreu em duas etapas: triagem dos compostos com potencial atividade inibitória de DHPS e variação das concentrações dos compostos que apresentaram atividade. A enzima DHPS humana isoforma a, número de acesso do Genbank NP_001921.1, foi produzida previamente a partir de expressão da sua sequência clonada no plasmídeo pET24b-DHPS transformando na linhagem de *Escherichia coli* BL21 co-expressando o complexo de chaperonas groES-groEL (pG-KJE8 – Taraka Bio). A purificação da enzima foi realizada por cromatografia por afinidade e de troca iônica (SILVA, 2015).

Antes de iniciar a triagem, a fluorescência intrínseca dos compostos nos comprimentos de onda utilizados no experimento foi avaliada. Para tanto, os compostos foram dissolvidos em DMSO e diluídos em tampão 0,2 M glicina/NaOH pH 9,2, na maior concentração utilizada para o teste (500 μM), em triplicata, em placas de 96 poços opacas de poliestireno. A capacidade dos compostos de reduzir NAD^+ a NADH também foi avaliada adicionando NAD^+ (19 μM) ao meio tamponado.

Posteriormente, a triagem dos compostos candidatos a inibidores de DHPS foi realizada em concentração de 500 μM em meio reacional formado por tampão 0,2 M glicina/NaOH pH 9,2, espermidina (17 μM), NAD^+ (19 μM), DHPS (3,6 μM) e água deionizada com volume final de 100 μL . O meio reacional foi incubado por 36 minutos a 23 °C. O controle negativo utilizado foi a mistura

reacional possuindo DMSO 10% e o controle positivo foi o inibidor, descrito na literatura, GC7, ($IC_{50} = 17 \text{ nM}$ e $K_i = 9,7 \text{ nM}$) (KAISER *et al.*, 2007).

Foi utilizado o espectrofluorímetro Infinite[®] M200 Pro (Tecan) com excitação por luz ultravioleta no comprimento de onda de 355 nm e detecção da fluorescência emitida em 445 nm. A metodologia utilizada foi adaptada (WOLF *et al.*, 2000) e a medida indica unidades relativas de fluorescência (RFU).

A intensidade da geração de NADH na reação envolvendo DHPS foi mensurada durante 5 horas, com intervalos de 5 minutos entre os ciclos cinéticos. Os valores de unidades relativas de fluorescência do NADH formado foram normalizados em relação ao branco contendo o meio reacional sem a adição de NAD.

O potencial de inibição dos compostos testados foi determinado pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = (1 - V_1/V_2) \times 100$$

Em que V_1 e V_2 correspondem às velocidades iniciais na presença e na ausência do inibidor, respectivamente.

Apenas os compostos que apresentaram porcentagem de inibição maior que 30% passaram para a etapa de variação das concentrações (50 μM até 500 μM) a fim de se calcular a concentração do composto com a capacidade de redução de 50% da atividade enzimática (IC_{50}), que foi determinado pelo módulo cinética do programa *GraphPad Prism*.

As condições de reação durante a variação de concentração dos inibidores foram as mesmas utilizados durante a triagem.

3.6 Testes de sensibilidade dos compostos frente a fungos patogênicos.

3.6.1. Microrganismos utilizados

Para os ensaios de atividade antimicrobiana foram utilizados fungos patogênicos adquiridos do *American Type Culture Collection* (ATCC), sendo eles: *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida parapsilosis* ATCC 22109, *Cryptococcus neoformans* ATCC 90112 e *Cryptococcus gattii* ATCC 56990. As

linhagens de *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18) e *Paracoccidioides lutzii* (Pb01), por sua vez, foram obtidas de isolados clínicos.

O microrganismo *Paracoccidioides* spp. tem um armazenamento de curto prazo em ágar *Saboraud* a temperatura de 2-8°C, sendo repicado a cada duas semanas. As espécies de *Candida* e *Cryptococcus* foram mantidas em ágar batata-dextrose e congeladas a -70°C até o momento de reativação para execução do ensaio antifúngico.

3.6.2. Avaliação da sensibilidade de fungos patogênicos aos compostos guanidínicos pela técnica de microdiluição

Os testes de sensibilidade foram realizados de acordo com o documento M27-A3, proposto pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008), com pequenas modificações. Os compostos e a aminoguanidina foram diluídos assepticamente em meio RPMI-1640, com *L*-glutamina, sem bicarbonato de sódio e com 2% de glicose (Gibco, BD biosciences), de modo a obter concentrações finais nas placas de microdiluição de 0,02 a 10 mM para o GC7 e 0,01 a 5 mM para os demais compostos. O composto anfotericina B (Sigma-Aldrich) também foi utilizado como controle positivo da inibição do crescimento celular, e foi testado no intervalo de concentrações de 0,03 a 16 mg/L (equivalente a concentrações de 0,0325 a 17,3145 µM).

Para a preparação das suspensões fúngicas, os microrganismos foram subcultivados em ágar Sabouraud dextrose e incubadas por 24 h (*Candida* spp.) e 48 h (*Cryptococcus* spp.) a 35 °C. Para a preparação das suspensões de *P. brasiliensis* isolado 18 e *P. lutzii* isolado 01, foi seguido o protocolo descrito por Paula e Silva *et al.*, (2013) com algumas modificações. Os fungos foram subcultivados em caldo *brain heart infusion* (BHI) e incubados à temperatura de 37 °C, com agitação de 150 rpm por 72 h. As células foram centrifugadas e lavadas com solução salina estéril para a remoção do meio de cultura remanescente. Após as lavagens, as células leveduriformes foram suspensas em 5 mL de salina e o número de células viáveis foi estimado por contagem em hematócrito com coloração de azul de tripano. Os inóculos foram ajustados de modo a atingir uma concentração de 5x10⁶ células/mL para *Paracoccidioides* spp. e 1x10⁶ células/mL para os demais fungos. As suspensões celulares foram

preparadas fazendo-se uma diluição de 1:50, seguida por 1:20 em meio RPMI, para todos os fungos aqui testados, de modo a obter uma concentração final na placa de microdiluição de 5×10^4 células/mL. As suspensões finais foram colocadas em contato com as diluições do fármaco e dos compostos nas placas de microdiluição, juntamente com seus respectivos controles (esterilidade do meio e controle de crescimento fúngico) e incubadas de 35-37 °C a 150 rpm.

A cada poço das placas de microdiluição foram adicionados 30 µL de Alamar Blue após 24 h de incubação para *Candida* spp. e 48 h para *Cryptococcus* spp. e *Paracoccidioides* spp. Após a adição do revelador, as placas foram submetidas a uma incubação final por mais 24 h, totalizando 48 h de incubação para *Candida* spp. e 72 h para *Cryptococcus* spp. e *Paracoccidioides* spp. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada como a menor concentração do fármaco e do composto em que não houve mudança na cor azul original do reagente. Os testes foram realizados em duplicata.

3.6.3 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

A determinação da concentração fungicida mínima foi realizada conforme descrito previamente (SOARES *et al.*, 2014; COSTA-ORLANDI, 2016). Placas de Petri contendo ágar Sabouraud Dextrose (Difco, BD biosciences) foram previamente demarcadas de acordo com as posições das diluições dos compostos e controles positivos na placa de 96 poços. Uma alíquota do conteúdo dos poços foi transferida para o respectivo local na placa de Petri com o auxílio de um palito de madeira estéril e as placas foram incubadas a 35 °C por 48 h para *Candida* spp. e 72 h para *Cryptococcus* spp. A concentração fungicida mínima é definida como a menor concentração do composto e do fármaco onde não ocorre o crescimento de colônias. No caso das espécies de *Paracoccidioides*, esse teste não é recomendado, uma vez que exigiria um tempo de incubação muito longo, resultando em ressecamento do meio de cultura e, por consequência, um resultado inconclusivo. Sendo assim, com a revelação com Alamar Blue, os valores de CIM poderiam ser considerados equivalentes aos de CFM, por tratar-se de um método sensível para a verificação da viabilidade de células fúngicas (PAULA E SILVA *et al.*, 2013).

3.6.4 Cálculo do Índice de seletividade dos compostos guanidínicos

A partir da análise da viabilidade em células RAW 264.7 e dos testes de sensibilidade dos fungos aos compostos testados, foi possível calcular o índice de seletividade (IS), que é determinado pela razão dos valores de CC_{50} pela concentração inibitória mínima (CIM) (SOARES *et al.*, 2014; COSTA-ORLANDI, 2016). Quanto maior esta razão, mais seletivo é o composto sobre o microrganismo patogênico e, conseqüentemente, menor efeito ela tem sobre a célula hospedeira de mamífero. Para que um composto possa ser considerado como modelo de um novo fármaco, o ideal é que seu índice de seletividade seja maior ou igual a 10 (SILVA *et al.*, 2010; SANTO, 2017).

3.6.5 Alinhamento múltiplo entre as isoformas da enzima DHPS

As sequências proteicas das isoformas da enzima DHPS para cada espécie dos fungos patogênicos em estudo e da isoforma a de humano foram obtidas utilizando o banco de dados *GenBank* (número de acesso descrito na Tabela 9). O alinhamento múltiplo foi realizado utilizando a ferramenta *Clustal Omega* (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Compostos com núcleos guanidínicos e avaliação da citotoxicidade

O composto GC7 apresenta na sua estrutura um grupo guanidínico, o qual, com a estrutura cristalográfica da enzima DHPS, apresentou uma forte interação com o sítio catalítico da enzima, como ilustrado pela Figura 6 (UMLAND *et al.*, 2004).

Figura 6: Posicionamento do composto GC7 no sítio ativo de um dos monômeros de DHPS.

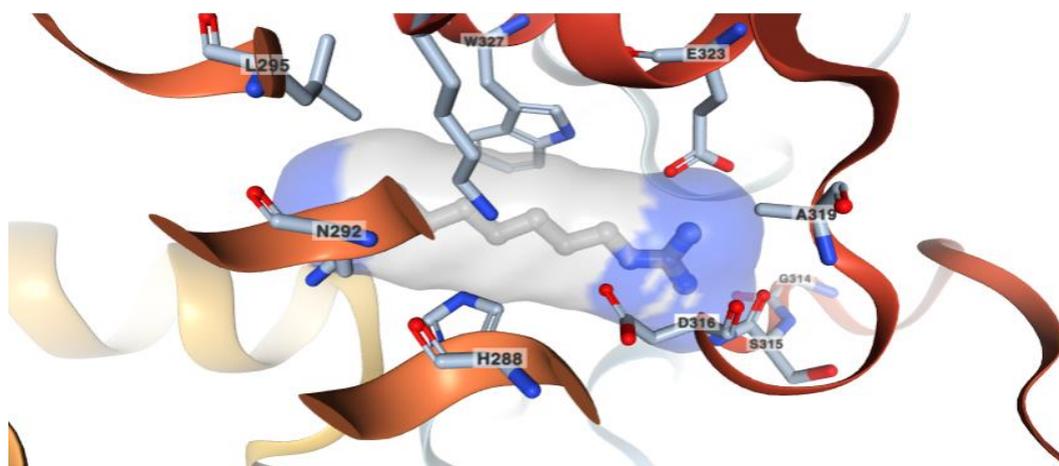


Imagem obtida em zoom a partir do cristal 1RQD da holoenzima DHPS:NAD:GC7.

Conhecendo a importância do grupamento guanidínico e que a estrutura do composto apresentando o grupo benzila parece melhorar a inibição da enzima DHPS (SANTO *et al.*, 2013), neste trabalho, os compostos avaliados apresentaram uma estrutura geral com um núcleo guanidínico ligado a um grupamento benzoíla, um benzil e um fenil com ou sem substituição em *para* (Tabela 1). Estes compostos foram sintetizados previamente no laboratório de Química Orgânica Fina pelo grupo do Prof. Dr. Eduardo René Perez Gonzalez (SANTO, 2017).

Neste trabalho, primeiramente, foi avaliada a citotoxicidade dos compostos a fim de se avaliar, posteriormente, a atividade antiproliferativa, inibitória de DHPS e antifúngica destes compostos. Para isso, foi utilizado o método colorimétrico com o corante vital MTT, em que as células vivas são distinguidas

das células mortas pela redução dos sais de tetrazólio a formazana pelo sistema citocromo mitocondrial e a cor resultante é uma medida direta da viabilidade celular.

A princípio, foi realizado um rastreamento utilizando altas concentrações dos compostos, com tratamento de 24 h, para avaliar a viabilidade das células de macrófagos da linhagem RAW 264.7 e determinar a concentração citotóxica dos compostos para 50% das células (CC₅₀) (Tabela 2).

Tabela 2. Viabilidade celular de RAW 264.7 frente aos compostos com núcleo guanidínico e CC₅₀ calculada.

Compostos	1000 µM	500 µM	250 µM	125 µM	62,5 µM	CC ₅₀
GC7	38,42 ±2,52	61,99 ±1,53	69,84 ± 1,62	75,34 ±1,60	79,50 ± 0,12	740,99
GNO ₂ Bz	34,18 ±4,02	50,72 ± 1,47	65,52 ± 0,82	77,83 ±0,53	79,52 ± 1,30	621,70
GBrBz	30,84 ±1,18	52,55 ± 1,88	60,16 ± 1,40	69,25 ±1,36	77,78 ± 2,12	563,00
GCIBz	15,22 ±0,75	35,11 ± 0,39	46,76 ± 0,59	54,80 ±0,91	62,87 ± 1,13	241,24
GAnBz	28,19 ±4,06	31,90 ± 1,39	36,47 ± 1,60	63,70 ±0,92	70,79 ± 1,63	398,91
GtolBz	35,79 ±3,48	48,63 ± 0,90	52,67 ± 1,08	66,59 ±1,75	71,96 ± 0,68	532,02
GtBuBz	27,91 ±2,02	59,29 ± 1,03	68,32 ± 0,84	72,02 ±0,84	77,51 ± 1,32	603,21
GIBz	49,71 ±3,67	69,33 ± 0,49	72,73 ± 1,84	75,87 ±2,67	76,05 ± 1,46	>1000
GMetBz	58,60 ±2,81	60,96 ± 1,42	63,62 ± 1,78	71,52 ±1,72	76,74 ± 3,27	>1000
GFBz	45,66 ±3,11	65,99 ± 0,90	74,55 ± 1,03	81,68 ±1,12	82,71 ± 1,90	891,48
TrisBrEsp	24,73 ±1,31	32,43 ± 1,70	48,69 ± 1,50	53,59 ±0,81	68,75 ± 1,22	246,21

Valores de viabilidade das células foi apresentado como % ± desvio padrão para as diferentes concentrações de compostos testadas por um período de 24 h.

CC₅₀ = Concentração citotóxica dos compostos sobre 50% das células.

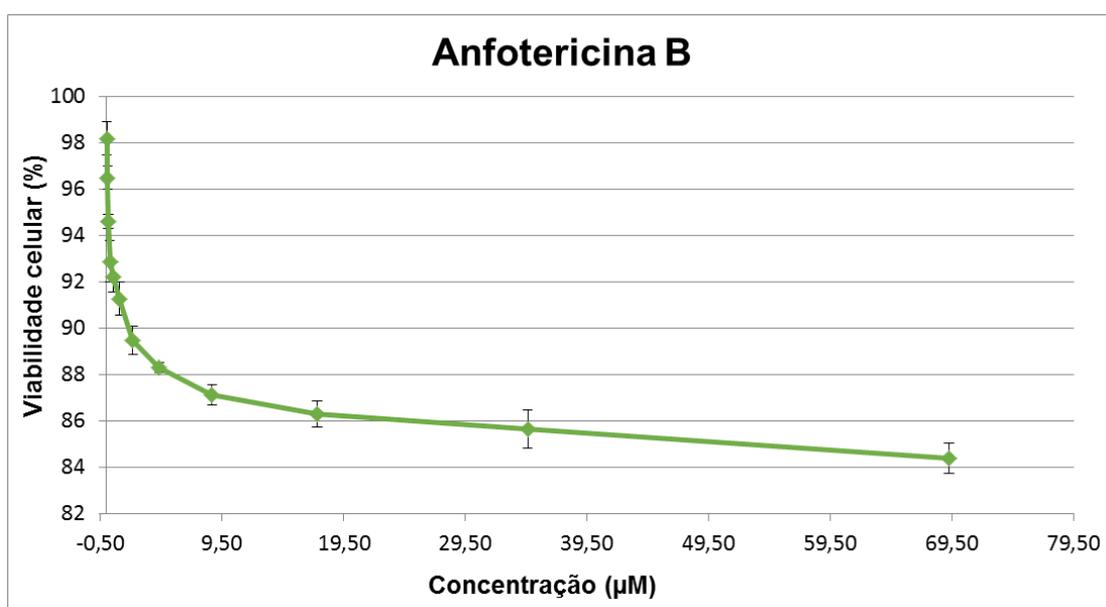
Os dados mostraram que o composto GC7 é pouco citotóxico para esta linhagem durante o período de tratamento, com CC₅₀ maior que 500 µM.

Dentre os resultados obtidos para os demais compostos, pôde-se observar que os compostos significativamente (p<0,05) mais citotóxicos, em ordem decrescente, foram GCIBz>TrisBrEsp>GAnBz, em que a CC₅₀ foi de 241,24 µM, 246,21 µM e 398,91 µM, respectivamente. Em comum, os compostos GCIBz e GAnBz apresentam grupos pequenos substituindo a posição *para* da fenila, embora o mesmo não se aplique ao composto TrisBrEsp.

Os demais compostos mostraram ser tolerados por esta linhagem, comparados com o composto GC7, apresentando valores de CC_{50} maiores que 500 μM .

Uma vez que neste trabalho também analisamos a atividade antifúngica dos compostos, foi também testada anfotericina B quanto à citotoxicidade para a linhagem RAW 264.7, a fim de determinar seu índice de seletividade. O composto anfotericina B permitiu uma viabilidade acima de 70% na maior concentração testada que foi de 69,25 μM (Figura 7).

Figura 7. Viabilidade celular de RAW 264.7 frente à anfotericina B.



A viabilidade celular de RAW 264.7 foi determinada como $\% \pm$ desvio padrão para as diferentes concentrações de compostos testadas por um período de 24 h.

A fim de prosseguir com os testes de avaliação da proliferação celular, foi avaliado um intervalo com menores concentrações dos compostos na presença e ausência de aminoguanidina, buscando determinar as concentrações em que a viabilidade celular estivesse acima de 85%, por tempo de incubação de 72 h, no mesmo tempo em que é realizado o teste de proliferação.

Uma vez que o grupamento guanidínico pode ser degradado por aminooxidases celulares, o que pode ser prevenido com a adição do inibidor destas enzimas, a aminoguanidina. De uma forma geral, o tratamento com GC7, nos

trabalhos da literatura são feitos juntamente com aminoguanidina (ALMEIDA *et al.*, 2014; ALMEIDA, 2015). No entanto, não existe nenhum trabalho que analisou sistematicamente o efeito de degradação celular do grupamento guanidínico de GC7.

Desta forma, para excluir a possibilidade de degradação celular por amina oxidases, foi testado o efeito celular dos novos compostos na presença e ausência de aminoguanidina. No teste realizado para os compostos na ausência de aminoguanidina (dados não mostrados), os resultados não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) comparadas com os compostos na presença de aminoguanidina.

Os compostos com núcleo guanidínico foram testados na presença de aminoguanidina nas concentrações decrescentes de 50,00 a 1,56 μM e foi determinada a concentração citotóxica de 15% (CC_{15}) (Tabela 3).

Tabela 3. Viabilidade celular de RAW 264.7 frente aos compostos com núcleo guanidínico e CC₁₅ calculada.

Compostos	50,00 µM	25,00 µM	12,50 µM	6,25 µM	3,12 µM	1,56 µM	CC₁₅
GC7	90,96±0,76	100,28±0,56	102,08±0,25	104,64±0,55	108,54±0,52	110,11±0,65	>50
GNO ₂ Bz	83,33±0,67	87,13±0,71	91,83±1,43	93,83±0,65	99,40±1,43	101,93±1,17	39,17
GBrBz	76,18±0,30	81,65±0,14	89,98±0,77	92,83±0,42	95,77± 0,70	97,69±0,93	25,54
GCIBz	62,22±0,43	86,12±0,57	88,07±0,29	92,93±0,88	95,72±0,54	97,99±0,93	19,56
GAnBz	74,07±0,50	81,44±1,58	90,26±0,36	93,94±1,32	97,42±1,70	104,86±0,94	25,86
GtolBz	86,14±1,07	91,02±1,13	94,48±1,77	101,70±1,71	107,37±0,63	118,03±0,52	47,33
GtBuBz	76,21± 0,75	83,09±0,36	86,79±0,57	90,27±0,60	93,31±0,88	97,67±0,50	23,81
GIBz	75,84±0,66	79,54±0,43	86,11±0,28	89,92±0,39	93,32±0,87	97,71±0,57	21,43
GMetBz	75,35±0,16	87,67±0,46	91,11±0,54	93,15±0,64	95,51±0,64	98,52±0,60	28,42
GFBz	90,19±0,23	93,77±0,75	98,85±0,35	100,80±1,10	105,40±1,31	108,90±0,50	>50
TrisBrEsp	80,98±0,16	85,08±0,58	94,19±0,79	99,28±0,15	108,56±0,94	113,72±1,88	35,90

Valores de viabilidade das células foi apresentado como % ± desvio padrão para as diferentes concentrações de compostos testadas por um período de 72 h.

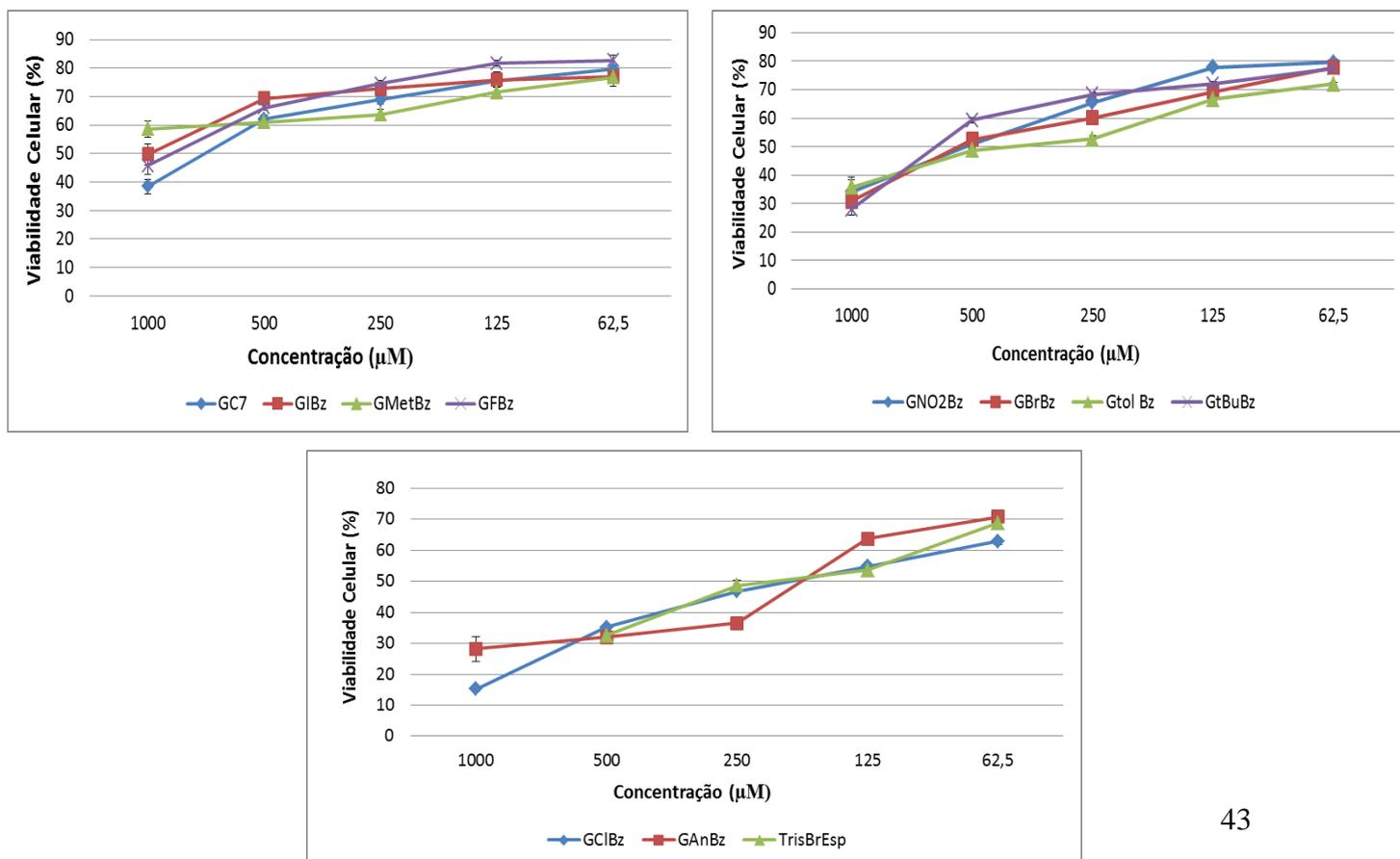
CC₁₅ = Concentração citotóxica dos compostos sobre 15% das células.

Observa-se na Tabela 3, que os compostos GC7, GtoIbz e GFBz apresentaram estatisticamente significativa ($p < 0,05$) menor citotoxicidade por um tempo de incubação prolongado de 72 h, permitindo viabilidade celular maior do que 85% em concentrações próximas a 50 μM . Por outro lado, o composto GCIBz seguiu sendo o mais citotóxico, possibilitando a viabilidade das células RAW 264.7 apenas em concentração abaixo de 20 μM , seguido, em ordem decrescente de citotoxicidade, pelos compostos: GIBz > GtBuBz > GBrBz > GAnBz > GMetBz > TriBrEsp > GNO₂Bz.

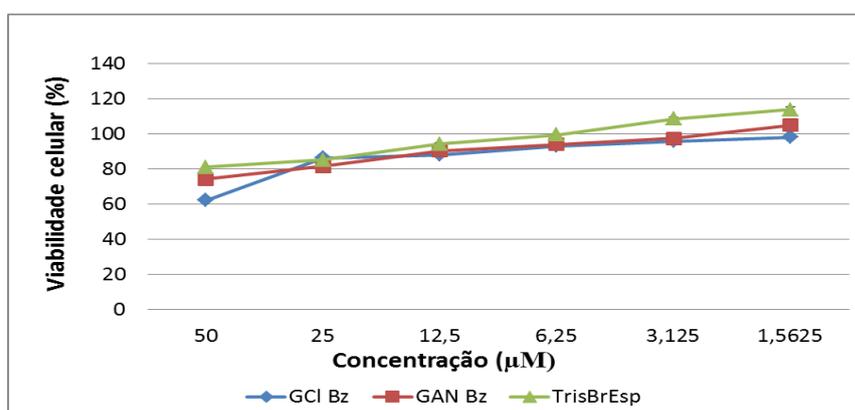
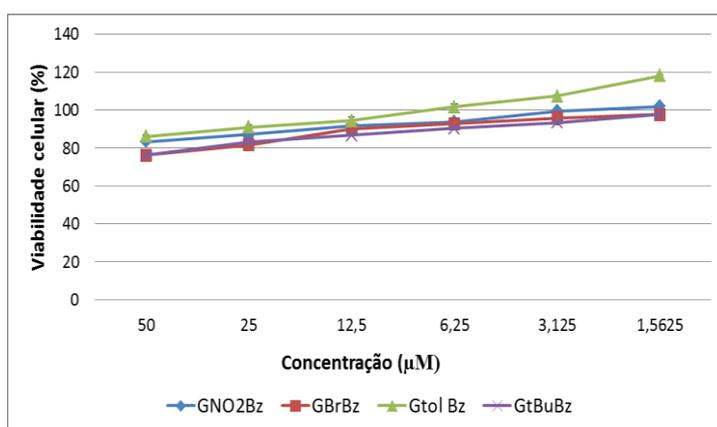
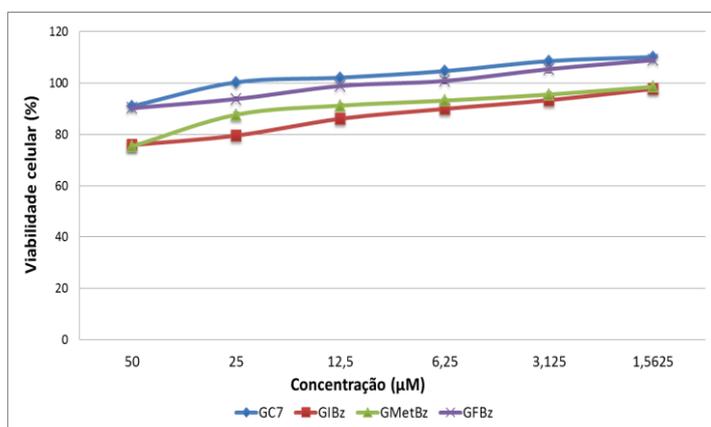
É interessante observar que o composto GC7 apresentou baixa citotoxicidade, sendo que a partir de 25 μM as células RAW 264.7 não são mais sensíveis, após 72 h de tratamento. Por outro lado, entre os demais derivados guanidínicos, alguns ainda apresentaram 10% de citotoxicidade mesmo a 6,25 μM , após 72 h de tratamento. Tanto GC7 quanto os derivados guanidínicos apresentaram citotoxicidade de forma dose-dependente principalmente abaixo de 250 μM (Figura 8).

Figura 8. Dose-resposta da viabilidade celular de macrófagos RAW 264.7 tratados com os derivados guanidínicos testados e GC7.

A



B



A) Porcentagem da viabilidade celular frente aos compostos e GC7 com 24 h de tratamento. B) Porcentagem da viabilidade celular frente aos compostos e GC7 com 72 h de tratamento. Em ambos os tratamentos a viabilidade das células aumentou em relação à diminuição das concentrações testadas dos compostos.

A partir de tais dados, foi possível verificar que nenhum dos compostos guanidínicos testados apresentaram citotoxicidade elevada a ponto de inviabilizar os ensaios de proliferação celular. Contudo, para que a concentração citotóxica utilizada dos derivados guanidínicos fosse baixa assim como a do GC7 e, a fim de que o efeito antiproliferativo pudesse ser observado tendo o mínimo possível de células mortas (ADAN *et al.*, 2016), foram utilizadas as concentrações que no teste de citotoxicidade permitiram viabilidade celular maior que 85%.

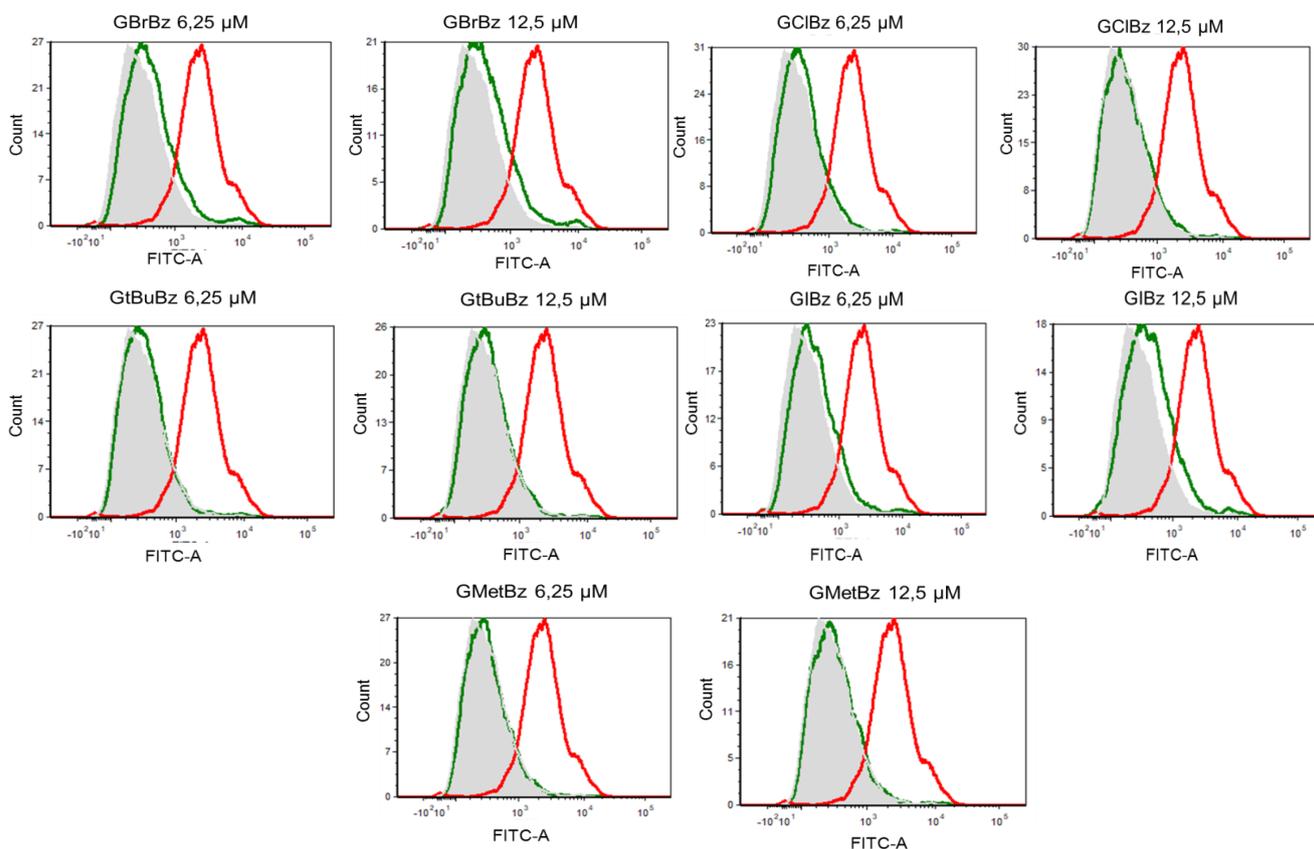
4.2 Proliferação de células RAW 264.7 frente ao tratamento com compostos guanidínicos

As células RAW 264.7 foram tratadas com os compostos GBrBz, GCIBz, GtBuBz, GIBz e GMetBz nas concentrações de 6,25 e 12,50 μM por um período de 72 h. Tais concentrações representaram um valor de citotoxicidade menor de 15% com a linhagem testada e foram utilizadas para efeito de comparação com GC7, que não apresenta citotoxicidade a 12,5 μM , visto que o ensaio de proliferação visa exatamente averiguar o processo de crescimento de uma população celular e não apenas indicar células vivas ou mortas (ADAN *et al.*, 2016).

Como observado na Figura 9, o composto GC7 já exerce efeito antiproliferativo na linhagem RAW 264.7 em concentração de 12,50 μM , assim esse valor foi utilizado como um parâmetro de comparação para os demais compostos.

Figura 9. Influencia dos compostos com núcleo guanidínico sobre a proliferação de células RAW 264.7

Controle GC7 Composto



As curvas em cinza representam a condição controle (células sem tratamento); em vermelho, estão representadas as células tratadas com 12,5 μM de GC7; a linha em verde representa o nível de proliferação das células tratadas com os compostos testados. A fluorescência (eixo X) e o número de células (eixo Y) foram determinados por citometria de fluxo. O deslocamento dos picos de fluorescência para esquerda é proporcional à proliferação das células RAW 264.7.

Já é conhecido que a inibição de DHPS por GC7 leva a efeitos antiproliferativos descritos para diferentes linhagens, incluindo RAW 264.7 (ALMEIDA Jr., 2015) e, como exemplo, para células tumorais como A549 (células de tumor de pulmão) e Hep3B (hepatocarcinoma) (XU *et al.*, 2014; ZHOU *et al.*, 2017). Com o resultado apresentado na Figura 9, observamos que a intensidade da fluorescência do marcador CFSE nas células tratadas com

12,5 μM de GC7 (em vermelho) é maior em relação às células não tratadas do controle (em cinza claro), demonstrando que não houve a diluição do marcador pela divisão celular.

No entanto, os compostos com núcleo guanidínico nas concentrações testadas não exibiram efeito antiproliferativo nas células quando comparados com o inibidor GC7. Desta forma, estes compostos com núcleo guanidínico não devem ter sido efetivos contra a enzima DHPS a ponto de alterar a proliferação celular, o que é um efeito bem caracterizado do inibidor GC7 (BANDINO *et al.*, 2014; XUE *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2017).

4.3 Ensaios bioquímicos com a enzima DHPS

Paralelamente ao estudo dos efeitos celulares em cultura de células RAW 264.7, este trabalho também avaliou o efeito direto dos compostos com núcleo guanidínico sobre a enzima DHPS, apenas na presença de enzima e substrato espermidina e do cofator NAD^+ .

O ensaio padronizado utilizou o cofator NAD^+ como agente principal na determinação da atividade de DHPS. O mecanismo completo de atividade de DHPS pode ser dividido em quatro etapas: (A) desidrogenação NAD^+ -dependente da espermidina em desidro-espermidina; (B) clivagem da desidro-espermidina e transferência da porção 4-aminobutil para o grupo amino da cadeia lateral do resíduo Lys329 de DHPS, resultando na formação do composto intermediário enzima-imina; (C) transferência da porção 4-aminobutil do intermediário enzima-imina para o grupo amino da cadeia lateral do resíduo de Lys50 de eIF5A (em humano), com a formação do composto intermediário eIF5A-imina; (D) redução do intermediário eIF5A-imina, o que origina a desoxi-hipusina e regenera o NAD^+ da reação (PARK, 2006). Uma vez que NADH possui um espectro de fluorescência diferente de NAD^+ podemos determinar sua concentração, utilizando como medida da atividade de DHPS a formação de NADH. A competição do ligante, neste caso do composto guanidínico, com a espermidina pelo sítio catalítico diminui a formação de NADH, ou seja, a atividade inibitória é determinada de acordo com a fluorescência detectada.

No ensaio de cinética enzimática, para triagem dos compostos com potencial inibição da enzima, foram testados 10 compostos guanidínicos, sendo

que GCIBz e GFBz não foram avaliados pelo método de espectrofluorimetria pois apresentaram fluorescência intrínseca. Cinco compostos: GBrBz, GAnBz, GTolBz, GIBz e GMetBz apresentaram potencial inibitório por apresentar, no mínimo, inibição de 30% da atividade enzimática, enquanto que os demais apresentaram capacidade inibitória muito baixa (GNO₂Bz; GtBuBz e TrisBr Esp), o índice de citotoxicidade em 50% da atividade enzimática (IC₅₀) foi calculado para cada composto (Tabela 4).

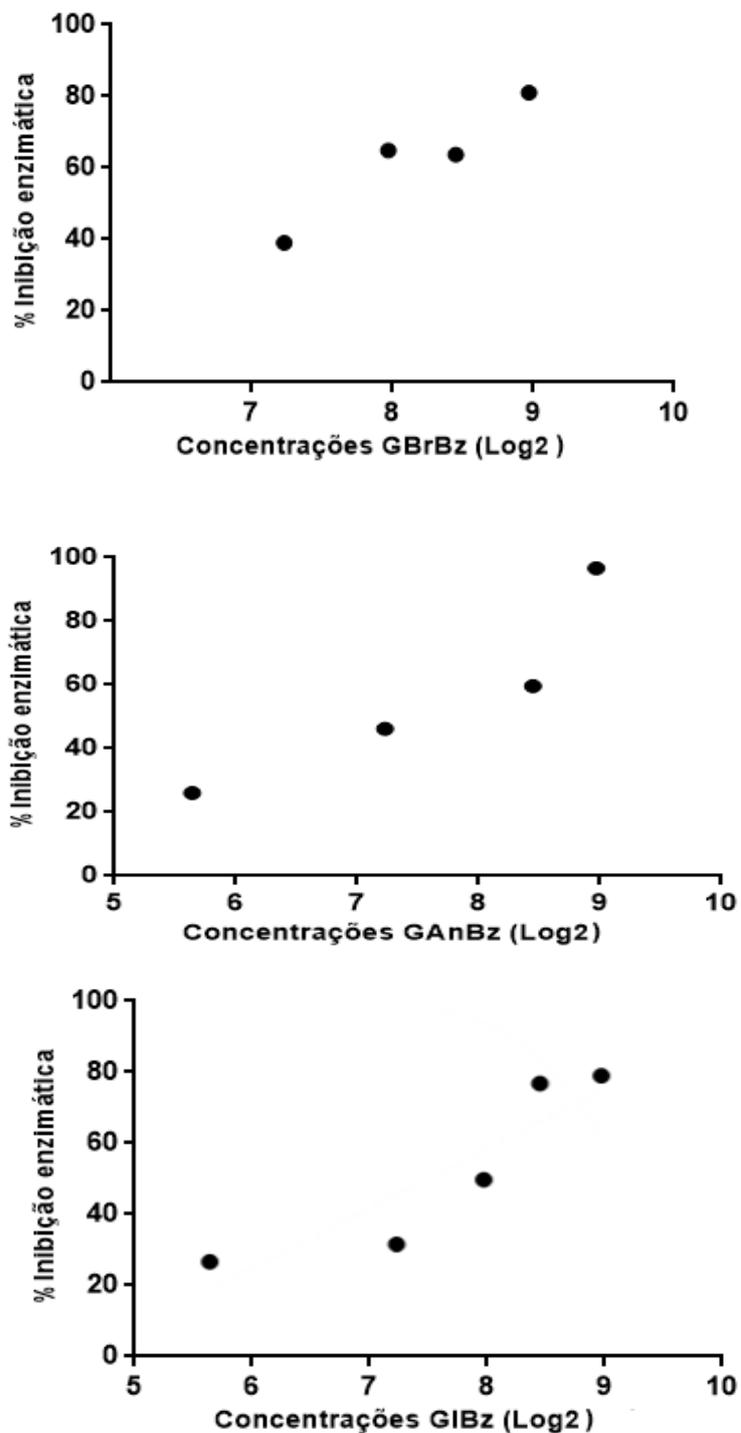
Tabela 4. Dados de potencial de inibição e IC₅₀ dos compostos guanidínicos.

Composto	% Inibição da DHPS (500 µM)	IC₅₀ (µM)
GBrBz	80,06	171,90±6,94
GAnBz	92,23	194,20±16,96
GTolBz	39,06	> 500
GIBz	86,61	189,90±10,05
GMetBz	39,67	> 500

IC₅₀= concentração na que o composto é capaz de inibir 50% a atividade da enzima.

Após a etapa de triagem, diferentes concentrações dos três compostos com promissora atividade inibitória sobre DHPS foram testadas e as medidas de unidades de fluorescência relativa, equivalente à produção de NADH na presença de concentrações crescentes de inibidores, foram reportadas em um gráfico de inibição enzimática versus concentração (log2) (Figura 10).

Figura 10. Inibição enzimática nas diferentes concentrações testadas dos compostos guanidínicos.



A porcentagem de inibição de DHPS em diferentes concentrações dos compostos guanidínicos (em log2) foram utilizados para determinação da IC50 utilizando o programa *GraphPad Prism*.

GC7 apresentou inibição de 98% da enzima DHPS com um IC_{50} na concentração de 0,80 μM , tal como observado anteriormente (SILVA, 2015). Trabalhos realizados anteriormente com compostos sintetizados análogos da espermidina, entre eles o GC7, demonstraram alta afinidade pela enzima ($IC_{50}=17\text{ nM}$) (JAKUS *et al.*, 1993; ROSSI *et al.*, 2014), sendo que na concentração de 10 μM o composto inibiu quase por completo a síntese de hipusina (LEE *et al.*, 2002).

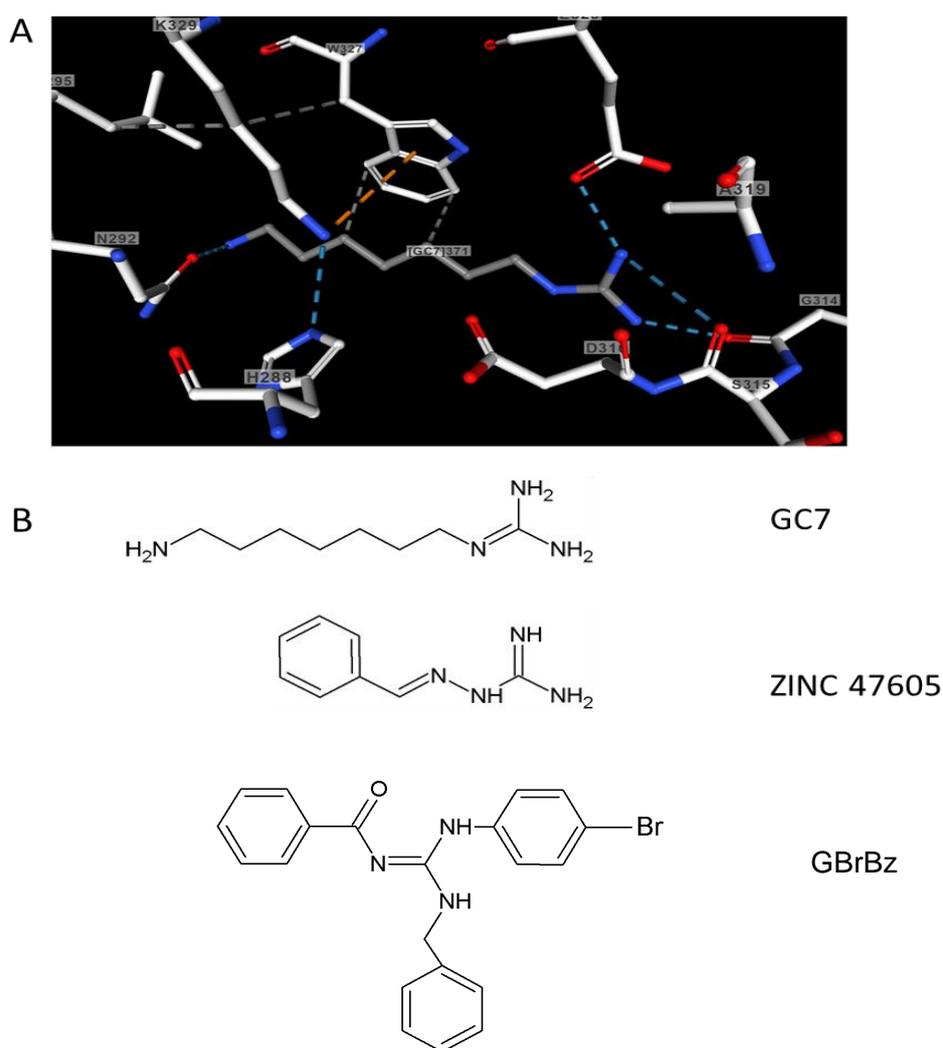
Os compostos de núcleo guanidínico com um grupo fenil não substituído (GAnBz), substituído em *para* por I (GIBz) e substituído por Br (GBrBz) mostraram potencial inibitório sobre a enzima maior que 80% a 500 μM e com IC_{50} de 194,20, 189,90 e 171,90 μM , respectivamente. Notou-se, entre esses compostos, que a substituição da fenila por um grupo halogênio menor propiciou o aumento da atividade inibitória sobre DHPS. Interessantemente, o composto com o substituinte eletronegativo NO_2 não inibiu a enzima a 500 μM .

Os compostos, GTolBz e GMetBz apresentaram IC_{50} em concentrações maiores que 500 μM , mostrando que substituintes com características mais apolares podem levar a uma menor interação com a enzima, o que também pode ser inferido pela inibição menor que 30% apresentada pelo composto substituído por um grupo *t*-butila (GtBuBz). Por outro lado, o composto TrisBrEsp, formado pela conjugação de três grupos GBrBz com a benzila da amina trocada por um grupo alquil, por ser um composto de grande dimensão e maior rotação, pode não interagir com o sítio ativo de DHPS.

Podemos observar que compostos com grupo substituinte no fenil com característica de elétron retirador na posição *para* (GBrBz e GIBz), apresentaram maior atividade que os compostos como substituintes no fenil na posição *para* com características elétron doador. De qualquer forma, a interação do sítio ativo da enzima com os compostos guanidínicos deve ser avaliada por meio de estudos *in silico* do *docking* destes compostos com o cristal 1RQD da do complexo DHPS:NAD:GC7, como representado na Figura 11A. A estrutura química de GC7 e do composto GBrBz são comparadas na Figura 11 B com a estrutura da molécula ZINC 47605, adquirida a partir de rastreamento virtual com compostos guanidínicos do banco de dados ZINC com potencial interação com o sítio ativo de DHPS. A atividade inibitória *in vitro*

direta sobre DHPS da referida molécula foi testada anteriormente em nosso laboratório e apresentou IC_{50} de $175 \pm 30 \mu M$ (SILVA, 2015), próximo ao obtido para GBrBz, demonstrando potencial relação estrutural entre a molécula selecionada pela interação virtual com DHPS e composto guanidínico com as substituições de um grupo fenil com halogênio em *para* e um benzil aos nitrogênios do grupamento guanidínico.

Figura 11. Interação de GC7 com DHPS e demais compostos inibidores da enzima.



A) Imagem do cristal do complexo ternário DHPS:NAD:GC7 com foco no sítio ativo interagindo com GC7. B) Estrutura química de GC7, do inibidor de DHPS ZINC 47605, confirmado a partir de rastreamento virtual e do inibidor GBrBz caracterizado por este estudo.

Maior detalhe quanto à interação dos compostos ZINC 47605 e GBrBz no sítio ativo de DHPS necessitam de estudos de *docking*. Contudo, é interessante observar a similaridade estrutural, ou seja a presença e a distância do grupamento guanidínico ao grupo benzila, importantes para a interação do primeiro com os resíduos polares e do segundo com a nuvem de elétrons pi do resíduo de Trp327 entre o composto GBrBz e ZINC 47605, que podem servir como modelo para posteriores modificações que aumentam a interação especificamente com a enzima.

Visto o potencial inibitório principalmente do composto GBrBz diretamente sobre a enzima em concentrações maiores que as concentrações do teste de proliferação, conclui-se que também é necessária a avaliação dos níveis de eIF5A hipusina nas células RAW 264.7 antes e depois do tratamento de proliferação, bem como é necessária a avaliação da permeabilidade celular a esse composto e de moléculas de degradação a fim de confirmar se a ausência do efeito antiproliferativo pela inibição de DHPS deve-se à presença de altos níveis de eIF5A hipusina na célula antes do tratamento somado à possível metabolização celular de GBrBz, GIBz e GAnBz.

4.4 Testes de sensibilidade dos compostos frente a fungos patogênicos

4.4.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM)

Os fungos são organismos eucariotos e as suas células apresentam similaridades às células de mamíferos, com exceção à presença de parede celular e do ergosterol em lugar do colesterol como lipídio de membrana (FAVRE e RYDER, 1997), o que faz com que ambos sejam os principais alvos dos fármacos antifúngicos, resultando em um número restrito de antifúngicos comerciais (PERFECT, 2017). Portanto, tem-se a necessidade de estudar novos mecanismos de inibição do crescimento fúngico assim como o

desenvolvimento de moléculas novas com melhor especificidade que possam auxiliar no tratamento das doenças (PERFECT, 2017).

Embora a essencialidade da enzima DHPS já tenha sido caracterizada no modelo de célula eucariótica de *Saccharomyces cerevisiae* (PARK *et al.*, 1998), a inibição da mesma por GC7 ou algum outro inibidor ainda não foi descrita. Entre os microrganismos fúngicos, testes de inibição de DHPS foram realizados apenas com o fitopatógeno para cereais *F. graminearum*, visto que altos níveis de expressão desta enzima estavam presentes na forma invasiva do fungo (WORIEDH *et al.*, 2011; MARTINEZ-ROCHA *et al.*, 2016).

Devido aos poucos estudos realizados inibindo a enzima DHPS em fungos patogênicos, este trabalho poderia abrir caminho para estudos futuros por meio de compostos com grupo guanidínico com potencial atividade inibitória sobre DHPS e assim, inibindo o crescimento dos microrganismos patogênicos.

Os valores de CIM e CFM para os ensaios de sensibilidade fúngica aos compostos guanidínicos estão dispostos na Tabela 5. O composto TrisBrEsp foi o que melhor inibiu o crescimento de todos os fungos testados, com valores de CIM variando entre 0,02 a 0,15 mM.

Tabela 5. Valores da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração fungicida mínima (CFM) dos compostos guanidínicos frente às espécies fúngicas testadas.

Compostos	<i>C. albicans</i>		<i>C. parapsilosis</i>		<i>C. neoformans</i>		<i>C. gattii</i>		Pb 18		<i>P. lutzii</i>	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
GC7	>10,00	>10,00	10,00	10,00	0,08	0,08	0,08	0,08	10,00	10,00	10,00	10,00
GNO ₂ Bz	>5,00	>5,00	>5,00	>5,00	1,25	1,25	1,25	1,25	0,31	0,31	5,00	5,00
GBrBz	>5,00	>5,00	>5,00	>5,00	5,00	5,00	>5,00	>5,00	0,62	0,62	0,31	0,31
GCIBz	>5,00	>5,00	>5,00	>5,00	0,62	0,62	1,25	1,25	1,25	1,25	2,5	2,5
GAnBz	>5,00	>5,00	>5,00	>5,00	>5,00	>5,00	5,00	5,00	>5,00	>5,00	>5,00	>5,00
GTolBz	>5,00	>5,00	>5,00	>5,00	5,00	5,00	2,5	2,5	2,50	2,50	5,00	5,00
GtBuBz	>5,00	>5,00	>5,00	>5,00	5,00	5,00	1,25	1,25	2,50	2,50	2,50	2,50
GIBz	1,25	1,25	>5,00	>5,00	0,62	0,62	1,25	1,25	0,62	0,62	0,62	0,62
GMetBz	>5,00	>5,00	>5,00	>5,00	2,5	2,5	2,5	2,5	>5,00	>5,00	>5,00	>5,00
GFBz	5,00	5,00	5,00	5,00	0,15	0,15	0,31	0,31	0,31	0,31	>5,00	>5,00
TrisBrEsp	0,15	0,15	0,15	0,15	0,08	0,08	0,04	0,04	0,02	0,02	0,02	0,02
Anfotericina B	0,50	0,50	0,25	0,25	1,00	1,00	0,50	0,50	0,25	0,25	0,50	0,50

CIM e CFM dos compostos guanidínicos expressas em mM.

CIM e CFM de anfotericina B expressas em mg/L.

O composto GC7 exibiu valores de CIM de 0,08 mM contra *C. neoformans* e *C. gattii* e fraca atividade contra *C. parapsilosis*, *P. brasiliensis* isolado 18 e *P. lutzii* (CIM=10 mM). No entanto, GC7 não exibiu atividade contra *C. albicans* (CIM>10 mM).

Entre os compostos guanidínicos que foram observados como inibidores de DHPS pelo ensaio enzimático *in vitro*, apenas GIBz mostrou-se ativo contra a maioria das leveduras, com exceção de *C. parapsilosis*. Entretanto, *C. albicans* e *C. gattii* mostraram menor susceptibilidade (CIM=1,25 mM) que *C. neoformans* e os dois isolados de *Paracoccidioides* (CIM=0,62 mM). GBrBz mostrou-se especificamente ativo contra *P. brasiliensis* (CIM=0,62 mM) e *P. gattii* (CIM=0,31 mM), enquanto que GAnBz não inibiu o crescimento de nenhuma dos fungos testados. GFBz não foi capaz de inibir o crescimento de *P. lutzii*, no entanto, inibiu o crescimento dos demais fungos, nas concentrações de 0,15 a 5,00 mM. O outro composto guanidínico halogenado, GCIBz inibiu o crescimento das leveduras exceto da espécie *Candida*, sendo mais ativo contra *C. neoformans* (CIM=0,62 mM).

Por sua vez, o composto TrisBrEsp inibiu o crescimento de todos os fungos testados, apresentando menor atividade contra *C. albicans* e *C. parapsilosis* (CIM=0,15 mM), enquanto que as espécies de *Paracoccidioides* foram notavelmente mais susceptíveis (CIM=0,02 mM). Os demais compostos mostraram uma inibição fraca ou nula frente aos microrganismos testados nas concentrações estabelecidas. É importante ainda notar que os mesmos valores de CIM foram obtidos na avaliação da CFM, indicando que os compostos guanidínicos atuaram de forma fungicida sobre as células.

Com relação à anfotericina B, testada em mg/L, como preconizado no documento M27-A3, os valores de CIM estiveram no intervalo de 0,5 a 1,0 mg/L, confirmando a eficácia do controle positivo contra as diversas espécies fúngicas. Além disso, os valores também permaneceram dentro da referência determinada para a garantia da qualidade do teste preconizada no documento (CIM = 0,5 mg/L para *C. albicans* ATCC 90028 e CIM = 0,25 mg/L para *C. parapsilosis* ATCC 22109).

4.1.1 Cálculo do índice de seletividade (IS)

O índice de seletividade (IS) representa a quantidade do composto que tem atividade frente ao microrganismo patógeno, mas não resulta tóxico para a célula do hospedeiro (SILVA *et al.*, 2010). O valor de IS foi calculado somente para os compostos que inibiram o crescimento dos fungos testados e foram calculados com base na razão entre os valores do CC₅₀ das células de macrófago RAW 264.7 pela concentração inibitória mínima (CIM) e estão apresentados nas Tabelas 6;7 e 8.

Tabela 6. Determinação do IS dos compostos que apresentaram atividade inibitória sobre *Candida* spp.

Compostos	<i>C. albicans</i>			<i>C. parapsilosis</i>		
	CC ₅₀	CIM	IS	CC ₅₀	CIM	IS
GC7	Não se aplica			Não se aplica		
GBrBz	Não se aplica			Não se aplica		
GCIBz	Não se aplica			Não se aplica		
GIBz	1	1,25	0,8	Não se aplica		
GFBz	Não se aplica			Não se aplica		
TrisBrEsp	0,25	0,15	1,7	0,25	0,15	1,7
Anfotericina B	>0,07	0,0005	>140	>0,07	0,0003	>233,3

CIM (concentração inibitória mínima) e CC₅₀ (concentração citotóxica a 50% das células) expressas em mM.

IS = Índice de Seletividade.

Tabela 7. Determinação do IS dos compostos que apresentaram atividade inibitória sobre *Cryptococcus* spp.

Compostos	<i>C. neoformans</i>			<i>C. gatti</i>		
	CC50	CIM	IS	CC50	CIM	IS
GC7	0,75	0,08	9,4	0,74	0,08	9,4
GBrBz	Não se aplica			Não se aplica		
GCIBz	0,24	0,62	0,39	0,24	1,25	0,19
GIBz	1	0,62	1,61	1	1,25	0,8
GFBz	0,9	0,15	6	0,9	0,3	3,1
TrisBrEsp	0,25	0,08	3,1	0,25	0,04	6,3
Anfotericina B	>0,07	0,0011	>63,6	>0,07	0,0005	>140

CIM (concentração inibitória mínima) e CC50 (concentração citotóxica a 50% das células) expressas em mM.

IS = Índice de Seletividade.

Tabela 8. Determinação do IS dos compostos que apresentaram atividade inibitória sobre *Paracoccidioide* spp.

Compostos	<i>Pb18</i>			<i>P.lutzii</i>		
	CC ₅₀	CIM	IS	CC ₅₀	CIM	IS
GC7	Não se aplica			Não se aplica		
GBrBz	0,56	0,62	0,9	0,56	0,31	1,81
GCIBz	0,24	1,25	0,19	0,24	2,50	0,1
GIBz	1	0,62	1,61	1	0,62	1,61
GFBz	0,9	0,3	3	Não se aplica		
TrisBrEsp	0,25	0,02	12,5	0,25	0,02	12,5
Anfotericina B	>0,07	0,0003	>233,3	>0,07	0,0005	>140

CIM (concentração inibitória mínima) e CC50 (concentração citotóxica a 50% das células) expressas em mM.

IS = Índice de Seletividade.

Entre os resultados obtidos neste estudo, observa-se na Tabela 7 que ambas as espécies de *Cryptococcus* foram notavelmente susceptíveis a GC7 e ao composto TrisBrEsp, entre eles, o GC7 apresentou um melhor índice de seletividade (IS = 9,4) o que indica que a maior valor do IS mais seletivo é o composto sobre o fungo patogênico e, conseqüentemente, menor efeito tem sobre a célula hospedeira de mamífero. As espécies de *Cryptococcus* spp. diferenciam-se das demais leveduras patogênicas por sintetizarem uma cápsula de polissacarídeos, estruturas que as protegem dos ataques do hospedeiro. Sua resistência aos antifúngicos tem sido atribuída aos casos de uso prolongado de fluconazol durante a terapia de manutenção em pacientes com AIDS, evidenciando aumento da CIM de fluconazol em 8 vezes e de 5-fluorocitosina em 4 vezes (RODRIGUES *et al.*, 1999; FRIESE *et al.*, 2001; REVIE *et al.*, 2018). Assim, a determinação de novos compostos inibidores do crescimento de espécies de *Cryptococcus* e com alta seletividade em relação à citotoxicidade frente a células de mamíferos é um resultado importante no cenário de desenvolvimento de novos compostos antifúngicos.

Dos compostos testados, TrisBrEsp também mostrou ter uma melhor resposta com um IS de 12,5 em células RAW 264.7 frente ao microrganismo *Paracoccidioides* spp. (Tabela 8) um fungo dimórfico, causador da paracoccidioidomicose, doença de caráter endêmico, afetando em grande parte

indivíduos do sexo masculino, na faixa etária de 30-60 anos por estar relacionada às atividades agrícolas. Na mulher a doença tem menor incidência também devido ao fato de que o estrógeno inibe a transformação de conídios e micélios em leveduras (ARISTIZÁBAL *et al.*, 2002; PINZAN *et al.*, 2010).

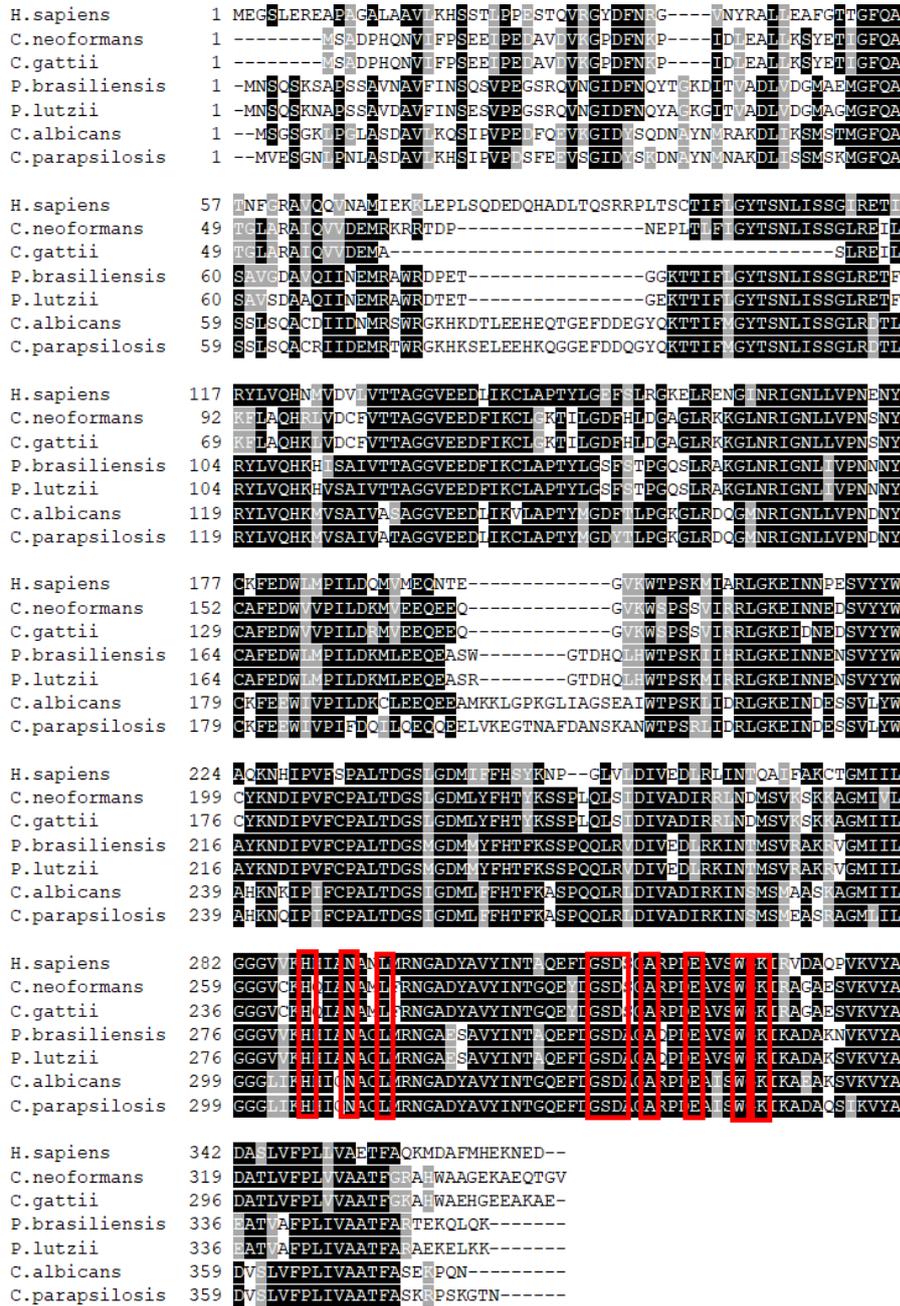
As leveduras do gênero *Candida* também se apresentaram mais susceptíveis ao composto TrisBrEsp do que aos demais, o que junto com os dados de susceptibilidade dos outros fungos testados e valores de seletividade coloca este composto como promissor para futuros estudos de mecanismo da atividade antifúngica, toxicidade em células de mamíferos e de farmacocinética.

Comparando isoformas da enzima DHPS dos fungos aqui estudados com a isoforma de humano, é possível observar que a similaridade é maior que 57% (Tabela 9), de acordo com a análise do alinhamento múltiplo (Figura 12).

Tabela 9. Isoforma de DHPS humana e de diferentes espécies fúngicas e similaridade entre elas.

Isoforma de DHPS	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. gattii</i>	<i>P. brasiliensis</i>	<i>P. lutzii</i>	<i>H. sapiens</i>
<i>C. albicans</i> (Genbank AOW28255.1)	100%	86,02%	61,95%	61,71%	65,35%	66,20%	57,50%
<i>C. parapsilosis</i> (Genbank CCE44704.1)	86,02%	100%	57,89%	58,36%	63,66%	65,07%	57,22%
<i>C. neoformans</i> (Genbank OXH66321.1)	61,95%	57,89%	100%	96,28%	61,58%	63,64%	60,93%
<i>C. gattii</i> (Genbank KJE02356.1)	61,71%	58,36%	96,28%	100%	61,32%	63,52%	60,44%
<i>P. brasiliensis</i> (Genbank EEH43800.1)	65,35%	63,66%	61,58%	61,32%	100%	94,97%	62,82%
<i>P. lutzii</i> (Genbank EEH39228.1)	66,20%	65,07%	63,64%	63,52%	94,97%	100%	63,11%
<i>H. sapiens</i> (Genbank NP_001921.1)	57,50%	57,22%	60,93%	60,44	62,82%	63,11%	100%

Figura 12. Alinhamento múltiplo entre as isoformas das diferentes espécies em estudo.



O alinhamento múltiplo foi obtido com a ferramenta Clustal Omega e a representação, por meio da ferramenta BoxShade (https://embnet.vital-it.ch/software/BOX_form.html). Em vermelho estão marcados os resíduos que interagem com GC7 a partir do cristal de DHPS humana (1RQD).

Uma vez que as isoformas de DHPS das diferentes espécies possuem alta similaridade com a de humano, como mostrado pela Tabela 9 e possuem os resíduos de interação com GC7 conservados (Figura 12), a atividade dos compostos guanidínicos sobre os microrganismos deve estar relacionado com a inibição desta enzima nas diferentes espécies. GC7 é um forte inibidor de DHPS e sua atividade inibitória sobre as espécies de *Cryptococcus* possivelmente relaciona-se com a interação com esta enzima do respectivo microrganismo. O composto guanidínico que apresentou melhor inibição direta sobre a enzima, ou seja, GIBz inibiu o crescimento de todas as espécies fúngicas testadas, enquanto que o composto GBrBz inibiu apenas o crescimento de *Paracoccidioides* spp. e GAnBz não inibiu o crescimento de nenhuma das espécies, nas maiores concentrações testadas. É interessante observar, também, que todas as espécies fúngicas foram notavelmente susceptíveis ao maior composto testado, TrisBrEsp que, por sua vez, não apresentou inibição direta sobre DHPS.

A partir destes dados, embora a similaridade entre as isoformas das diferentes espécies seja alta, não é possível afirmar que a atividade fungicida dos compostos frente aos microrganismos testados ocorra devido exclusivamente à inibição da DHPS dos microrganismos. Para tanto, é necessário fazer a produção e purificação da enzima destes microrganismos e testar a afinidade da mesma frente aos compostos guanidínicos que melhor inibiram o crescimento fúngico.

Em todo caso, as infecções fúngicas tornam-se cada vez mais frequentes e surgem como um problema particularmente significativo em pacientes imunocomprometidos (PANACKAL *et al.*, 2015; SAVASTANO *et al.*, 2016). Assim, os resultados apresentados neste trabalho proporcionam novas estruturas com promissora atividade inibitória de DHPS e de fungos patogênicos que poderão ser melhor caracterizadas quanto às suas atividades biológicas e que também poderão ser usadas como protótipos para a obtenção de moléculas com maior potencial de inibição frente aos fungos, causando o menor dano possível nas células do hospedeiro.

5. CONCLUSÕES

Para todos os compostos avaliados neste trabalho, não foram observados altos valores de citotoxicidade nas concentrações testadas.

Dentre os compostos testados, os compostos de núcleo guanidínico com um grupo fenil substituído em *para* por I, metila e F mostraram ser menos citotóxicos para a linhagem de macrófago murino RAW 264.7, com um CC_{50} próximo a 1.000 μM .

Os compostos testados não apresentaram alteração da proliferação celular de RAW 264.7 quando testados em concentrações inferiores à concentração citotóxica de 15%, não apresentando, assim, o efeito mais proeminente da inibição de DHPS na célula.

No ensaio *in vitro* da inibição direta sobre a enzima DHPS, os compostos de núcleo guanidínico com um grupo fenil substituído em *para* por Br, I e sem substituição apresentaram melhor inibição enzimática com valores IC_{50} a 171,9 μM , 189,9 μM e 194,2 μM , respectivamente.

No teste de sensibilidade frente aos fungos, o composto GC7 inibiu apenas o crescimento do *Cryptococcus* spp com valores de CIM = 80 μM , e foi o composto com o melhor índice de seletividade entre os compostos testados. Enquanto que o TrisBrEsp inibiu o crescimento de todas as linhagens fúngicas testadas nas concentrações entre 20 a 150 μM , com alto índice de seletividade, sendo um composto com grande potencial antifúngico a ser avaliado em estudos futuros.

6. REFERÊNCIAS

- ABID, M. R. et al. Biochemical and immunological characterization of deoxyhypusine synthase purified from the yeast *Saccharomyces carlsbergensis*. **J Biochem**, v. 121, n. 4, p. 769-78, 1997
- ADAN, A.; KIRAZ, Y.; BARAN, Y. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Curr Pharm Biotechnol**, v. 17, n. 14, p. 1213-1221, 2016
- AGUIAR, P. A. D. F. et al. The epidemiology of cryptococcosis and the characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated in a Brazilian University Hospital. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 59, p. e13, 2017
- ALBUQUERQUE, P. C.; RODRIGUES, M. L. Research trends on pathogenic *Cryptococcus* species in the last 20 years: a global analysis with focus on Brazil. **Future Microbiol**, v. 7, n. 3, p. 319-29, 2012.
- ALMEIDA, O. P. et al. Hypusine modification of the ribosome-binding protein eIF5A, a target for new anti-inflammatory drugs: understanding the action of the inhibitor GC7 on a murine macrophage cell line. **Curr Pharm Des**, v. 20, n. 2, p. 284-92, 2014
- ALMEIDA, O. P. Potencial anti-inflamatório e antiproliferativo de compostos inibidores da enzima desoxi-hipusina sintase. Araraquara: Universidad Estadual Paulista. 2015. 88f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) Instituto de Química. Universidad Estadual Paulista-UNESP
- ALMEIDA, F.; WOLF, J. M.; CASADEVALL, A. Virulence-Associated Enzymes of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryot Cell**, v. 14, n. 12, p. 1173-85, 2015.
- ARMANI, F. Microbiologia. **Editora e Distribuidora Educacional S.A.** Londrina,. v. 1. 192p, 2016.
- ARISTIZÁBAL, B. H. et al. Experimental paracoccidioides brasiliensis infection in mice: influence of the hormonal status of the host on tissue responses. **Med Mycol**, v. 40, n. 2, p. 169-78, 2002.
- BANDINO, A. et al. Deoxyhypusine synthase (DHPS) inhibitor GC7 induces p21/Rb-mediated inhibition of tumor cell growth and DHPS expression correlates with poor prognosis in neuroblastoma patients. **Cell Oncol (Dordr)**, v. 37, n. 6, p. 387-98, 2014.
- BARBEDO, L.S.; SGARBI, D.B.G. Candidíase. **J bras Doenças Sex Transm**, Niterói/RJ, v. 22, n.1, p.22-38,. 2010.

- BENADUCCI, T. et al. Virulence of *Cryptococcus* sp. Biofilms In Vitro and In Vivo using *Galleria mellonella* as an Alternative Model. **Front Microbiol**, v. 7, p. 290, 2016.
- BENNE, R.; BROWN-LUEDI, M. L.; HERSHEY, J. W. Protein synthesis initiation factors from rabbit reticulocytes: purification, characterization, and radiochemical labeling. **Methods Enzymol**, v. 60, p. 15-35, 1979.
- BINELLI, C. A. et al. Investigation of the possible association between nosocomial candiduria and candidaemia. **Clin Microbiol Infect**, v. 12, n. 6, p. 538-43, 2006.
- BOATTO, H. F. et al. The role of the symptomatic and asymptomatic sexual partners in the recurrent vulvovaginitis. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 37, n. 7, p. 314-8, 2015.
- BONGOMIN, F. et al. A systematic review of fluconazole resistance in clinical isolates of *Cryptococcus* species. **Mycoses**, 2018.
- BOTET, J. et al. A chemical genomic screen in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a role for diphthamidation of translation elongation factor 2 in inhibition of protein synthesis by sordarin. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n. 5, p. 1623-9, 2008.
- BROWN, G. D. et al. Hidden killers: human fungal infections. **Sci Transl Med**, v. 4, n. 165, p. 165rv13, 2012.
- CARAGLIA, M. et al. eIF5A isoforms and cancer: two brothers for two functions? **Amino Acids**, v. 44, n. 1, p. 103-9, 2013.
- CASSETTARI, V.C.; SILVEIRA, I.R. Epidemiologia das infecções hospitalares. *J. of Infection Control Rio Grande do Sul*, v.3, n.4, p.245, 2014.
- CHAWLA, B. et al. Identification and characterization of a novel deoxyhypusine synthase in *Leishmania donovani*. **J Biol Chem**, v. 285, n. 1, p. 453-63, 2010.
- CHEONG, J. W.; MCCORMACK, J. Fluconazole resistance in cryptococcal disease: emerging or intrinsic?. **Med Mycol**, v. 51, n. 3, p. 261-9, 2013.
- CLEMENT, P. M. et al. Identification and characterization of eukaryotic initiation factor 5A-2. **Eur J Biochem**, v. 270, n. 21, p. 4254-63, 2003.
- COELHO, A. et al. Synthetic applications of polystyrene-supported 1,1,3,3-tetramethylguanidine. **Comb Chem High Throughput Screen**, v. 11, n. 10, p. 843-7, 2008.

- COELHO, C.; CASADEVALL, A. Cryptococcal therapies and drug targets: the old, the new and the promising. **Cell Microbiol**, v. 18, n. 6, p. 792-9, 2016.
- COLOMBO, A. L. Epidemiology and treatment of hematogenous candidiasis: a Brazilian perspective. **Braz J Infect Dis**, v. 4, n. 3, p. 113-8, 2000.
- COLOMBO, A. L. et al. Candida glabrata: an emerging pathogen in Brazilian tertiary care hospitals. **Med Mycol**, v. 51, n. 1, p. 38-44, 2013.
- COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Candiduria: a clinical and therapeutic approach. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 40, n. 3, p. 332-7, 2007.
- COQUEIRO, A. et al. In Vitro Antibacterial Activity of Prenylated Guanidine Alkaloids from Pterogyne nitens and Synthetic Analogues. **J Nat Prod**, v. 77, n. 8, p. 1972-5, 2014.
- COSTA-ORLANDI, C. Caracterização dos biofilmes de dermatófitos e desenvolvimento de protótipos anti-dermatófitos nas formas planctônica e biofilme. Araraquara: Universidade Estadual Paulista, 2016. 233f. Tese (Doutorado em Análises Clínicas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista - UNESP.
- COUTINHO, Z. F. et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cad Saude Publica**, v. 18, n. 5, p. 1441-54, 2002.
- DIAS, C. A. et al. Structural modeling and mutational analysis of yeast eukaryotic translation initiation factor 5A reveal new critical residues and reinforce its involvement in protein synthesis. **FEBS J**, v. 275, n. 8, p. 1874-88, 2008.
- DU, L. et al. Systemic Review of Published Reports on Primary Cutaneous Cryptococcosis in Immunocompetent Patients. **Mycopathologia**, v. 180, n. 1-2, p. 19-25, 2015.
- DUTRA, L. M. et al. Oral paracoccidioidomycosis in a single-center retrospective analysis from a Brazilian southeastern population. **J Infect Public Health**, 2017.
- EYER-SILVA, W. A. et al. Laryngeal paracoccidioidomycosis presenting as solitary true vocal fold disease. **IDCases**, v. 10, p. 71-74, 2017.
- FAVRE, B.; RYDER, N. S. Differential inhibition of fungal and mammalian squalene epoxidases by the benzylamine SDZ SBA 586 in comparison with the allylamine terbinafine. **Arch Biochem Biophys**, v. 340, n. 2, p. 265-9, 1997.
- FRIESE, G. et al. Development of azole resistance during fluconazole maintenance therapy for AIDS-associated cryptococcal disease. **AIDS**, v. 15, n. 17, p. 2344-5, 2001.

- GALANIS, E. et al. Epidemiology of *Cryptococcus gattii*, British Columbia, Canada, 1999-2007. **Emerg Infect Dis**, v. 16, n. 2, p. 251-7, 2010
- GERNER, E. W. et al. Post-translational modification of the protein-synthesis initiation factor eIF-4D by spermidine in rat hepatoma cells. **Biochem J**, v. 239, n. 2, p. 379-86, 1986.
- GIACOMAZZI, J. et al. The burden of serious human fungal infections in Brazil. **Mycoses**, v. 59, n. 3, p. 145-50, 2016
- GREGIO, A. P. et al. eIF5A has a function in the elongation step of translation in yeast. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 380, n. 4, p. 785-90, 2009.
- GUTIERREZ, E. et al. eIF5A promotes translation of polyproline motifs. **Mol Cell**, v. 51, n. 1, p. 35-45, 2013.
- HANAUSKE-ABEL, H. M. et al. Inhibition of the G1-S transition of the cell cycle by inhibitors of deoxyhypusine hydroxylation. **Biochim Biophys Acta**, v. 1221, n. 2, p. 115-24, 1994.
- HANAWA-SUETSUGU, K.; SEKINE, S.; SAKAI, H.; HORI-TAKEMOTO, C.; TERADA, T.; UNZAI, S.; TAME, J. R.; KURAMITSU, S.; SHIROUZU, M.; YOKOYAMA, S. Crystal structure of elongation factor P from *Thermus thermophilus* HB8. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 101, n. 26, p. 9595-9600, 2004.
- HAUBER, I. et al. Identification of cellular deoxyhypusine synthase as a novel target for antiretroviral therapy. **J Clin Invest**, v. 115, n. 1, p. 76-85, Jan 2005.
- HINRICHSEN, S. L. et al. *Candida* isolates in tertiary hospitals in northeastern Brazil. **Braz J Microbiol**, v. 40, n. 2, p. 325-8, 2009.
- HIRSCH, J. A. Structure-activity relationship between guanidine alkyl derivatives and norepinephrine release: site(s) and mechanism(s) of action. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 230, n. 3, p. 710-7, 1984.
- HOLE, C.; WORMLEY, F. L. Innate host defenses against *Cryptococcus neoformans*. **J Microbiol**, v. 54, n. 3, p. 202-11, 2016.
- HOQUE, M. et al. Inhibition of HIV-1 gene expression by Cyclopirox and Deferiprone, drugs that prevent hypusination of eukaryotic initiation factor 5A. **Retrovirology**, v. 6, p. 90, 2009.
- ILARI, A. et al. Targeting polyamine metabolism for finding new drugs against leishmaniasis: a review. **Mini Rev Med Chem**, v. 15, n. 3, p. 243-52, 2015.
- Ishikawa, T.; Superbases for organic synthesis: guanidines, amidines and phosphazenes and related organocatalysts. **John Wiley & Sons**, p. 340, 2009.

- JAO, D. L.; CHEN, K. Y. Tandem affinity purification revealed the hypusine-dependent binding of eukaryotic initiation factor 5A to the translating 80S ribosomal complex. **J Cell Biochem**, v. 97, n. 3, p. 583-98, 2006.
- JAKUS, J. et al. Features of the spermidine-binding site of deoxyhypusine synthase as derived from inhibition studies. Effective inhibition by bis- and mono-guanylated diamines and polyamines. **J Biol Chem**, v. 268, n. 18, p. 13151-9, 1993.
- JUSTICE, M. C. et al. Elongation factor 2 as a novel target for selective inhibition of fungal protein synthesis. **J Biol Chem**, v. 273, n. 6, p. 3148-51, 1998.
- KAISER, A. et al. Effect of drugs inhibiting spermidine biosynthesis and metabolism on the in vitro development of *Plasmodium falciparum*. **Parasitol Res**, v. 87, n. 11, p. 963-72, 2001.
- KAISER, A. et al. Modification of eukaryotic initiation factor 5A from *Plasmodium vivax* by a truncated deoxyhypusine synthase from *Plasmodium falciparum*: An enzyme with dual enzymatic properties. **Bioorg Med Chem**, v. 15, n. 18, p. 6200-7, 2007.
- KANG, K. R. et al. Identification of YHR068w in *Saccharomyces cerevisiae* chromosome VIII as a gene for deoxyhypusine synthase. Expression and characterization of the enzyme. **J Biol Chem**, v. 270, n. 31, p. 18408-12, 1995.
- KANG, H. A.; HERSHEY, J. W. Effect of initiation factor eIF-5A depletion on protein synthesis and proliferation of *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem**, v. 269, n. 6, p. 3934-40, 1994.
- KERSTING, D. et al. A suggested vital function for eIF-5A and DHPS genes during murine malaria blood-stage infection. **FEBS Open Bio**, v. 6, n. 8, p. 860-72, 2016.
- KOBAYASHI, C. C. et al. Candiduria in hospital patients: a study prospective. **Mycopathologia**, v. 158, n. 1, p. 49-52, 2004.
- KRONSTAD, J. W. et al. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. **Nat Rev Microbiol**, v. 9, n. 3, p. 193-203, 2011.
- KWON-CHUNG, K. J. et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 4, n. 7, p. a019760, 2014.
- KWON-CHUNG, K. J.; POLACHEK, I.; POPKIN, T. J. Melanin-lacking mutants of *Cryptococcus neoformans* and their virulence for mice. **J Bacteriol**, v. 150, n. 3, p. 1414-21, 1982.

- LANDAU, G. et al. The role of polyamines in supporting growth of mammalian cells is mediated through their requirement for translation initiation and elongation. **J Biol Chem**, v. 285, n. 17, p. 12474-81, 2010.
- LEE, S. K. et al. N(1)-guanyl-1,7,-diaminoheptane, an inhibitor of deoxyhypusine synthase, suppresses differentiation and induces apoptosis via mitochondrial and AMPK pathways in immortalized and malignant human oral keratinocytes. **J Oral Pathol Med**, v. 38, n. 10, p. 792-800, 2009.
- LEE, Y. et al. Effect of N1-guanyl-1,7-diaminoheptane, an inhibitor of deoxyhypusine synthase, on endothelial cell growth, differentiation and apoptosis. **Mol Cell Biochem**, v. 237, n. 1-2, p. 69-76, 2002
- LEOPOLD WAGER, C. M. et al. STAT1 signaling within macrophages is required for antifungal activity against *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 83, n. 12, p. 4513-27, 2015.
- LIAO, D. I. et al. Crystal structure of the NAD complex of human deoxyhypusine synthase: an enzyme with a ball-and-chain mechanism for blocking the active site. **Structure**, v. 6, n. 1, p. 23-32, 1998.
- LIU, Y. et al. N1-guanyl-1,7-diaminoheptane enhances the chemosensitivity of acute lymphoblastic leukemia cells to vincristine through inhibition of eif5a-2 activation. **Anticancer Drugs**, 2017.
- LYSKOVA, P. et al. . Antifungal Susceptibility of the *Aspergillus viridinutans* Complex: Comparison of Two In Vitro Methods **Antimicrob Agents Chemother**, 2018.
- MACKINTOSH, C. A.; WALTERS, D. R. Antifungal activity of some deoxyhypusine synthase inhibitors (short communication: plant mycology and crop protection). **Mycopathologia**, v. 156, n. 4, p. 329-32, 2003.
- MAIER, B. et al. The unique hypusine modification of eIF5A promotes islet beta cell inflammation and dysfunction in mice. **J Clin Invest**, v. 120, n. 6, p. 2156-70, 2010.
- MAIER, B.; TERSEY, S. A.; MIRMIRA, R. G. Hypusine: a new target for therapeutic intervention in diabetic inflammation. **Discov Med**, v. 10, n. 50, p. 18-23, 2010.
- MARTINEZ, R. New Trends in Paracoccidioidomycosis Epidemiology. **J Fungi (Basel)**, v. 3, n. 1, 2017.
- MARTINEZ-ROCHA, A. L. et al. Posttranslational hypusination of the eukaryotic translation initiation factor-5A regulates *Fusarium graminearum* virulence. **Sci Rep**, v. 6, p. 24698, 2016.

- MATHEWS, M. B.; HERSHEY, J. W. The translation factor eIF5A and human cancer. **Biochim Biophys Acta**, v. 1849, n. 7, p. 836-44, 2015.
- MCKINNEY, J. L. et al. Surgical Management of Primary Cutaneous Cryptococcosis after Failed Medical Management. **J Hand Microsurg**, v. 7, n. 1, p. 116-8, 2015.
- MÉMIN, E. et al. Blocking eIF5A modification in cervical cancer cells alters the expression of cancer-related genes and suppresses cell proliferation. **Cancer Res**, v. 74, n. 2, p. 552-62, 2014.
- MENDES, R. P. et al. Paracoccidioidomycosis: Current Perspectives from Brazil. **Open Microbiol J**, v. 11, p. 224-282, 2017.
- MIYAMOTO, Y. et al. Analysis of complement activation profile during cardiopulmonary bypass and its inhibition by FUT-175. **Trans Am Soc Artif Intern Organs**, v. 31, p. 508-11, 1985.
- MONGE, R. A. et al. The MAP kinase signal transduction network in *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 152, n. Pt 4, p. 905-12, 2006.
- MOORE, C. C. et al. Eukaryotic translation initiation factor 5A small interference RNA-liposome complexes reduce inflammation and increase survival in murine models of severe sepsis and acute lung injury. **J Infect Dis**, v. 198, n. 9, p. 1407-14, 2008.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- MURAMATSU, I.; OSHITA, M.; YAMANAKA, K. Selective alpha-2 blocking action of DG-5128 in the dog mesenteric artery and rat vas deferens. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 227, n. 1, p. 194-8, 1983.
- NAKANISHI, S.; CLEVELAND, J. L. Targeting the polyamine-hypusine circuit for the prevention and treatment of cancer. **Amino Acids**, v. 48, n. 10, p. 2353-62, 2016.
- NISHIMURA, K. et al. Independent roles of eIF5A and polyamines in cell proliferation. **Biochem J**, v. 385, n. Pt 3, p. 779-85, 2005.
- OKUMURA, K. et al. Improvement in wound healing by epidermal growth factor (EGF) ointment. I. Effect of nafamostat, gabexate, or gelatin on stabilization and efficacy of EGF. **Pharm Res**, v. 7, n. 12, p. 1289-93, 1990.
- OLIVERIO, S. et al. The spermidine analogue GC7 (N1-guanyl-1,7-diamineoheptane) induces autophagy through a mechanism not involving the hypusination of eIF5A. **Amino Acids**, v. 46, n. 12, p. 2767-76, 2014.

- OLSEN, M. E.; CONNOR, J. H. Hypusination of eIF5A as a Target for Antiviral Therapy. **DNA Cell Biol**, v. 36, n. 3, p. 198-201, 2017.
- PANACKAL, A. A. et al. Paradoxical Immune Responses in Non-HIV Cryptococcal Meningitis. **PLoS Pathog**, v. 11, n. 5, p. e1004884, 2015.
- PARK, M. H. The post-translational synthesis of a polyamine-derived amino acid, hypusine, in the eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A). **J Biochem**, v. 139, n. 2, p. 161-9, 2006.
- PARK, M. H.; JOE, Y. A.; KANG, K. R. Deoxyhypusine synthase activity is essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem**, v. 273, n. 3, p. 1677-83, 1998.
- PARK, M. H.; LEE, Y. B.; JOE, Y. A. Hypusine is essential for eukaryotic cell proliferation. **Biol Signals**, v. 6, n. 3, p. 115-23, 1997.
- PARK, M. H. et al. Functional significance of eIF5A and its hypusine modification in eukaryotes. **Amino Acids**, v. 38, n. 2, p. 491-500, 2010.
- PARK, M. H.; WOLFF, E. C.; FOLK, J. E. Is hypusine essential for eukaryotic cell proliferation? **Trends Biochem Sci**, v. 18, n. 12, p. 475-9, 1993.
- PARK, M. H. et al. Antiproliferative effects of inhibitors of deoxyhypusine synthase. Inhibition of growth of Chinese hamster ovary cells by guanidyl diamines. **J Biol Chem**, v. 269, n. 45, p. 27827-32, Nov 1994.
- PASSOS, X. S. et al. *Candida* colonization in intensive care unit patients' urine. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 100, n. 8, p. 925-8, 2005.
- PAULA E SILVA, A. C. A. et al. Microplate alamarBlue assay for *Paracoccidioides* susceptibility testing. **J Clin Microbiol**, v. 51, n. 4, p. 1250-2, 2013.
- PELECHANO, V.; ALEPUZ, P. eIF5A facilitates translation termination globally and promotes the elongation of many non polyproline-specific tripeptide sequences. **Nucleic Acids Res**, v. 45, n. 12, p. 7326-7338, 2017.
- PERFECT, J. R. The antifungal pipeline: a reality check. **Nat Rev Drug Discov**, v. 16, n. 9, p. 603-616, 2017
- PINZAN, C. F. et al. Immunological basis for the gender differences in murine *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **PLoS One**, v. 5, n. 5, p. e10757, 2010.
- PREUKSCHAS, M. et al. Expression of eukaryotic initiation factor 5A and hypusine forming enzymes in glioblastoma patient samples: implications for new targeted therapies. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e43468, 2012.

- REVIE, N. M. et al. Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. **Curr Opin Microbiol**, v. 45, p. 70-76, 2018.
- RODRIGUES, M. L.; ALVIANO, C. S.; TRAVASSOS, L. R. Pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*: virulence factors and immunological mechanisms. **Microbes Infect**, v. 1, n. 4, p. 293-301, 1999.
- ROSSI, D. et al. eIF5A and EF-P: two unique translation factors are now traveling the same road. **Wiley Interdiscip Rev RNA**, v. 5, n. 2, p. 209-22, 2014.
- SAIJO, T. et al. Anti-granulocyte-macrophage colony-stimulating factor autoantibodies are a risk factor for central nervous system infection by *Cryptococcus gattii* in otherwise immunocompetent patients. **MBio**, v. 5, n. 2, p. e00912-14, 2014.
- SAINI, P. et al. Hypusine-containing protein eIF5A promotes translation elongation. **Nature**, v. 459, n. 7243, p. 118-21, 2009.
- SANTO, R. Síntese e caracterização de compostos guanidínicos e estudo da atividade leishmanicida. Presidente Prudente: Universidade Estadual Paulista. 2017.181f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Materiais) Universidade Estadual Paulista - UNESP
- SANTO, R. Síntese, caracterização e estudo do isomerismo E/Z de benzoilguanidinas. Presidente Prudente: Universidade Estadual Paulista. 2013. 240f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Materiais). Universidade Estadual Paulista – UNESP.
- SANTO, R.; Simas, R. C.; Magalhães, A.; Santos, V. G.; Regiani, T.; Isler, A. C.; Martins, N. G.; Eberlin, M. N.; González, E. R. P. Experimental NMR and MS study of benzoylguanidines. Investigation of E/Z isomerism. **J Phys Org Chem**, v. 26, p. 315–321, 2013.
- SAVASTANO, C. et al. *Candida glabrata* among *Candida* spp. from environmental health practitioners of a Brazilian Hospital. **Braz J Microbiol**, v. 47, n. 2, p. 367-72, 2016.
- SCHROEDER, M. et al. *In silico* design, synthesis, and screening of novel deoxyhypusine synthase inhibitors targeting HIV-1 replication. **ChemMedChem**, v. 9, n. 5, p. 940-52, 2014.
- SCHRÖDER, M. et al. Linker-Region Modified Derivatives of the Deoxyhypusine Synthase Inhibitor CNI-1493 Suppress HIV-1 Replication. **Arch Pharm (Weinheim)**, v. 349, n. 2, p. 91-103, 2016.
- SCHULLER, A. P. et al. eIF5A Functions Globally in Translation Elongation and Termination. **Mol Cell**, v. 66, n. 2, p. 194-205.e5, 2017.

- SHI, X. P. et al. Effects of N1-guanyl-1,7-diaminoheptane, an inhibitor of deoxyhypusine synthase, on the growth of tumorigenic cell lines in culture. **Biochim Biophys Acta**, v. 1310, n. 1, p. 119-26, 1996.
- SILVA, A. P. Identificação de Inibidores da Enzima Desoxi-Hipusina Sintase Humana: Triagem *in silico e in vitro*. Araraquara: Universidade Estadual Paulista. 2015. 79f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista – UNESP
- SILVA, C. F. et al. The biological in vitro effect and selectivity of aromatic dicationic compounds on *Trypanosoma cruzi*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 3, p. 239-45, 2010.
- SIONOV, E. et al. Heteroresistance to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* is intrinsic and associated with virulence. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 7, p. 2804-15, 2009.
- SOARES, L. A et al. Anti-Trichophyton Activity of *Protocatechuates* and their synergism with Fluconazole. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.
- SOUZA, S. P.; JORGE, V. M.; XAVIER, M. O. Paracoccidioidomycosis in southern Rio Grande do Sul: a retrospective study of histopathologically diagnosed cases. **Braz J Microbiol**, v. 45, n. 1, p. 243-7, 2014.
- TAYLOR, J. E.; BULL, S. D.; WILLIAMS, J. M. Amidines, isothioureas, and guanidines as nucleophilic catalysts. **Chem Soc Rev**, v. 41, n. 6, p. 2109-21, 2012.
- TAO, Y.; CHEN, K. Y. Purification of deoxyhypusine synthase from *Neurospora crassa* to homogeneity by substrate elution affinity chromatography. **J Biol Chem**, v. 270, n. 1, p. 383-6, 1995.
- UMLAND, T. C. et al. A new crystal structure of deoxyhypusine synthase reveals the configuration of the active enzyme and of an enzyme.NAD.inhibitor ternary complex. **J Biol Chem**, v. 279, n. 27, p. 28697-705, 2004.
- VIEIRA, G. E. D. et al. Paracoccidioidomycosis in a western Brazilian Amazon State: clinical-epidemiologic profile and spatial distribution of the disease. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 47, n. 1, p. 63-8, 2014.
- WOLFF, E. C. et al. Posttranslational synthesis of hypusine: evolutionary progression and specificity of the hypusine modification. **Amino Acids**, v. 33, n. 2, p. 341-50, 2007.
- WOLFF, E. C.; WOLFF, J.; PARK, M. H. Deoxyhypusine synthase generates and uses bound NADH in a transient hydride transfer mechanism. **J Biol Chem**, v. 275, n. 13, p. 9170-7, 2000.

- WORIEDH, M. et al. Preventing *Fusarium* head blight of wheat and cob rot of maize by inhibition of fungal deoxyhypusine synthase. **Mol Plant Microbe Interact**, v. 24, n. 5, p. 619-27, 2011.
- XU, G. et al. Cisplatin sensitivity is enhanced in non-small cell lung cancer cells by regulating epithelial-mesenchymal transition through inhibition of eukaryotic translation initiation factor 5A2. **BMC Pulm Med**, v. 14, p. 174, 2014.
- XUE, F. et al. eIF5A2 is an alternative pathway for cell proliferation in cetuximab-treated epithelial hepatocellular carcinoma. **Am J Transl Res**, v. 8, n. 11, p. 4670-4681, 2016.
- ZANELLI, C. F. et al. eIF5A binds to translational machinery components and affects translation in yeast. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 348, n. 4, p. 1358-66, 2006.
- ZHANG, J. et al. EIF5A1 promotes epithelial ovarian cancer proliferation and progression. **Biomed Pharmacother**, v. 100, p. 168-175, 2018.
- ZHOU, Q. Y. et al. GC7 blocks epithelial-mesenchymal transition and reverses hypoxia-induced chemotherapy resistance in hepatocellular carcinoma cells. **Am J Transl Res**, v. 9, n. 5, p. 2608-2617, 2017.

Local e Data:

Araraquara, 20 de abril de 2018.