

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CAMPUS ARARAQUARA

Potencial Anti-inflamatório de
Pyrenocine A
Isolada do *Penicillium paxilli*:
Abordagem Profilática e Terapêutica

Mestranda: Thaís Regina Toledo

Orientadora: Profa. Dra. Alexandra Ivo de Medeiros

Colaborador principal: Prof. Dr. Roberto G. S. Berlinck

Araraquara

2013

THAÍS REGINA TOLEDO

Potencial Anti-inflamatório de Pyrenocine A
Isolada do *Penicillium paxilli*:
Abordagem Profilática e Terapêutica

Dissertação de tese de Mestrado pelo programa de Biociências e Biotecnologia à Aplicadas a Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia à Aplicadas a Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Alexandra Ivo de Medeiros

Colaborador principal: Prof. Dr. Roberto G. S. Berlinck

Araraquara

2013

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

T649p Toledo, Thaís Regina
Potencial anti-inflamatório de Pyrenocine A isolada *do Penicillium paxilli*: abordagem profilática e terapêutica / Thaís Regina Toledo. – Araraquara, 2013
71 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia
Orientador: Alexandra Ivo de Medeiros

1. Microrganismos marinhos. 2. Potencial anti-inflamatório. 3. Macrófagos. 4. Linfócitos B. 5. MyD88. 6. LPS. I. Medeiros, Alexandra Ivo de, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

Dissertação submetida à coordenação do curso de pós-graduação em Biociências e Biotecnologia à Aplicadas a Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Biociências e Biotecnologia à Aplicadas a Farmácia – área de concentração: Imunologia.

Banca examinadora:

Profa. Dra. Alexandra Ivo de Medeiros

Profa. Dra. Lúcia Helena Faccioli

Dra. Danielle Cardoso Geraldo Maia

Dedico esta dissertação:

*À Deus em primeiro lugar,
a minha família que sempre se fez presente nos momentos
mais difíceis me dando força e incentivo para nunca desistir,
aos amigos pelo companheirismo e amizade.
Sem eles nada disso seria possível.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

A Deus que sempre se fez presente na minha vida, me iluminando e me guiando todos os dias.

A Minha Família que nunca me deixou desistir, que mesmo a distância sempre me deu incentivo, amor, carinho e atenção. Sem eles nada disso seria possível, e eles são a minha razão de viver.

Aos Amigos que sempre se fizeram presente, eles que me deram seus colos para eu chorar quando mais precisei, e por isso sei que esta amizade que construímos é para vida toda.

A Técnica Valéria e toda sua família que é e sempre foi maravilhosa comigo, sempre me acolheu, e me fez sentir parte de sua família, sem falar que sempre cuidou de mim e me ajudou. Minha mãe Valéria meu muito obrigado.

Aos Colegas de laboratório pelo apoio e as risadas nos finais de tarde.

A Minha Orientadora, pois sem ela nada disso seria possível, obrigada por acreditar em mim e por acreditar que eu seria capaz.

Epígrafe

“Aprende que com a mesma severidade com que julga você será em algum momento condenado. Aprende que o tempo não é algo que possa voltar para trás. E você aprende que realmente pode suportar... que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais. E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida.”

William Shakespear

SUMÁRIO

RESUMO	12
ABSTRACT	14
CAPÍTULO 1	15
1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	25
Objetivo Geral	25
Objetivos específicos	25
Delineamento Experimental	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1. Coleta de amostras para o isolamento de microrganismos	27
3.2. Manutenção de linhagens celulares	29
3.2.1. Atividade Citotóxica	29
3.2.2. Estimulação celular: Protocolo profilático de terapêutico.	30
3.2.3. Quantificação de Nitrito (NO₂)	30
3.2.4. Quantificação de citocinas	31
3.2.5. Quantificação dos níveis de Prostagladina E2	31
3.2.6. Citometria de Fluxo	31
3.2.7. Ensaio de proliferação celular (Linfócitos B)	32
3.2.8. Western Blotting	33
3.2.9. Análise estatística	33
4.RESULTADOS	34
5. DISCUSSÃO	58
6. CONCLUSÃO	64
7. REFERÊNCIAS	65
CAPÍTULO 2	68
ANEXO I	69
Aprovação do Comitê de Ética.....	69
ANEXO II	70
Submissão do Artigo Científico	70

LISTA DE ABREVIATURAS

AA - Ácido araquidônico

AP-1 - *Activator Protein 1*

BCR - *B-cell receptor*

CpG - *Cytosine-phospho-guanine*

COX - Ciclooxygenase

cAMP - Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

cPLA2 - Fosfolipase A2 citosólica

CTLA-4 - *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*

DNA - Ácido desoxirribonucleio

DMSO - Dimetilsulfóxido

EP - *Receptor E Prostanoid*

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

HLA - *Human leukocyte antigens*

ICAM - *Intercellular adhesion molecule-1*

IFN- γ - Interferon gama

IL - Interleucina

JNK - *c-Jun N-terminal kinases*

eNOS - Óxido nítrico sintase endotelial

iNOS - Óxido nítrico sintase induzível

IRAK - *Interleukin-1 receptor-associated kinase*

LPS - Lipopolissacarídeo

LBP - *LPS-binding protein (LBP)*

MTT - *3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*

NF κ B - *Nuclear Factor kappa B*

NO - ÓxidoNítrico

PAMPs - *Pathogen-associated molecular patterns*

PGE2 - Prostaglandina E2

PI3K - *Phosphatidylinositol-3*

PRR - *Pattern recognition receptor*

Poly I:C - *Polyinosinic-polycytidylicacid*

ROI - *Reactive oxygen intermediate*

ROS – *Reactive oxygen species*

SBF - Soro bovino fetal

SDS - Dodecilsulfato de sódio

TBST - *Tris-Buffered Saline and Tween 20*

TCD4+ - Linfócito TCD4+

TGF- β - *Transforming growth factor beta*

TLR - *Toll like receptors*

TNF α - Fator de necrosetumoralalfa

Treg - Células T reguladoras

LISTA DE TABELA

1. Tabela1. Compostos isolados de organismos marinhos que apresentam atividade anti-inflamatória.....	17 e 18
---	---------

LISTA DE FIGURAS

1.	Estrutura molecular da Pyrenocine A.....	28
2.	Viabilidade celular.....	35
3.	Efeito anti-inflamatório da Pyrenocine A quanto a produção de NO.....	37
4.	Efeito anti-inflamatório da Pyrenocine A quanto a produção de TNF- α e IL-1 α	39
5.	Efeito anti-inflamatório profilático e terapêutico de Pyrenocine A na expressão da enzima COX-2 em linhagem de macrófagos.....	41
6.	Efeito anti-inflamatório profilático e terapêutico de Pyrenocine A na produção de PGE2 em linhagem de macrófagos.....	42
7.	Efeito anti-inflamatório profilático de Pyrenocine A na modulação da expressão de Mac-1 e B7.2 em linhagem de macrófago.....	45
8.	Efeito anti-inflamatório terapêutico de Pyrenocine A na modulação da expressão de Mac-1 e B7.2 em linhagem de macrófagos.....	47
9.	Efeito anti-inflamatório profilático e terapêutico de Pyrenocine A na modulação da expressão de B7.1 em linhagem de macrófagos.....	49
10.	Efeito anti-inflamatório profilático e terapêutico de Pyrenocine A na modulação da expressão de TLR4 em linhagem de macrófagos.....	51
11.	Efeito imunossupressor de Pyrenocine A na proliferação de Linfócitos B.....	54
12.	Via de sinalização intracelular mediada por TLR4, TLR3 e TLR9.....	55
13.	Efeito anti-inflamatório de Pyrenocine A é mediado por MyD88.....	57

RESUMO

Os organismos marinhos da costa brasileira são pouco explorados como fonte de metabólitos secundários para aplicação farmacológica. São conhecidas aproximadamente 10.000 substâncias do metabolismo secundário de invertebrados e microrganismos marinhos. Dentre os organismos marinhos estudados do ponto de vista químico e farmacológico, destacam-se as esponjas, as ascídias, os briozoários e os octocorais. No entanto, pouco se sabe quanto ao potencial imunomodulador de compostos isolados de microrganismos marinhos, em especial da costa brasileira. Neste estudo, nós identificamos o composto DR(A)6 com potencial anti-inflamatório e após fracionamento foi isolado a substância pura majoritária denominada Pyrenocine A (1), oriunda do fungo marinho *Penicillium paxill*. O conjunto de resultados demonstra que Pyrenocine A é capaz de inibir tanto de maneira profilática como terapêutica a ativação de macrófagos induzida por LPS através da inibição da síntese de nitrito, produção de citocinas inflamatórias e PGE2, porém de maneira independente da modulação de COX-2. Os efeitos supressores desta substância também pode ser comprovado quanto a expressão de moléculas diretamente relacionadas com a migração celular (CD11b) assim como moléculas imprescindíveis para o processo de ativação de linfócitos (B7.1 e B7.2), porém não foi observado a inibição da expressão do receptor TLR4. A inibição da síntese de nitrito pela Pyrenocine A em macrófagos estimulados com CpG, mas não com Poly I:C, sugere que a via de sinalização intracelular pela qual a Pyrenocine A atua é via MyD88. Além disso, nós demonstramos que Pyrenocine A além de exercer efeito supressor em células da resposta imune inata também é capaz de inibir a proliferação de linfócitos B.

No entanto, os mecanismos pelos quais este composto exerce suas funções anti-inflamatórias assim como sua aplicação farmacológica em diferentes modelos experimentais de inflamação aguda e crônica precisam ser elucidados.

ABSTRACT

Marine organisms from Brazilian coast are unexploited as a source of secondary metabolites in applying biotechnology. There are approximately 10,000 known substances from the secondary metabolites from microorganisms and marine invertebrates. Among the marine organisms studied from chemical and pharmacological approaches sponges, sea squirts, bryozoans and octocorals are the relevant source of drugs. However, little is known about the immunomodulatory potential of compounds isolated from marine microorganisms, in particular from Brazilian coast. In this study, we identified the compound DR (A) 6 with potential anti-inflammatory and after fractionation, we identified the majority pure substance, called Pyrenocine A (1), derived from the marine fungus *Penicillium paxilli*. Our results demonstrate that the Pyrenocine A is able to inhibit by both prophylactically and therapeutic approach the macrophages activation induced by LPS through inhibition of nitrite, synthesis of inflammatory cytokines and PGE2 but independently of modulation of COX-2. The anti-inflammatory effect of Pyrenocine A can also be observed by the expression of molecules directly related to cell migration (CD11b) as well as molecules involved in the process of lymphocyte activation (B7.1 and B7.2), but there was no inhibition of the TLR4 expression. The inhibition of nitrite by Pyrenocine A in macrophages stimulated with CpG, but not in the presence of Poly I: C, suggesting that Pyrenocine A act by MyD88 intracellular signaling pathway. Furthermore, we demonstrate that the addition of Pyrenocine A exert a suppressive effect on cells from innate immune response is also able to inhibit of B cells proliferation. However, the mechanisms by which this compound exerts its anti-inflammatory functions as well as their pharmacological application in various experimental models of acute and chronic inflammation need to be elucidated.

1. INTRODUÇÃO

Potencial anti-inflamatório de substâncias isoladas de organismos marinhos

Atualmente existem aproximadamente 22.000 produtos naturais de origem marinha com diferentes atividades farmacológicas como, antibacterianas, antitumorais, anti-angiogênicas, antivirais, antileishmania, anti-inflamatórias e antioxidantes. Entretanto, no Brasil, este campo de investigação tem sido pouco explorado, apesar da riqueza de nossa flora marinha (da Matta, de Souza et al. 2011; Blunt, Copp et al. 2012).

Os estudos relacionados a diferentes organismos marinhos e seus respectivos metabólitos secundários vêm ganhando importância crescente pela variedade de produtos naturais com potentes atividades biológicas. Invertebrados marinhos possuem o sistema imune inato rudimentar e ausência de componentes da imunidade específica o que poderia comprometer a princípio sua sobrevivência contra micro-organismos (Rowley and Powell 2007). Porém, os metabólitos secundários biologicamente ativos destes organismos marinhos exercem um papel chave nos mecanismos de defesa contra os agentes agressores do habitat marinho (Konig, Kehraus et al. 2006; Paul, Arthur et al. 2007). Estes mesmos metabólitos secundários são hoje descritos como uma rica fonte de compostos com diferentes potenciais farmacológicos oriundos desta imensa e desconhecida microfauna e microflora marinha. Somente no ano de 2010 foram isolados 1003 novos compostos com diversas atividades biológicas (Blunt, Copp et al. 2012). Na tabela 1, oriunda da revisão de (Mayer, Rodriguez et al. 2011), resume os diversos compostos de origem marinha com diferentes efeitos anti-inflamatórios, como inibição da síntese de óxido nítrico (NO), da expressão da enzima COX-2 (ciclo-oxigenase 2),

de síntese de citocinas inflamatórias (TNF- α e IL-1) e a ativação de fatores de transcrições como, AP-1 e NF κ B.

Ação Farmacológica	Composto/ organismo*	Atividade Farmacológica	IC50	MMA	Ref.
Anti-inflamatório	Ascidiathiazonas A e B / ascídia	Inibição de neutrófilos humanos por radicais livres in vitro e in vivo	0.44 – 1.55 μ M	Inibição de anion superóxido	(Pearce et al., 2007a)
Anti-inflamatório	Crassumolides A e C / coral mole	Modulação de linhagem de macrófagos ativados por LPS	<10 μ M	Indução NOS e inibição COX-2	(Chao et al., 2008)
Anti-inflamatório	Durumolides A-C / coral mole	Modulação de linhagem de macrófagos ativados por LPS	<10 μ M	Indução NOS e inibição COX-2	(Cheng et al., 2008)
Anti-inflamatório	Frajunolides B e C / coral	Inibição de neutrófilos humanos por radicais livres in vitro e in vivo	>10 μ g/mL *	Inibição Superoxidase anion e elastase	(Shen et al., 2007)
Anti-inflamatório	Gracilaria verrucosa ácidos gordos /alga	Modulação de linhagem de macrófagos ativados por LPS	<20 μ g/mL *	Inibição NO, IL-6 e TNF- α	(Dang et al., 2008)
Anti-inflamatório	ω -3 PUFA/mexilhão	Neutrófilia humana. Inibição lipoxigenase in vitro	ND	Inibição LTB4 e 5-HETE	(Treschow et al., 2007)
Anti-inflamatório	Perithaliacapilari squinone/alga	Inibição de neutrófilos humanos por radicais livres in vitro	2.1 μ M	Inibição Superoxidase anion	(Sansom et al., 2007)
Anti-inflamatório	Rubrolide O/ ascídia	Inibição de neutrófilos humanos por radicais livres in vitro	35 μ M	Inibição Superoxidase anion	(Pearce et al., 2007b)
Anti-inflamatório	Salinipyronone A / bactéria	Inibição de interleucina-5 em células de baço de ratos	10 μ g/mL	Não determinado	(Oh et al., 2008)
Sistema imunológico	Cycloprodigiosi nhydrochloride / bactéria	Inibição de Interleucina-8	1 μ M	Inibição de fator de transcrição AP-1	(Kawauchi et al., 2007)

Sistema imunológico	Lantherans/ esponja	Mobilização da ativação de Ca 2+	0.48 –1.3 µM	Ativação do receptor ionotrópicos P2Y11	(Greve et al., 2007)
Sistema imunológico	Prodigiosin / bactéria	Inibição de iNOS em macrófagos	0.1 µg/ mL	Inibição de fator de transcrição NF-κB	(Huh et al., 2007)
Sistema imunológico	ASLP /molusco	Aumento da proliferação de células de baço	100 µg/ mL	Não determinado	(He et al., 2007)
Sistema imunológico	Hippospongia SP. Quinines/ esponja	Aumento da libertação de IL-8	>1 µg/ mL	Não determinado	(Oda et al., 2007)
Sistema imunológico	Macrosphelide M/fungos	Inibição da adesão celular	33.2 µM	Não determinado	(Yamada et al., 2007)
Sistema imunológico	Peribysin/ fungos	Inibição da adesão celular	11.8 µM	Não determinado	(Yamada et al., 2007)
Sistema imunológico	Querciformolide C/ coral mole	Inibição de Macrófagos: iNOS e COX-2	<10 µM	Não determinado	(Lu et al., 2008)
Sistema imunológico	Thalassospirami de B/bactéria	Inibição de Interleucina- 5	5 µM	Não determinado	(Oh et al., 2007)

MMA = Mecanismos Molecular de Ação.

Tabela 1. Compostos isolados de organismos marinhos que apresentam atividade anti-inflamatória. Dados obtidos da Tabela 1 da revisão "*Marine pharmacology in 2007-8: Marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous system, and other miscellaneous mechanisms of action.*"- (Mayer, Rodriguez et al. 2011).

Dentre os microrganismos marinhos, os actinomicetos são encontrados em simbiose com diferentes invertebrados, em especial esponjas (Barillaro, Bertholet et al. 2004). Dentre os metabólitos secundários isolados dos microrganismos marinhos (aproximadamente 23.000) 45% foram isolados de actinomicetos. No Brasil, o grupo do Prof. Roberto G. Berlinck é um dos pioneiros no estudo de química de microrganismos

marinhos. Hernandez, em colaboração com o grupo de Berlinck, identificaram a partir de amostras de sedimentos marinhos a presença de actinomicetos (*Streptomycescarpaticus*, *S. acrymicini* e *Streptomycescebimarensissp*) e um fungo identificado como *Scoleco basidium arenarium* (Hernandez, Godinho et al. 2000). A análise química do extrato bruto, obtido a partir do cultivo destes microrganismos, resultou no isolamento de diferentes moléculas: lactona da N-Acetyl-gammahidroxicolina (*S. cebimarensis*); N-acetil tiramina (*S. acrymicini*) e dois dipeptídeo leucil-4-hidroxi prolina e 8-amino-[1,4] diazonano-2,5-diona (*S. cebimarensis*), que estão sendo testadas quanto a diferentes atividades biológicas. Dentre os compostos com aplicação farmacológica isolados de membros do grupo actinomicetos (em geral do gênero *Streptomyces*) destacam-se aqueles com atividades antitumorais, como antraciclina, bleomicina, actinomicina D, ácido aureólico e pentostatina entre outras (Newman and Cragg 2007). No entanto, pouco se tem descrito sobre o potencial anti-inflamatório de compostos isolados de actinomicetos e assim como outros microrganismos marinhos. Strangman et al. (2009) avaliaram extratos microbianos marinhos isolados de *Streptomyces sp* quanto à capacidade de modular a síntese de citocinas associados a um padrão de resposta Th2, diretamente envolvidas na patologia da asma. Neste estudo foram isolados dez novos “9-membered bis-lactones”, “splenocins”, com potente atividade supressora da síntese de IL-5, IL-13, TNF- α e IL-1 β por células do baço estimuladas com ovoalbumina (OVA). Os resultados descritos demonstram que estes compostos são tão eficientes quanto dexametasona quanto a capacidade de inibir a síntese de mediadores inflamatórios (Strangman, Kwon et al. 2009). Os resultados obtidos por esse grupo sugerem que compostos isolados de microrganismos marinhos possuem substâncias bioativas com outras atividades farmacológicas, como anti-inflamatória, o que torna o estudo da química de composto

isolado desse ecossistema marinho de grande relevância na busca de novos fármacos (Strangman, Kwon et al. 2009).

Mediadores lipídicos e citocinas em processos inflamatórios

A inflamação é uma resposta complexa do sistema imune do hospedeiro a estímulos nocivos, tais como infecção microbiana, exposição à endotoxinas e lesão tecidual. Os macrófagos residentes estão distribuídos por diferentes tecidos e são considerados as primeiras células de defesa contra agentes agressores e desempenham um papel chave no desenvolvimento do processo inflamatório (Medzhitov 2007; Beutler 2009). Esses fagócitos possuem uma diversidade de receptores na sua superfície que permitem sua interação com diferentes componentes presentes na membrana ou parede celular de micro-organismos, denominados. Dentre estes receptores os denominados receptores de reconhecimento de padrões moleculares (RRP), tais como os TLRs (*Tolllike receptor*), interagem com componentes derivados de patógenos denominados PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) presentes em bactérias, vírus, parasitas e fungos e desempenham um papel chave na ativação destas células. Lipopolissacarídeos (LPS) presentes em bactérias Gram-negativas interagem com TLRs através do complexo CD14/LBP/TLR4 (Medzhitov 2007; Beutler 2009) resultando na ativação de uma complexa cascata bioquímica. Essa interação promove o recrutamento de proteínas kinases como MyD88 e IRAK que culmina na ativação de TRAF6 e subsequentemente de NFκB e AP-1 através do complexo IKK e MAP kinases, respectivamente (Park *et al.*, 2009) levando a síntese de diferentes mediadores solúveis como citocinas, quimiocinas (Akira and Sato 2003; Kumar, Kawai et al. 2009) e metabólitos do ácido araquidônico (AA) (Brock, McNish et al. 2003), assim como a expressão de moléculas de superfície envolvidas na ativação e recrutamento celular (Akira and Sato 2003; Brock, McNish et al. 2003; Medzhitov 2007; Beutler 2009;

Kumar, Kawai et al. 2009; Park, Song et al. 2009). Em células não estimuladas, o NFκB permanece inativo no citoplasma, como um complexo IκB- NFκB. Somente após a estimulação por lipopolissacarídeo (LPS), o IκB citosólico é fosforilado resultando na dissociação do complexo IκB/NFκB e a translocação do NFκB para o núcleo permitindo à interação com regiões promotoras de diversos genes que codificam mediadores pró-inflamatórios (Chang, Chau et al. 2012). A ativação destes genes resulta na produção excessiva de citocinas inflamatórias, como TNF-α, interleucina-1 (IL-1), IL-6, e outros mediadores inflamatórios como óxido nítrico (NO) e prostaglandina E₂ (PGE₂) e desempenham um papel deletério em doenças inflamatórias agudas e crônicas, tais como a aterosclerose e artrite (Shin, Joo et al. 2010).

Prostaglandina E₂ (PGE₂) é o um dos principais mediadores lipídicos inflamatórios envolvido na patogênese de doenças inflamatórias crônicas, como artrite reumatóide (McCoy, Wicks et al. 2002). A síntese deste mediador ocorre a partir de distúrbios na membrana celular levando ao aumento de cálcio intracelular e translocação de fosfolipase A₂ citosólica (cPLA₂) para membrana nuclear, fato que resulta na liberação do ácido araquidônico (AA) a partir de fosfolipídios da membrana nuclear. Os AA liberados podem ser convertidos em PGH₂ na presença de COX-1 (enzima constitutivamente expressa em diferentes tipos celulares) e COX-2 (enzima induzível) e então através da ação das diferentes prostaglandinas sintases gerar as diferentes classes de PGs. Dentre as PGs, a PGE₂, gerada a partir da ação de PGE₂ sintase, é um dos principais mediadores lipídicos sintetizados por macrófagos e outros diferentes tipos celulares na presença de LPS (Brock, McNish et al. 2003). Além da atividade edematogênica das prostaglandinas, a PGE₂ pode agir indiretamente na modulação da síntese de diferentes citocinas e quimiocinas (Gualde and Harizi 2004; Sugimoto, Fukada et al. 2005). Particularmente, a PGE₂ é uma das mais abundantes PG

produzida pelas células de nossos tecidos e exerce sua função através de 4 subtipos de receptores: EP1, EP2, EP3 e EP4. Esses subtipos são receptores associados à proteína G (GPCR) e variam quanto a propriedades de ligação à PGE₂, distribuição tecidual, expressão e tipo de proteínas G e, conseqüentemente a transdução de sinais (Tamba, Yodoi et al. 2008). Dentre esses, EP1, EP2 e EP4 são expressos em altos níveis em células T “naive” em camundongos, enquanto EP3 apresenta uma baixa ou inexistente expressão nesses linfócitos (Nagamachi, Sakata et al. 2007). A ativação e cultura de células T “naive” humanas CD4⁺CD45RO⁻ aumenta a expressão dos receptores EP2 e EP4 (Boniface, Bak-Jensen et al. 2009). EP1 é um receptor acoplado a proteínas G $\alpha_{q/p}$ e promove o aumento de Ca²⁺ intracelular. EP2 e EP4 estão acoplados a subunidade α estimuladora da proteína G (G α_s) e, portanto a ligação de PGE₂ a esses receptores promove o aumento da concentração intracelular de adenosina mono fosfato cíclica (AMPC) que pode modular diversas funções celulares através de interações moleculares (Breyer, Bagdassarian et al. 2001).

PGE₂, através da interação com EP1/EP3, exerce seu papel inflamatório no processo de injúria tecidual e, portanto um dos principais alvos de fármacos com potencial anti-inflamatório no tratamento de reações inflamatórias agudas e crônicas (2012; Sastre and del Pozo 2012).

Moléculas de superfície e ativação de macrófagos

A ativação de NF κ B desencadeada através da interação com LPS, pode resultar no aumento da expressão de moléculas de superfície, como Mac-1 (CD11b/CD18), CD80 e CD86 que desempenham um importante papel na ativação de macrófagos (Ghosh and Saxena 2004; Lee, Rhee et al. 2008). Mac-1 é classificado como uma β 2 integrina da superfamília das imunoglobulinas, sendo um receptor heterodimérico, possui um a cadeia α (CD11b) e uma cadeia β (CD18) expressa na superfície de

macrófagos e outros leucócitos entre outros tipos celulares (Schafer, Pierce et al. 1995; Ehlers 2000). A expressão desta molécula na superfície celular permite a fagocitose de partículas opsonizadas com componentes do sistema complemento e interação com seus respectivos ligantes, assim como o eficiente recrutamento de leucócitos ativados para o local afetado (Li 1999). Além disso, na presença de LPS ocorre o aumento da expressão e a ativação de Mac-1 assim como a expressão de genes que codificam as proteínas COX-2, IL-12 p35, e IL-12 p40 em linhagem celular de macrófagos (Li 1999; Perera, Mayadas et al. 2001).

A ativação de linfócitos T necessita primordialmente de três sinais. O primeiro sinal ocorre através da apresentação de antígenos pela molécula MHC II em células apresentadoras de antígenos (APC). O segundo sinal é oriundo de moléculas coestimuladoras como, CD80 (B7.1) e CD86 (B7.2) (Van Gool, Vandenberghe et al. 1996) e o terceiro sinal é mediado pelas citocinas produzidas no microambiente que será imprescindível para o direcionamento de um padrão de resposta Th1, Th2, Th17 ou T reguladora (Treg). Como macrófagos expressam CD80 constitutivamente e a molécula CD86 é expressa num estado de ativação celular, pode-se dizer que CD80 está envolvida no estado inicial da inflamação, enquanto CD86 esta mais associada com modulação da resposta infamatória (Lu, Wang et al. 1997). Suas funções podem ser antagônicas de acordo com o receptor associado nos linfócitos T. A interação de CD80 e CD86 a CD28 promove a ativação de células T; contudo, se ligados a CTLA-4/CD152, podem regular negativamente a ativação destes linfócitos (Bour-Jordan, Eisenstein et al. 2011).

Pouco se sabe até o momento quanto ao potencial anti-inflamatório de compostos isolados de microrganismos marinhos, em especial daqueles isolados da costa brasileira. Neste estudo, avaliamos o potencial anti-inflamatório de Pyrenocine A

em componentes da resposta imune inata e adaptativa utilizando uma abordagem tanto profilática quanto terapêutica.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Identificação e avaliação do efeito anti-inflamatório da substância pura, Pyrenocine A, utilizando uma abordagem profilática e terapêutica, em linhagens de macrófagos e linfócitos estimulados com LPS.

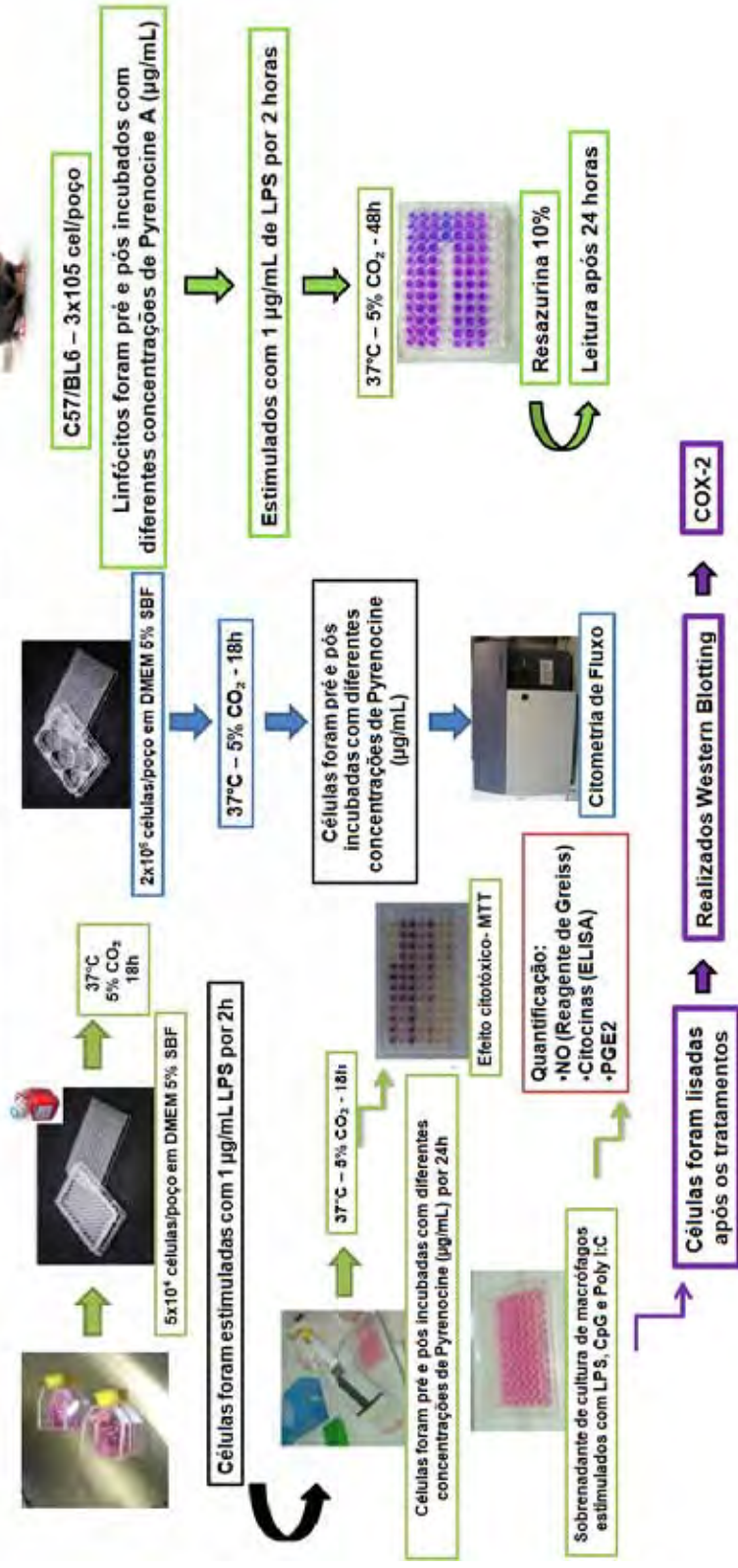
Objetivos específicos

O potencial anti-inflamatório de Pyrenocine A foi determinado utilizando a linhagem de macrófagos estimulados e linfócitos estimulados com LPS avaliando os seguintes parâmetros como estratégia experimental:

1. Determinação da citotoxicidade da Pyrenocine A;
2. Quantificação de citocinas, nitrito e PGE₂;
3. Modulação da expressão de COX-2;
4. Modulação da expressão de moléculas de superfície celular envolvidas no processo de migração e ativação celular, como Mac-1, B7-1, B7-2 e TLR4;
5. Sinalização intracelular dependente e independente de MyD-88;
6. Proliferação de linfócitos B.

Delineamento Experimental

Delineamento Experimental



3. MATERIAIS E MÉTODOS

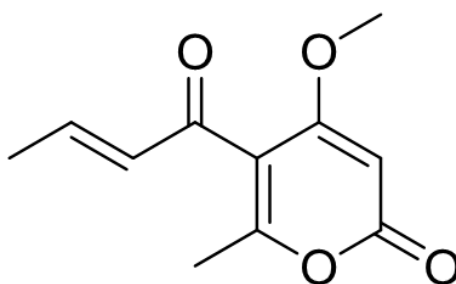
3.1. Coleta de amostras para o isolamento de microrganismos

Todo o processo de produção dos extratos brutos, isolamento das frações e purificação dos compostos isolados foi realizado no Instituto de Química de São Carlos (IQSC) sobre a coordenação do Prof. Dr. Roberto G. S. Berlinck e enviadas para realização dos respectivos testes *in vitro* para o Laboratório de Imunologia FCFAR sobre coordenação da Profa. Dra. Alexandra Ivo de Medeiros. As amostras dos microrganismos marinhos foram devidamente identificadas por códigos e armazenadas a -20°C até o momento da realização do testes *in vitro*.

O fungo *Penicillium paxilli* foi isolado a partir da esponja *Mycale angulosa*. O extrato obtido extração em EtOAc (400 mg) foi separado por cromatografia em sílica de gel ligada por cianopropil (2 g), eluída primeiro com 100% de CH₂Cl₂ (fração Ma (G) K-A, 130,0 mg), em seguida 100% EtOAc (fração Ma (G) K-B, 68,2 mg), em seguida, 100% MeOH (fração Ma (G) K-C, 155,0 mg). A análise por LC/UV/MS indicou a presença de picos com absorção de UV a 220-230 e 280-300 nm, no intervalo de massa entre 240 e 260 Da, da fração Ma(G) K-A. Esta fração foi separada por HPLC usando um C₁₈ de fase reversa em coluna Inertsil ODS-3 (4,6 x 250 mm, 5 µm) e uma gradiente de 1:1 de MeOH/MeCN em ácido fórmico H₂O +0,1%, com uma taxa de 1,0 mL/min e monitorizado a baixa $\lambda = 254$ nm. Esta separação resultou em 6,0 mg de 5-(3-hidroxi-butanoil)-4-metoxi-6-metil-2H-piran-2-ona (pyrenocine B), 42,7 mg de (E)-5-but-2-enoil -4-metoxi-6-metil-2H-piran-2-ona (pyrenocine A) e 0,8 mg de (E)-4-metoxi-5-(3-metoxibut-1-enil)-6-metil- 2H-piran-2-ona, o que representa um novo produto natural para o qual o nome sugerido foi Pyrenocine J. Todos os compostos foram identificados pela análise de dados espectroscópicos e comparação com dados da

literatura (Kossuga, Romminger et al. 2012). Das três substâncias isoladas, a substância majoritária, pyrenocine A ((E)-5-but-2-enoil -4-metoxi-6-metil-2H-piran-2-ona, foi a única capaz de exercer as funções anti-inflamatória obtida previamente com o extrato testado no início dos nossos estudos.

A



(1) Estrutura Química da substância pura Pyrenocine A

Figura 1: Estrutura molecular de Pyrenocine A (1).

3.2. Manutenção de linhagens celulares

A linhagem celular utilizada em todos os experimentos *in vitro* foi a RAW 264.7 previamente obtidas da Coleção Americana de Cultura de Células (ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA). A RAW 264.7 é uma linhagem de macrófagos aderentes derivados de camundongos Balb/c. As células foram armazenadas em nitrogênio líquido em solução de congelamento (soro bovino fetal (SBF) contendo 5% de DMSO). Para os ensaios de citotoxicidade e atividade anti-inflamatória as células foram descongeladas e expandidas em frascos de cultura celular em meio DMEM contendo 10% SBF (soro bovino fetal) e gentamicina (1:1000) à temperatura de 37°C, em estufa incubadora umidificada contendo 5% de CO₂, conforme orientações do ATCC.

3.2.1. Atividade Citotóxica

A substância pura Pyrenocine A liofilizada foi reconstituída em DMSO e então diluída em meio de cultura (DMEM-I) para realização dos subseqüentes bioensaios. Para avaliar a atividade citotóxica da substância pura nas diferentes concentrações testadas, utilizamos o método colorimétrico por MTT (Mosmann 1983) nos protocolos profiláticos e terapêuticos descritos anteriormente no delineamento experimental. As diluições da substância pura que apresentaram atividade citotóxica superior a 5% não foram testadas nos subseqüentes bioensaios.

3.2.2. Estimulação celular: Protocolo profilático de terapêutico.

Foram distribuídas 5×10^4 células RAW 264.7 em placas de 96 poços e submetidas ao protocolo de tratamento profilático e terapêutico. **Protocolo Profilático:** A substância pura Pyrenocine A foi diluída em DMEM-I, nas concentrações entre 0.78 $\mu\text{g/mL}$ – 0.02 $\mu\text{g/mL}$ com diluição na base dois, e em seguida as mesmas foram adicionadas à cultura de macrófagos por 2h. Após esse período de incubação foi adicionado LPS, CpG ou Poly I:C (1 $\mu\text{g/mL}$) à cultura e então incubada por um período de 18h. **Protocolo Terapêutico:** As células foram incubadas com LPS, CpG ou Poly I:C (1 $\mu\text{g/mL}$) por 2 h e em seguida a substância pura Pyrenocine A foi adicionada à cultura nas diluições entre 0.78 $\mu\text{g/mL}$ – 0.02 $\mu\text{g/mL}$ e então incubadas por 18 horas. Após esse período o sobrenadante foi coletado, centrifugado para retirada de células em suspensão e armazenado a -70°C até o momento de quantificação dos mediadores e fatores de interesse.

3.2.3. Quantificação de Nitrito (NO_2)

Para a dosagem de nitrito, 100 μL do reagente de Greiss (solução estoque de NEED a 0,1% (Sigma, St. Louis, MO) e sulfanilamida a 1% em H_3PO_4 5%) foi adicionado a 100 μL de sobrenadante de cultura. Para análise quantitativa dos compostos foram adicionadas soluções contendo nitrito em concentrações entre 3 a 200 μM de nitrito de sódio, conforme descrito previamente por (Lane, Wu-Hsieh et al. 1993). Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, a densidade ótica da solução foi medida em leitor de microplacas em filtro de 540nm (Metertech Inc.,

modelo 960). A quantidade de nitrito no sobrenadante de cultura foi correlacionada aos valores de absorbância obtidos na curva padrão.

3.2.4. Quantificação de citocinas

As citocinas foram quantificadas em sobrenadantes de cultura obtidos empregando o ensaio imunoenzimático (ELISA). IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 e TNF- α foram determinadas utilizando anticorpos específicos (purificados e biotinizados) e citocinas-padrões, de acordo com instruções do fabricante (Opteia B&D Systems, MN, e PharMingen, San Diego, CA). A densidade ótica das soluções foi avaliada em leitor de microplacas com filtro de 490nm e a concentração de citocinas foi calculada a partir da curva padrão.

3.2.5. Quantificação dos níveis de Prostagladina E2

A prostagladina E2 foi quantificada em sobrenadante de cultura utilizando o Kit EIA Prostagladin E2 – monoclonal conforme instruções do fabricante (Cayman Chemical Company). A densidade ótica das soluções foi avaliada em leitor de microplacas com filtro entre 405 e 420nm e a concentração de prostaglandina foi calculada a partir da curva padrão.

3.2.6. Citometria de Fluxo

A expressão de moléculas de superfície, Mac-1, B7-1, B7-2 e TLR-4, foram determinadas após a incubação das células com diferentes concentrações da substância pura nos diferentes protocolos de tratamento, na presença ou ausência de LPS conforme descrito previamente no delineamento experimental. A determinação da expressão

destas moléculas por citometria de fluxo foi realizada como descrito previamente por Medeiros *et al.* (Medeiros, Sa-Nunes et al. 2008). Todas as amostras foram adquiridas utilizando o citômetro de fluxo FACSCanto (Becton and Dickinson, San Jose, CA) e as análises foram realizadas utilizando o programa FACS DIVA.

3.2.7. Ensaio de proliferação celular (Linfócitos B)

Para obtenção de linfócitos, foram utilizadas células do baço de camundongos C57/BL6. Os camundongos são oriundos do CEMIB-UNICAMP e mantidos no biotério do Depto. de Ciências Biológicas em SPF. Os animais foram tratados de acordo com regulamentos do COBEA e o protocolo aprovado pelo CEUA da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP (Protocolo: CEUA/FCF/CAr nº 19/2012). Células do baço isoladas de camundongo foram submetidas ao protocolo de tratamento profilático e terapêutico. Protocolo Profilático: Linfócitos foram pré-tratados com diferentes concentrações da substância pura Pyrenocine A (0.78 a 0.02 µg/mL) por 2 h e então estimulados com LPS (5µg/mL). Protocolo Terapêutico: Linfócitos foram estimulados com LPS (5µg/mL) e após 24 h incubados com diferentes concentrações de Pyrenocine A. Ao final de 48 h de cultura, nas diferentes condições apresentadas, foi adicionada à cultura a resazurina 10% (v/v) AlamarBlue (TREK Diagnostic Systems) e após 24 horas a proliferação foi determinada pela leitura da absorbância (570/600nm). A determinação da proliferação de linfócitos foi calculado de acordo com a seguinte fórmula: Δ absorbância = leitura a 570nm – leitura a 600nm como descrito previamente por Czekanska (Czekanska 2011).

3.2.8. Western Blotting

Após a estimulação das células, estas foram lavadas com PBS gelado e 100 µl de tampão de lise (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 125 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM MgCl₂, 25 mM α- glicerofosfato, 50 mM NaF, 10 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, 10 mg/mL leupepetina, 10 mg/mL de aprotina) foram adicionados a cada poço. Após a adição de volumes adequados de tampão de amostra para SDS-PAGE, as mesmas foram desnaturadas a 100°C por 5 min. A eletroforese das amostras foi feita em gel de poliacrilamida-10% SDS seguido de transferência para membranas de nitrocelulose. A ligação inespecífica foi bloqueada com TBS-T (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150mM NaCl, 0,1% Tween 20) contendo 5% de leite sem gordura, por 1 hora a temperatura ambiente. Depois da incubação com os anticorpos específicos anti-COX-2 e anti-β-actina (Millipore) as membranas foram lavadas três vezes com TBS-T. O anticorpo secundário foi incubado por 1 h. Em seguida as membranas serão novamente lavadas três vezes com TBS-T e as membranas relevadas com reagente ECL (GE, Healthcare Life sciences).

3.2.9. Análise estatística

Os resultados foram apresentados como a média ± EPM de ao menos três experimentos individuais realizado em quadruplicatas (PGE₂, Nitrito, citocinas). A análise estatística determinada utilizando o programa GraphPadPrism- Instat 4. Para comparações entre três ou mais grupos experimentais aplicou-se ANOVA seguido de teste de comparação múltipla Bonferroni. Foram consideradas diferenças estatisticamente significativas com $p \leq 0,05$.

4.RESULTADOS

Pyrenocine A: Viabilidade celular

Células RAW 264-7 foram avaliadas quanto à citotoxicidade celular tratadas com Pyrenocine A utilizando os diferentes protocolos, profilático e terapêutico, na presença de LPS. Os resultados aqui apresentados demonstram que independente do protocolo utilizado, profilático ou terapêutico, as células tratadas com Pyrenocine A em concentrações inferiores a 1.56 µg/mL apresentaram 100% de viabilidade celular. O tratamento das células na concentração de 1.56 µg/mL apresentou uma redução na viabilidade celular, ~ 90 - 95% (dados não mostrados). Como a morte celular poderia refletir em resultados falsos negativos nos ensaios relacionados ao potencial anti-inflamatórios da Pyrenocine A, optamos por utilizar apenas as concentrações da substância obtivemos resultados com 100% de viabilidade celular em nossos ensaios subsequentes (Figura 2).

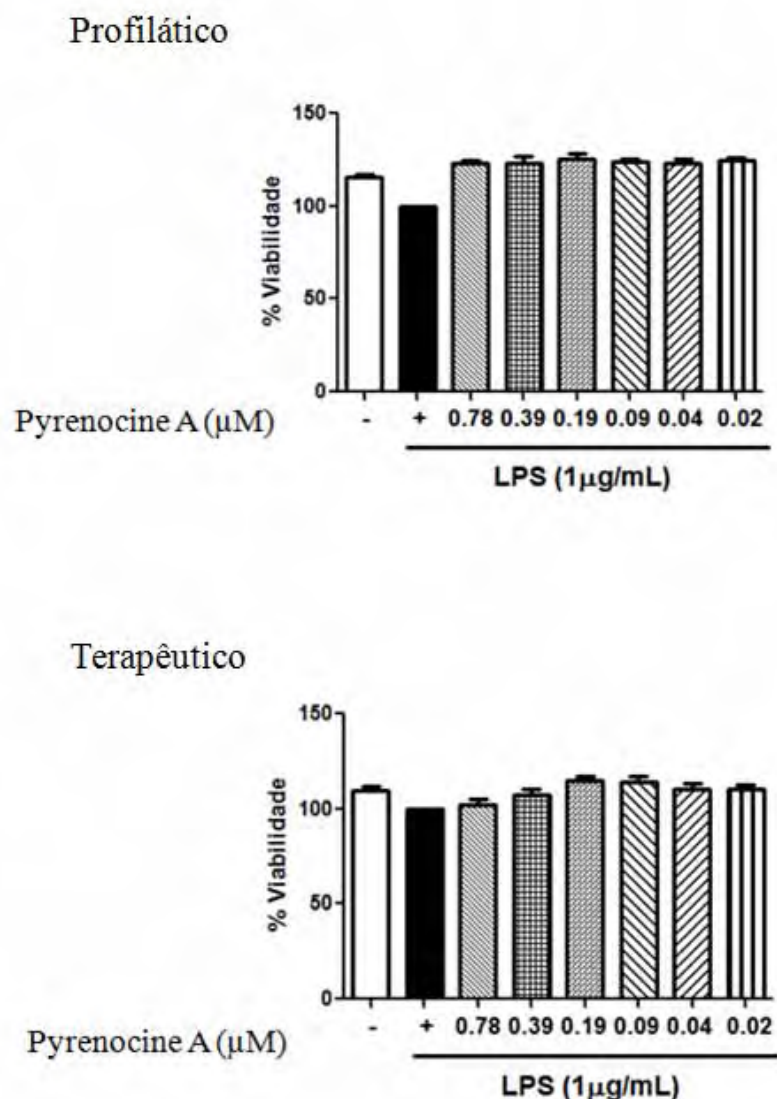


Figura 2: Viabilidade celular em RAW 264-7 na presença de. A linhagem de macrófagos RAW 264-7 foi avaliada quanto à citotoxicidade por MTT. Profilático: As células foram pré-tratadas por 2h com diferentes concentrações da substância pura (0.78 – 0.02 $\mu\text{g/mL}$) e em seguida estimuladas com LPS (1 $\mu\text{g/mL}$). Terapêutico: As células foram estimuladas por 2h LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) e então incubadas com diferentes concentrações da substância pura (0.78 – 0.02 $\mu\text{g/mL}$). Experimento representativo de 5 experimentos independentes realizados em quadruplicatas.

Efeito de Pyrenocine A na modulação da produção de NO₂ por macrófagos

Após a determinação das concentrações não tóxicas da Pyrenocine A em macrófagos, a substância foi avaliada quanto à modulação da produção de óxido nítrico (NO) por células RAW 264-7 na presença do estímulo inflamatório, LPS. Os resultados apresentados demonstram que a estimulação de macrófagos por LPS induz a síntese de altos níveis de NO quando comparado com células incubadas apenas com meio de cultura. No entanto, tanto o pré-tratamento (Estratégia Profilática) como o pós-tratamento (Estratégia Terapêutica) de macrófagos com Pyrenocine A na presença de LPS foram eficientes em inibir a síntese de NO de maneira concentração dependente quando comparado com macrófagos apenas estimulados com LPS (Figura 3). Vale ressaltar que o efeito anti-inflamatório da Pyrenocine A na produção de NO foi potente mesmo em baixas concentrações da substância. No entanto, o efeito anti-inflamatório em relação a produção de NO foi mais pronunciado na estratégia terapêutica do que na estratégia profilática, mostrando o potencial desta substância para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas.

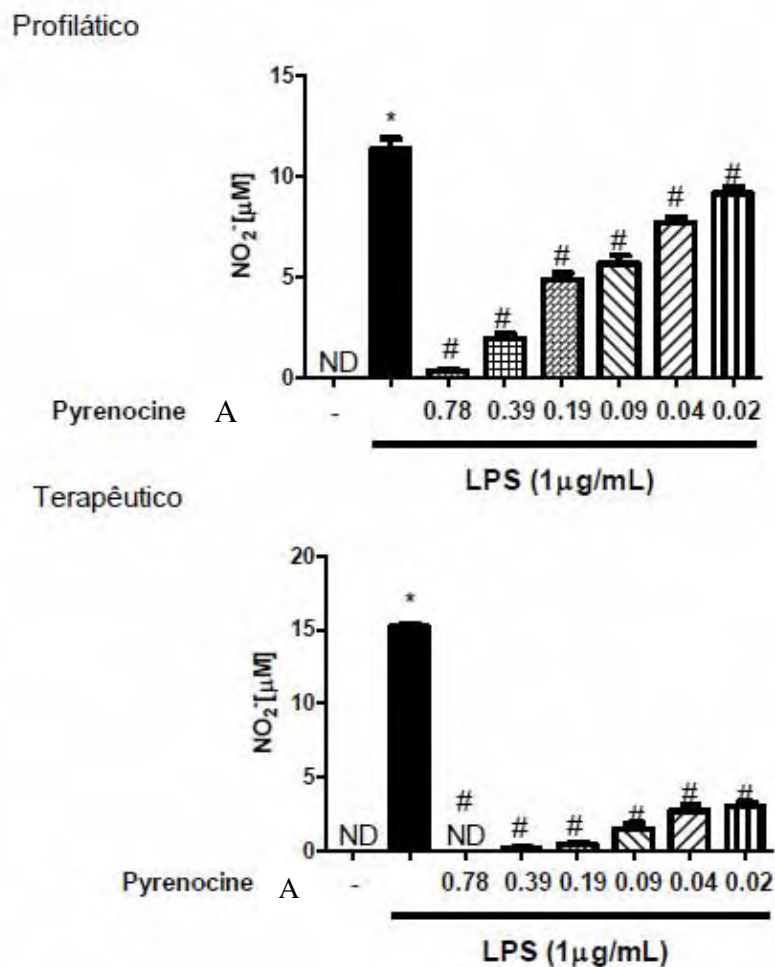


Figura 3: Efeito anti-inflamatório da Pyrenocine A na produção de NO. Profilático: As células foram pré-tratadas por 2h com diferentes concentrações da substância pura (0.78 – 0.02 µg/mL) e em seguida estimuladas com LPS (1 µg/mL). Terapêutico: As células foram estimuladas por 2h com LPS (1 µg/mL) e então incubadas com diferentes concentrações da substância pura (0.78 – 0.02 µg/mL). Após esse período o sobrenadante foi coletado e a concentração de nitrito foi determinada através do reagente de Greiss. Os resultados correspondem à média ± EPM de seis experimentos independentes realizados em quadruplicatas para cada uma das condições. * $p < 0,05$ vs meio (controle) # $p < 0,05$ vs LPS. (ANOVA seguido de Bonferroni). ND = não detectável.

Efeito de Pyrenocine A na modulação da produção de citocinas por macrófagos

Nosso próximo passo foi avaliar o efeito de Pyrenocine A na modulação de citocinas utilizando os dois diferentes protocolos de tratamentos. Os resultados obtidos demonstram que na presença de LPS, macrófagos secretam altos níveis de TNF- α e IL-1 α quando comparados com células incubadas apenas com meio de cultura (Figura 4). A síntese destas citocinas inflamatórias foi inibida de maneira dose dependente quando macrófagos receberam o pré-tratamento (estratégia profilática) ou o pós-tratamento (estratégia terapêutica) com Pyrenocine A na presença de LPS. Vale ressaltar, que o efeito inibitório de Pyrenocine A, em relação à síntese de TNF- α e IL-1- α , foi mais efetivo quando utilizada a estratégia terapêutica que a profilática (Figura 4). No entanto, o tratamento de macrófagos com Pyrenocine A na presença de LPS não foi capaz de modular a síntese de outras citocinas inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e IL-12, tão pouco teve efeito na modulação da síntese de IL-10 (citocina anti-inflamatória) (dados não mostrados).

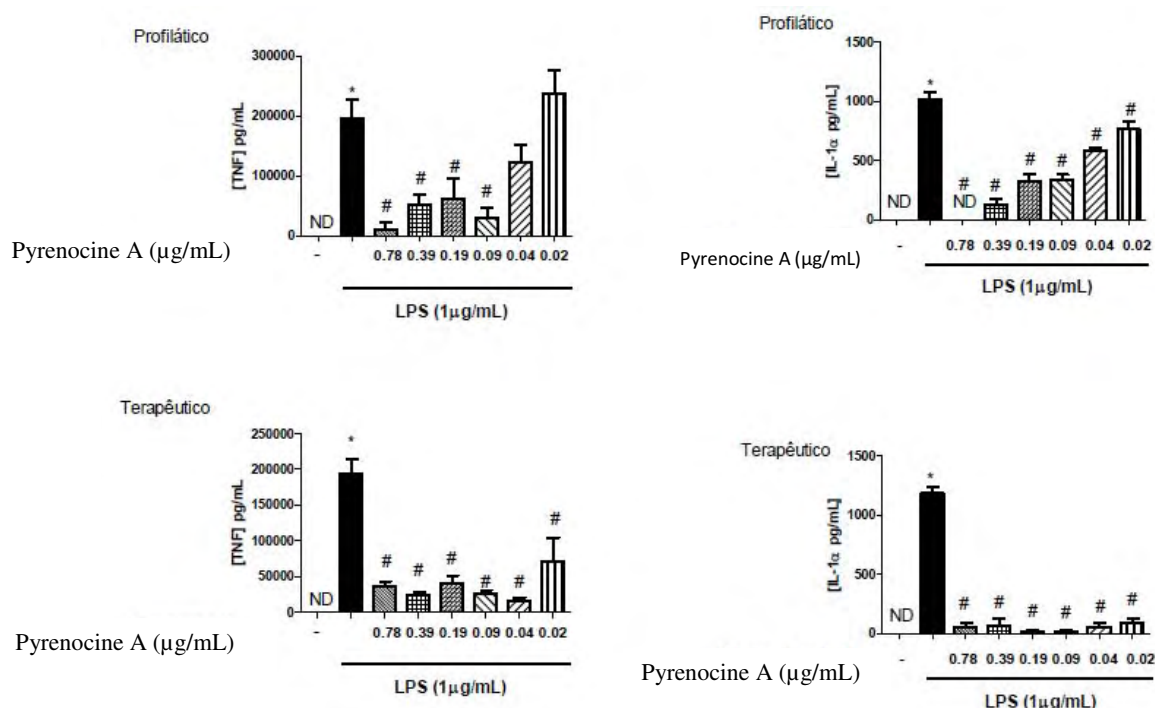


Figure 4. Efeito anti-inflamatório da Pyrenocine A na produção de TNF- α e IL-1 α .

Profilático: As células foram pré-tratadas por 2h com diferentes concentrações da substância pura (0.78 – 0.02 $\mu\text{g/mL}$) e em seguida estimuladas com LPS (1 $\mu\text{g/mL}$).

Terapêutico: As células foram estimuladas por 2h LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) e então incubadas com diferentes concentrações da substância pura (0.78 – 0.02 $\mu\text{g/mL}$). Após esse período o sobrenadante foi coletado e empregamos o ensaio imuno-enzimático (ELISA) para a quantificação das citocinas. Os resultados correspondem à média \pm EPM de seis experimentos independentes realizados em quadruplicatas para cada uma das condições.

* $p < 0,05$ vs meio (controle) # $p < 0,05$ vs LPS. (ANOVA seguido de Bonferroni). ND = não detectável.

Pyrenocine A inibe a síntese de PGE₂, mas não a expressão da enzima COX-2

A estimulação de macrófagos na presença de LPS induz a síntese não apenas de mediadores inflamatórios como NO e citocinas inflamatórias, mas também de mediadores lipídicos como PGE₂. PGE₂ é o principal mediador lipídico inflamatório envolvido na patogênese de doenças inflamatórias crônicas, como artrite reumatóide (McCoy, Wicks et al. 2002). Desta forma, além das citocinas inflamatórias e NO, fomos avaliar a capacidade de Pyrenocine A em modular a expressão de COX-2 e a síntese de PGE₂ em macrófagos estimulados com LPS.

Os resultados obtidos demonstram que o tratamento de macrófagos com LPS foi capaz de promover a expressão da enzima COX-2 quando comparado com células não estimuladas (meio = M) (Figura 5). No entanto, o tratamento de macrófagos com Pyrenocine A utilizando tanto o protocolo profilático como o terapêutico, na presença de LPS, não foi capaz de inibir a expressão da enzima COX-2 quando comparado com células apenas estimuladas com LPS (Figura 5).

Assim como observado para COX-2, a estimulação de macrófagos com LPS induziu a síntese de altas concentrações de PGE₂ quando comparado com células incubadas com meio. Surpreendentemente, o tratamento de macrófagos com Pyrenocine A utilizando o protocolo profilático foi capaz de inibir a síntese de PGE₂ em ~50 -30% quando comparado com células apenas estimuladas com LPS (Figura 6 A). No entanto, apesar de observamos uma tendência quanto à inibição de PGE₂ no protocolo de tratamento terapêutico com Pyrenocine A, quando comparado com macrófagos apenas estimulados com LPS, estes resultados não foram estatisticamente significativos (Figura 6 B).

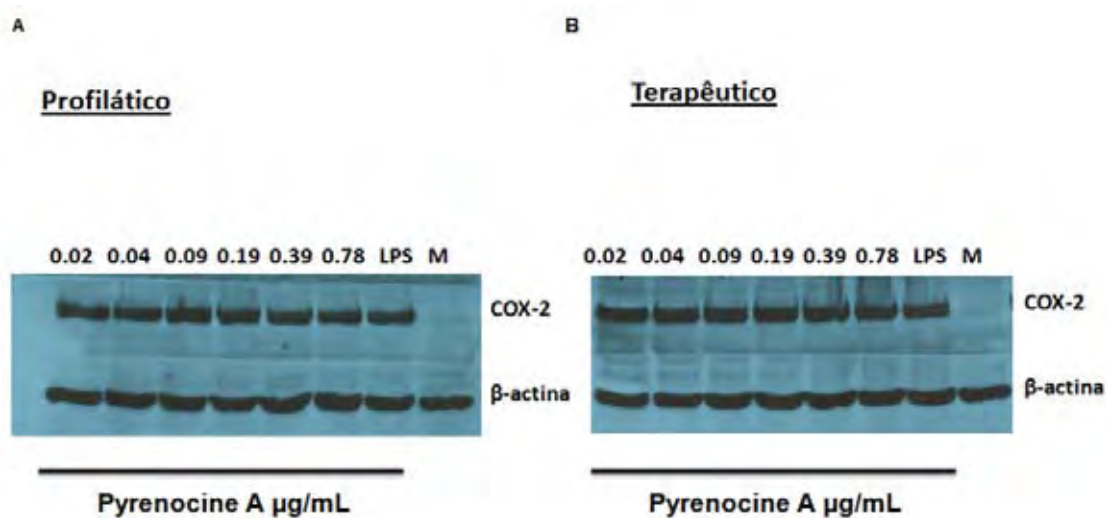


Figura 5: Efeito de Pyrenocine A na expressão da enzima COX-2 em linhagem de macrófagos. (A) RAW 264-7 foi pré-incubada com a substância pura, Pyrenocine A, em diferentes concentrações (0.78 – 0.09 µg/mL) e após 2h estimuladas com LPS (1 µg/mL) por 18h. (B) RAW 264-7 foram estimuladas com LPS (1 µg/mL) após 2 h, incubada com a substância pura, Pyrenocine A, em diferentes concentrações (0.78 – 0.09 µg/mL) por 18h. A expressão de COX-2 e β-actina foi avaliada por *immunoblotting*. Experimento representativo de 3 experimentos independentes.

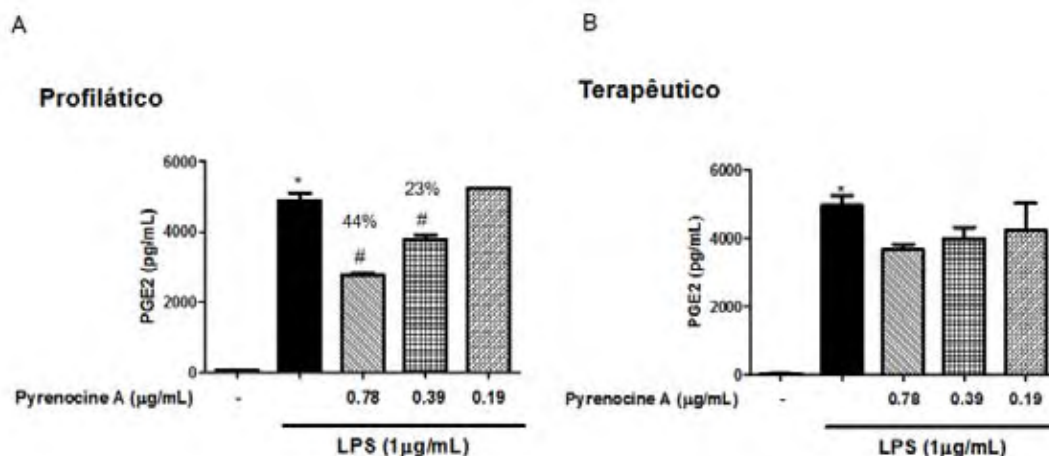


Figura 6: Efeito anti-inflamatório profilático e terapêutico de Pyrenocine A na produção de PGE2 em linhagem de macrófagos. (A) RAW 264-7 foi pré-incubada com a substância pura, Pyrenocine A, em diferentes concentrações (0.78 – 0.09 µg/mL) e após 2h estimuladas com LPS (1 µg/mL) por 18h. (B) RAW 264-7 foram estimuladas com LPS (1 µg/mL) após 2 h, incubada com a substância pura, Pyrenocine A, em diferentes concentrações (0.78 – 0.09 µg/mL) por 18h. Após esse período o sobrenadante foi coletado e foi realizada a avaliação da produção de PGE2. Experimento representativo de 3 experimentos independentes.

Pyrenocine A modula a expressão de moléculas de superfície envolvidas na ativação e migração celular

Nosso próximo passo foi avaliar se além da modulação de mediadores solúveis inflamatórios, a substância pura, Pyrenocine A, era capaz de modular a expressão de moléculas de superfície diretamente envolvidas tanto na migração como na ativação de macrófagos.

Os resultados apresentados demonstram que a estimulação de macrófagos com LPS resultou no aumento tanto a expressão de Mac-1 (CD11b) como B7-1 e apenas modestamente a expressão de B7.2 e TLR-4 quando comparado com células incubadas apenas com meio de cultura (Figura 7,8, 9 e 10).

Além disso, tanto o pré-tratamento como o pós-tratamento de macrófagos com Pyrenocine A foi capaz de inibir a mediana da intensidade de fluorescência (MIF), ou seja, o número de moléculas na superfície celular, tanto de CD11b quanto de B7-1 na superfície de macrófagos estimulados com LPS. Vale ressaltar que os resultados obtidos no protocolo de tratamento profilático, a expressão de CD11b em macrófagos foi inibida em níveis semelhantes a células estimuladas apenas com meio de cultura (Figura 7, 8, 9). Quanto a expressão de B7.1, apesar de ambos protocolos de tratamento com Pyrenocine A serem eficientes em inibir a expressão desta molécula na superfície de macrófagos quando comparado com células tratadas com LPS, o tratamento profilático foi mais efetivo em promover a inibição de B7.1 ainda em baixas concentrações Pyrenocine A (Figura 9). O tratamento de macrófagos com Pyrenocine A na presença de LPS resultou apenas em uma modesta inibição da expressão de B7.2 na superfície de macrófagos (Figura 7 e 8).

A modulação da expressão de TLR-4 em macrófagos pelo tratamento com Pyrenocine A também foi avaliada. A expressão de TLR-4 na superfície de macrófagos

obtendo por tanto duas subpopulação, uma perfil populacional com uma baixa expressão de TLR-4 (rosa) e outra população com uma alta expressão de TLR-4 (azul). Os resultados apresentados demonstram que o tratamento de macrófagos com Pyrenocine A, utilizando tanto o protocolo profilático como terapêutico, não foi capaz de modular a porcentagem de células positivas para TLR4 (Figura 10) tão pouco a MIF nas superfícies destas células (dados não mostrados).

Efeito profilático de Pyrenocine A – Modulação da expressão de Mac-1 e B7-2

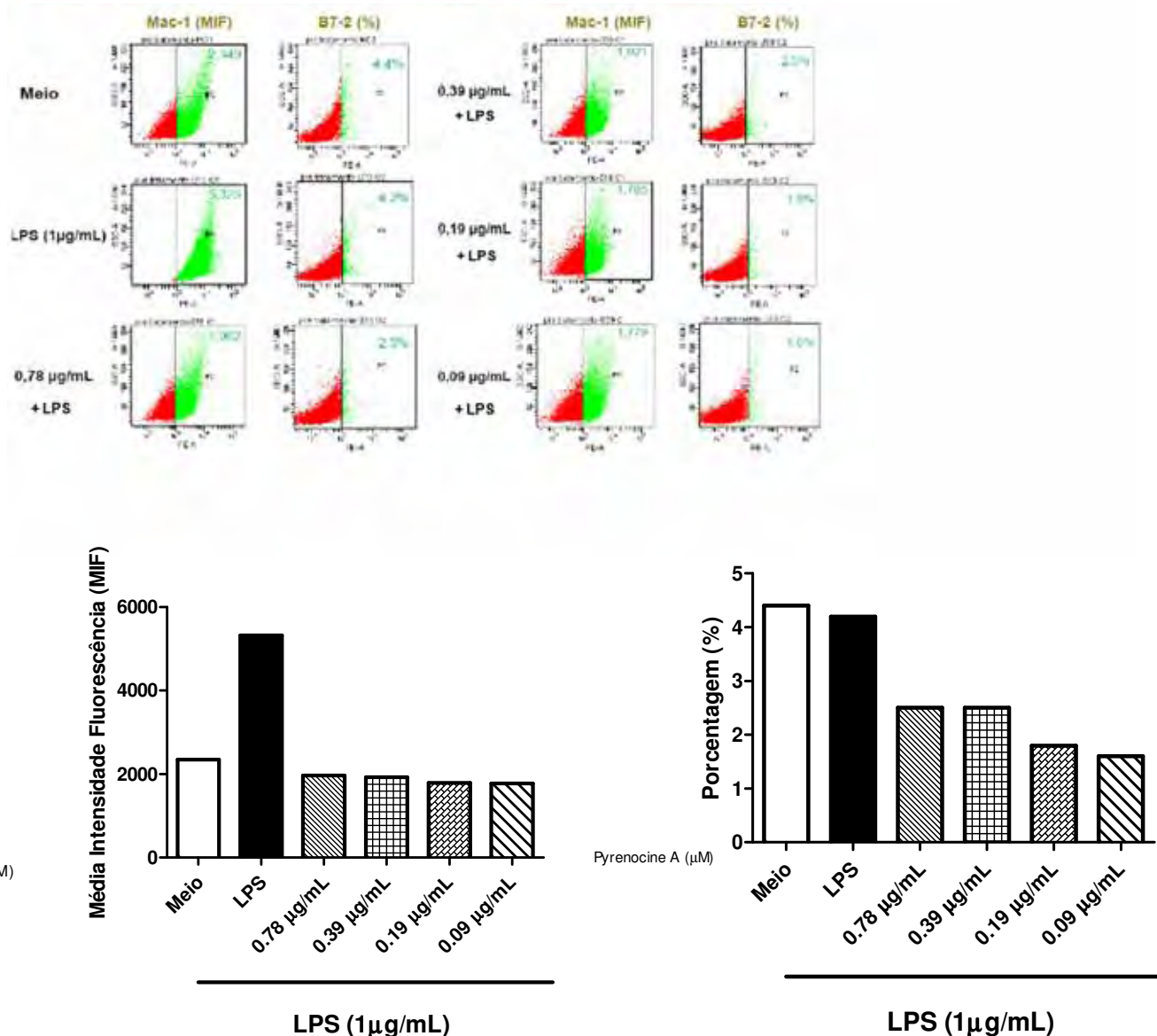


Figura 7: Efeito anti-inflamatório profilático de Pyrenocine A na modulação da expressão de Mac-1 e B7.2 em linhagem de macrófago. RAW 264-7 foram pré-incubada com Pyrenocine A em diferentes concentrações (0.78 – 0.09 µg/mL) e após 2h estimuladas com LPS (1 µg/mL) por 18h. Após esse período as células foram avaliadas quanto à expressão de moléculas de superfície como Mac-1 (MIF – Mediana da Intensidade de Fluorencência) e B7-2 (Porcentagem de células positivas). Todas as amostras foram adquiridas utilizando o citometria de fluxo FACSCanto e as análises

foram realizadas utilizando o programa BD FACSDiva™ software. Experimento representativo de 3 experimentos independentes.

Efeito terapêutico de Pyrenocine A – Modulação da expressão de Mac-1 e B7-2

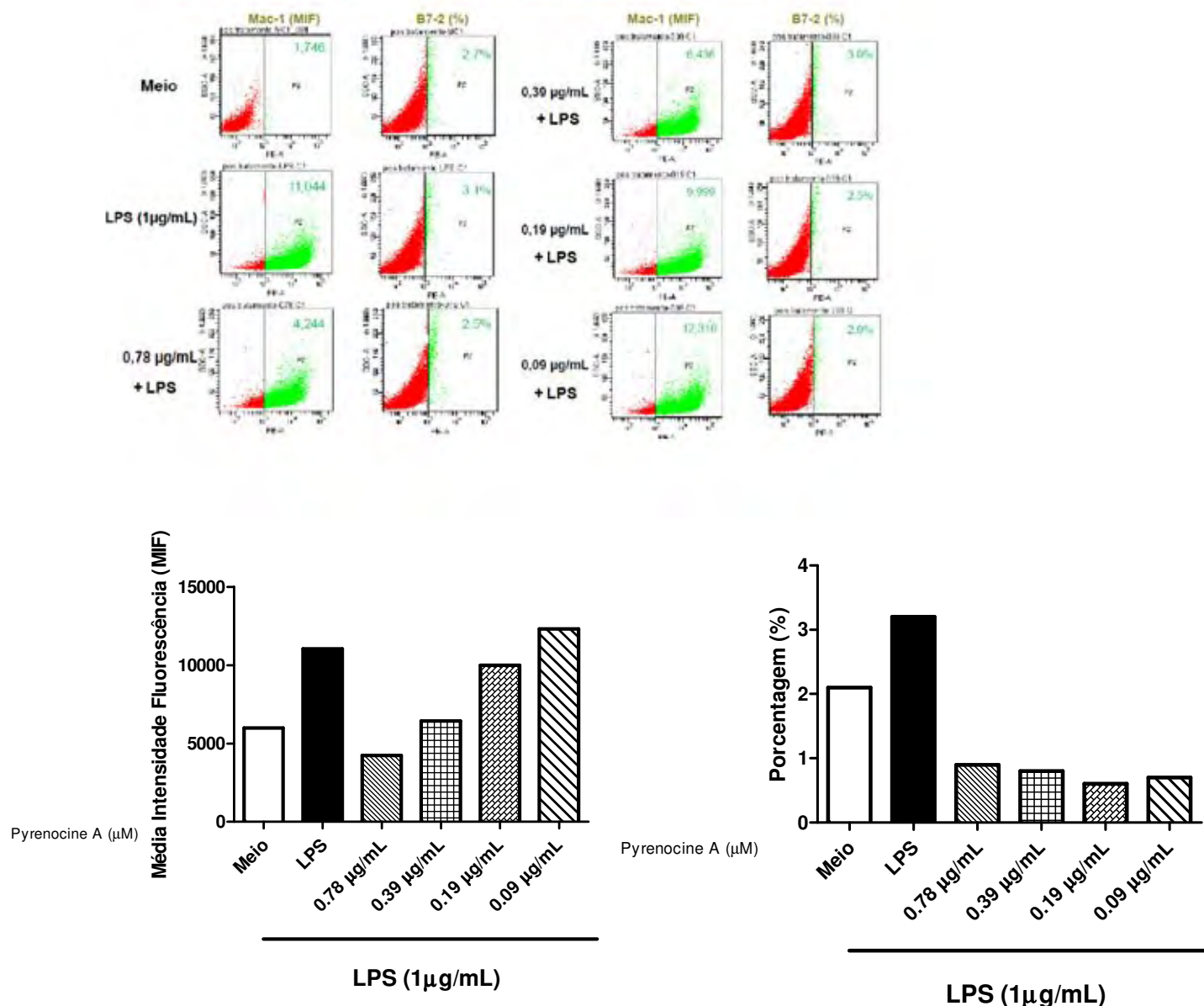
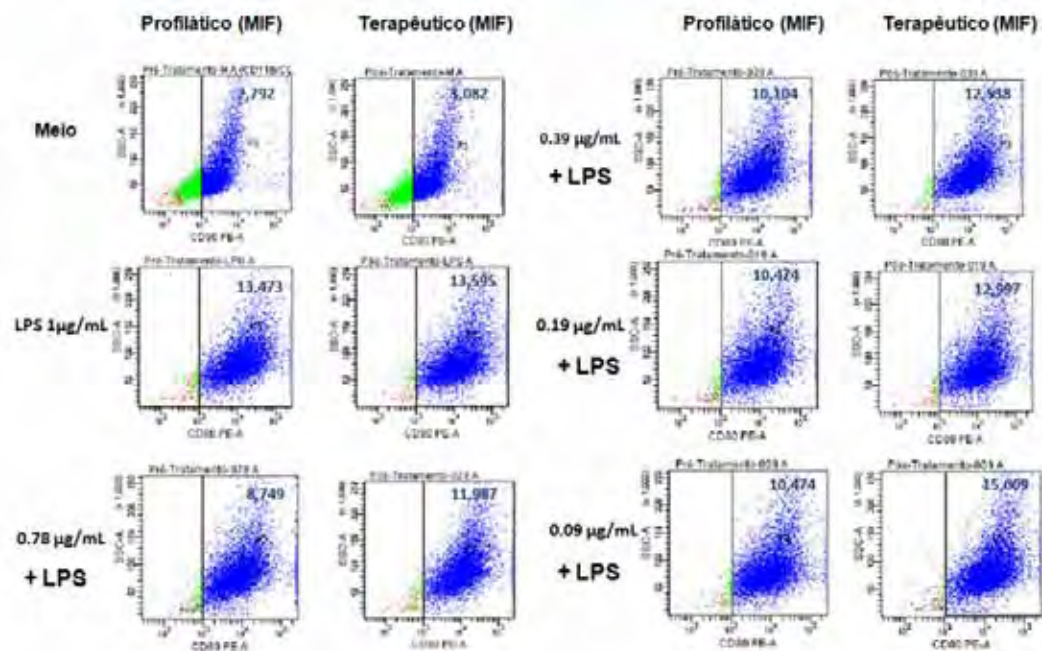


Figura 8: Efeito anti-inflamatório terapêutico de Pyrenocine A na modulação da expressão de Mac-1 e B7.2 em linhagem de macrófagos. RAW 264-7 foram estimuladas com LPS (1 µg/mL) após 2 h, incubada com a substância pura, Pyrenocine A, em diferentes concentrações (0.78 – 0.09 µg/mL) por 18h. Após esse período as células foram avaliadas quanto à expressão de moléculas de superfície como Mac-1 e B7-2. Todas as amostras foram adquiridas utilizando o citometria de fluxo FACSCanto

e as análises foram realizadas utilizando o programa BD FACSDiva™ software.
Experimento representativo de 3 experimentos independentes.

Efeito profilático e terapêutico de Pyrenocine A - Modulação da expressão de B7-1



Profilático

Terapêutico

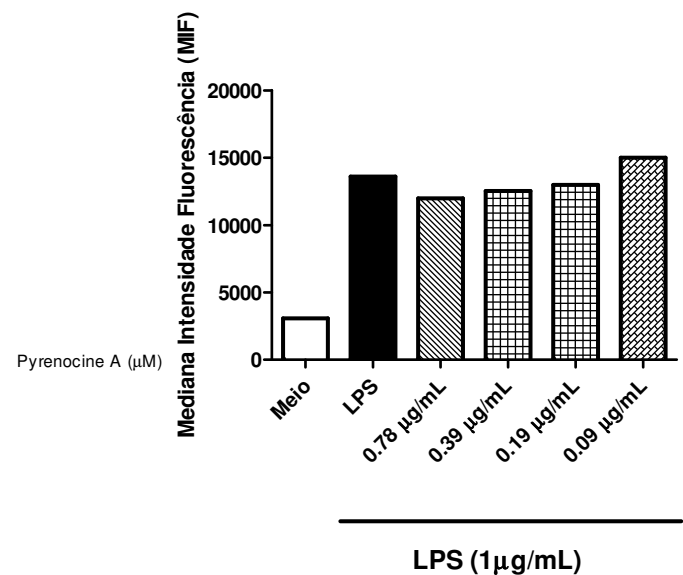
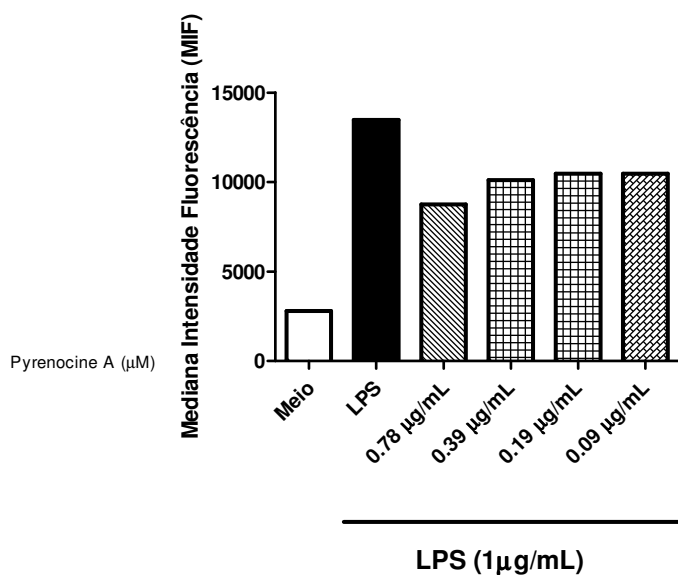
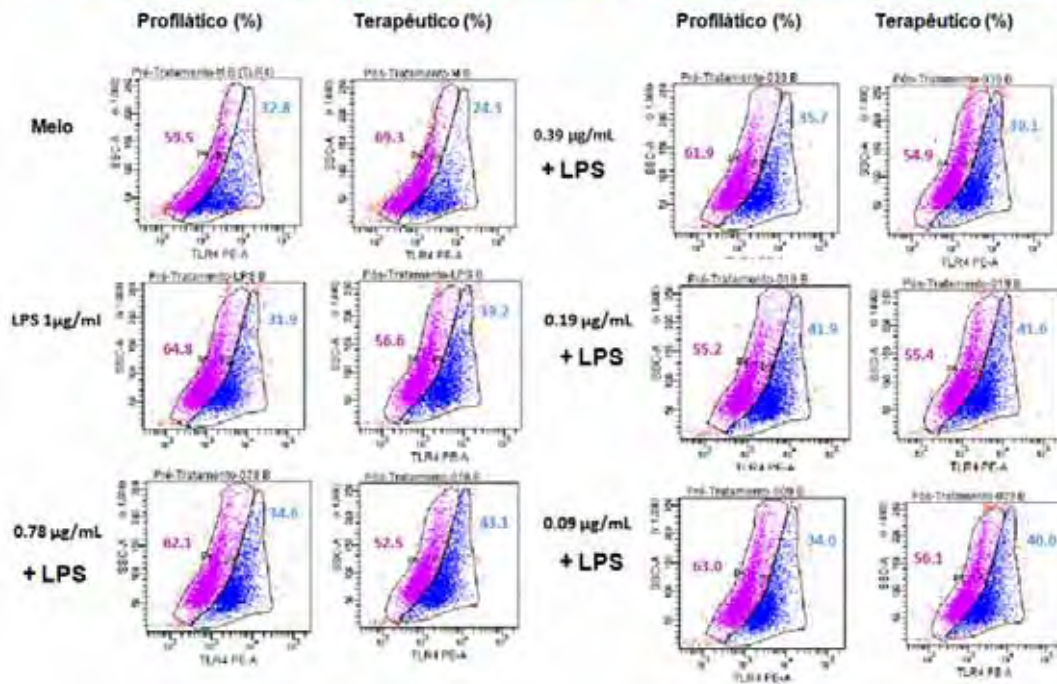


Figura 9: Efeito anti-inflamatório profilático e terapêutico de Pyrenocine A na modulação da expressão de B7.1 em linhagem de macrófagos. RAW 264-7 foi pré-incubada com a substância pura, Pyrenocine A, em diferentes concentrações (0.78 – 0.09 $\mu\text{g/mL}$) e após 2h estimuladas com LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) por 18h. RAW 264-7 foram estimuladas com LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) após 2 h, incubada com a substância pura, Pyrenocine A, em diferentes concentrações (0.78 – 0.09 $\mu\text{g/mL}$) por 18h. Após esse período as células foram avaliadas quanto à expressão de moléculas de superfície como B7-1. Todas as amostras foram adquiridas utilizando o citometria de fluxo FACSCanto e as análises foram realizadas utilizando o programa BD FACSDiva™ software. Experimento representativo de 3 experimentos independentes.

Efeito profilático e terapêutico de Pyrenocine A - Modulação da expressão de TLR4



Profilático

Terapêutico

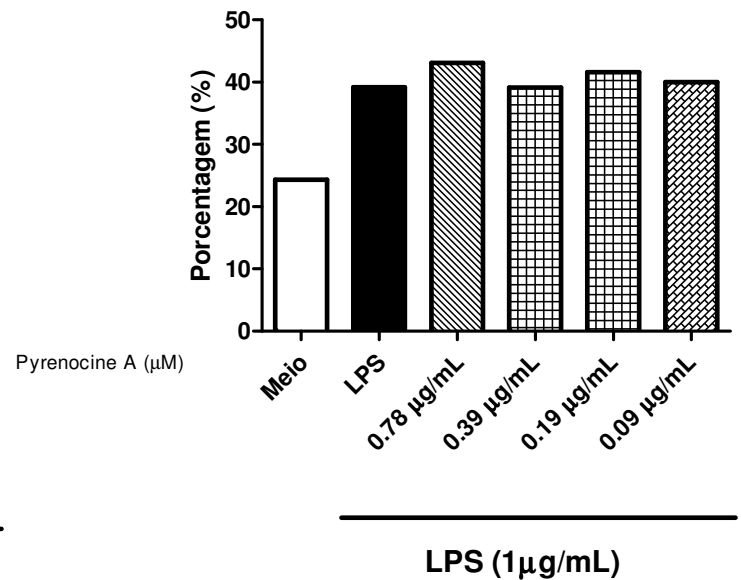
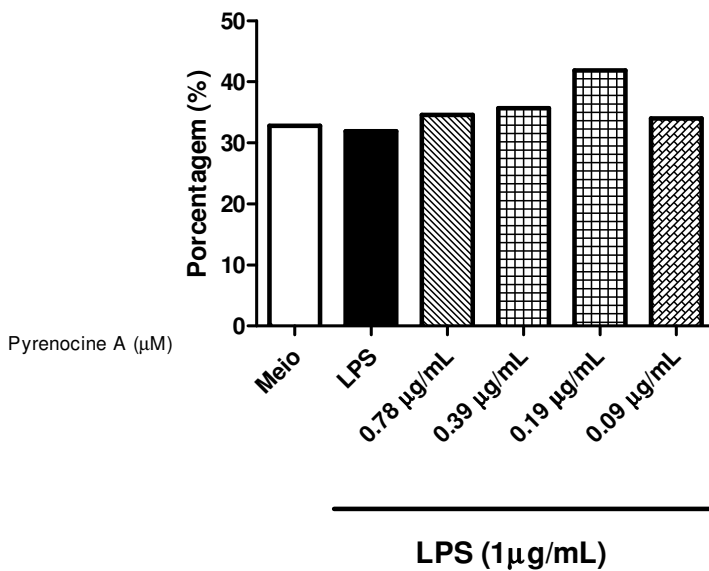


Figura 10: Efeito anti-inflamatório profilático e terapêutico de Pyrenocine A na modulação da expressão de TLR4 em linhagem de macrófagos. RAW 264-7 foi pré-incubada com a substância pura, Pyrenocine A, em diferentes concentrações (0.78 – 0.09 $\mu\text{g/mL}$) e após 2h estimuladas com LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) por 18h. RAW 264-7 foram estimuladas com LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) após 2 h, incubada com a substância pura, Pyrenocine A, em diferentes concentrações (0.78 – 0.09 $\mu\text{g/mL}$) por 18h. Após esse período as células foram avaliadas quanto à expressão de moléculas de superfície como TLR4. Marcação Rosa: sub-população de macrófagos com baixa expressão de TLR-4. Marcação azul: sub-população de macrófagos com alta expressão de TLR-4. Todas as amostras foram adquiridas utilizando o citometria de fluxo FACSCanto e as análises foram realizadas utilizando o programa BD FACSDiva™ software. Experimento representativo de 3 experimentos independentes.

Efeito anti-inflamatório de Pyrenocine A na proliferação de Linfócitos B

Células do baço foram submetidas ao protocolo de tratamento profilático e terapêutico. Protocolo Profilático: linfócitos foram pré-tratados com diferentes concentrações de Pyrenocine A por 2 h e então estimulados com LPS (Figura 11A). O tratamento das células com LPS induziu um aumento da proliferação de linfócitos B quando comparado com células incubadas com meio. No entanto, o pré-tratamento destas células com Pyrenocine A inibiu modestamente, porém estatisticamente significativo, a proliferação de linfócitos B quando comparado com os estimulados apenas com LPS (Figura 11A).

Para avaliarmos o efeito terapêutico da Pyrenocine A, linfócitos foram estimulados com LPS e após 24 h incubados com diferentes concentrações da substância pura Pyrenocine A. Os resultados apresentados demonstram que diferente da modesta supressão da proliferação de linfócitos observada no protocolo profilático, o tratamento com Pyrenocine A após a estimulação celular resultou numa intensa supressão da proliferação de linfócitos (~40 – 70%) quando comparado apenas com linfócitos estimulados com LPS (Figura 11B).

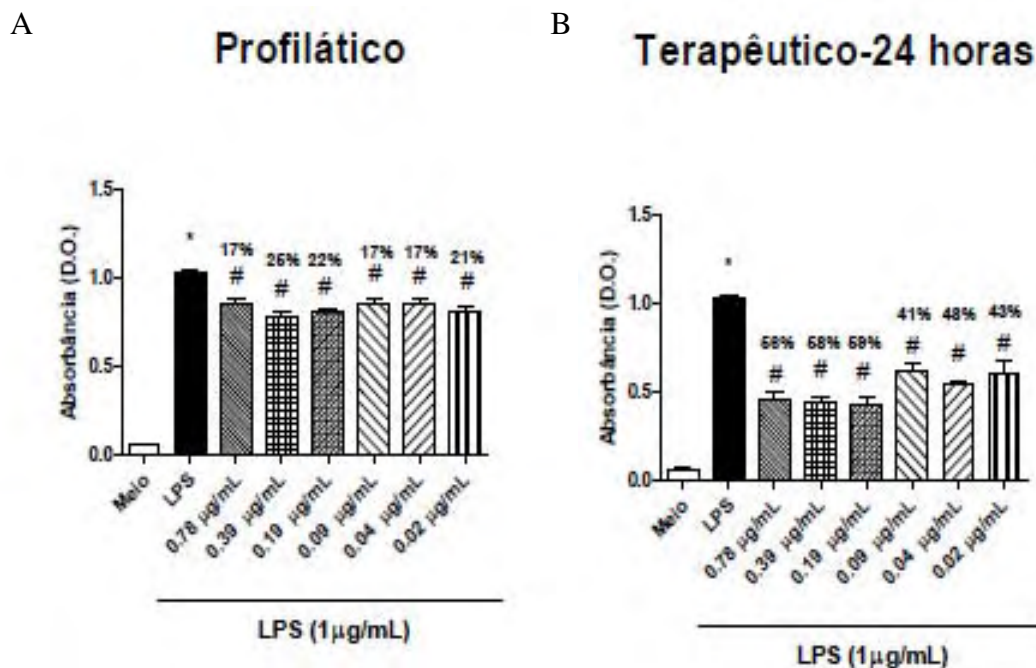


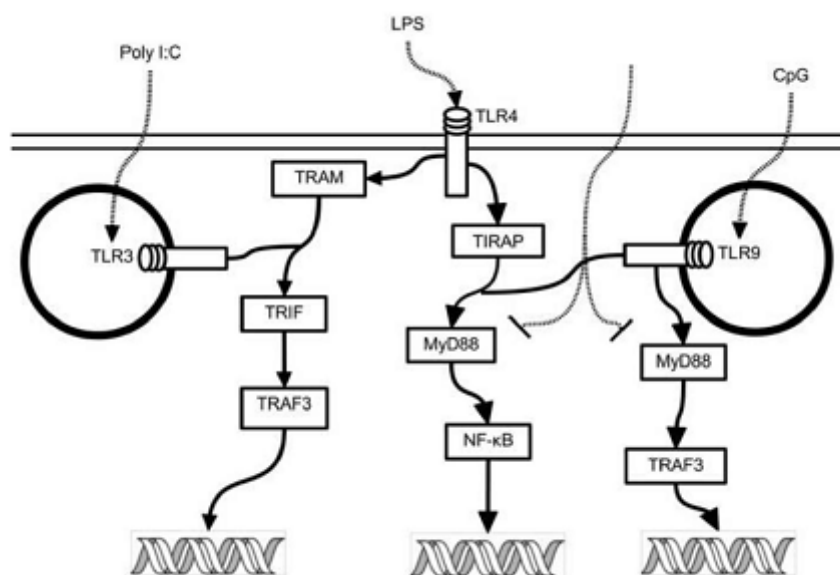
Figura 11: Efeito imunossupressor de Pyrenocine A na proliferação de Linfócitos

B. Células do baço (3×10^5) foram submetidas ao tratamento profilático (A) e terapêutico (B). Profilático (A) linfócitos foram pré-tratados com diferentes concentrações de Pyrenocine A e após 2 h estimulados com LPS ($5 \mu\text{g/mL}$). Terapêutico (B) linfócitos foram estimulados com LPS ($5 \mu\text{g/mL}$) por 24 h e então tratados com diferentes concentrações de Pyrenocine A. Ao final de 48 h de cultura, nas diferentes condições apresentadas, foi adicionada à cultura a resazurina 10% (v/v) alamarBlue (TREK Diagnostic Systems) e após 24 horas a proliferação foi determinada pela leitura da absorbância (570/600nm). O cálculo da proliferação foi feito como segue: Δ absorbância = leitura a 570nm – leitura a 600nm.

Efeito supressor de Pyrenocine A é dependente de MyD88

Para avaliar se Pyrenocine A seria capaz de exercer seus efeitos anti-inflamatórios pela inibição da cascata bioquímica dependente ou não de MyD88, nós utilizamos como estratégia experimental a estimulação de macrófagos com dois agonistas, ligante de TLR3 (Poly I:C) e de TLR9 (CpG). Sabe-se que a interação de Poly I:C ao TLR3 promove a ativação da cascata bioquímica dependente de MyD88 e CpG com TLR9 independente de MyD88. Conforme figura abaixo:

Figura 12. Via de sinalização intracelular mediada por TLR4, TLR3 e TLR9



Modificado: *Eur J Pharmacol*. Author manuscript; available in PMC 2011 March 10.

Nosso próximo passo foi avaliar o mecanismo pelo qual Pyrenocine A exerce suas funções efetoras em macrófagos submetidos ao protocolo profilático e terapêutico utilizando como estímulo inflamatório CpG (ligante de TLR9) e Poly I:C (ligante de TLR3). Nossos resultados demonstram que tanto o tratamento profilático como terapêutico de macrófagos com Pyrenocine A, na presença de CpG, foi capaz de inibir a

síntese de NO de maneira dose-dependente quando comparado com células apenas estimuladas com CpG (Figura 13A e B). Por outro lado, a incubação de macrófagos com Pyrenocine A, utilizando os diferentes protocolos de tratamento (profilático e terapêutico), na presença de Poly I:C não foi capaz de inibir a síntese de NO por macrófagos quando comparado com células apenas estimuladas com Poly I:C (Figura 13C e D).

Esses resultados sugerem que Pyrenocine A exerce seus efeitos anti-inflamatórios em macrófagos estimulados com LPS e CpG através da cascata bioquímica dependente de MyD88.

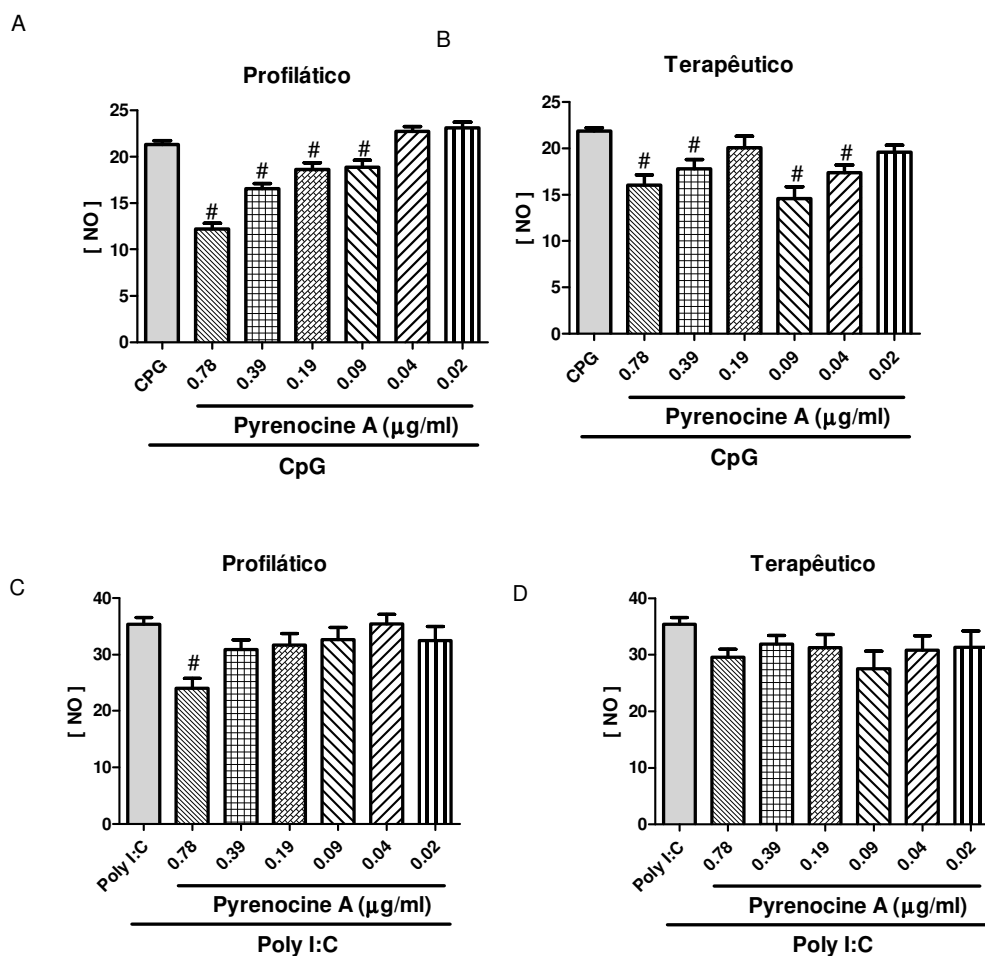


Figura 13: Efeito anti-inflamatório de Pyrenocine A é mediado por MyD88.

Profilático: As células foram pré-tratadas por 2h com diferentes concentrações da substância pura (0.78 – 0.02 µg/mL) e em seguida estimuladas com CpG (1 µg/mL) ou Poly I:C (1 µg/mL). Terapêutico: As células foram estimuladas por 2 h CpG (1 µg/mL) ou Poly I:C (1 µg/mL) e então incubadas com diferentes concentrações da substância pura (0.78 – 0.02 µg/mL). Após esse período o sobrenadante foi coletado para a quantificação de NO. Os resultados correspondem à média ± EPM de três experimentos independentes realizados em quintuplicatas para cada uma das condições. # $p < 0,05$ vs CpG ou Poly I:C (ANOVA seguido de Bonferroni).

5. DISCUSSÃO

O gênero *Penicillium* é uma rica fonte de metabólitos secundários biologicamente ativos como antifúngicos e antibacterianos (Rukachaisirikul, Kaeobamrung et al. 2007). No entanto, até o momento, nada se tinha descrito quanto ao efeito anti-inflamatórios de metabólitos isolados deste fungo. Os resultados aqui apresentados demonstram que a substância Pyrenocine A, isolada do fungo marinho *Penicillium paxill*, apresenta um potente efeito anti-inflamatório com ação profilática e terapêutica tanto em células da resposta imune inata como adaptativa.

Os macrófagos são células residentes distribuídas por diferentes tecidos no nosso organismo e desempenham um papel chave no desenvolvimento do processo inflamatório. Esses fagócitos possuem uma diversidade de receptores de superfície celular que permitem tanto a interação com PAMPs, presente na superfície de patógenos, assim como DAMPs (*Damage-associated molecular pattern molecules*) liberados por células que entram em um processo de necrose. Portanto, o nosso modelo de estudo *in vitro* utilizando macrófagos estimulados com um agente inflamatório, LPS, permite avaliar o efeito imunomodulador de compostos através a modulação de mediadores inflamatórios solúveis, moléculas de superfície celular, assim como os mecanismos de ação destes novos alvos com potencial anti-inflamatório. O efeito anti-inflamatório de Pyrenocine A foi inicialmente determinado quanto a modulação na produção de óxido nítrico. Nossos resultados demonstram que o tratamento de macrófagos com Pyrenocine A utilizando tanto uma abordagem profilática quanto terapêutica na presença do estímulo inflamatório, LPS, foi capaz de inibir drasticamente e de maneira dose dependente a produção de NO. No entanto, para comprovar o efeito anti-inflamatório desta substância alguns parâmetro imunológicos foram avaliados

assim como os possíveis mecanismos ação desta promissora molécula isolado de microorganismos marinhos.

Um grande número de macrófagos ativados - frequentemente encontrados em tecidos lesionados - são grandes produtores de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas pró-inflamatórias e mediadores lipídicos que têm sido implicados na patogênese de doenças inflamatórias agudas e crônicas (Li, Hsu et al. 2012). Dentre as várias classes de fármacos esteroidais e de alguns anestésicos, os mecanismos de ação destas drogas baseiam-se na inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, incluindo TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8 assim como a síntese de NO (Hsing, Lin et al. 2011). Dexametasona é um glucocorticóide sintético com potentes efeitos anti-inflamatórios, que é utilizado como a primeira opção de tratamento de doenças inflamatórias tais como injúria pulmonar aguda, asma e artrite reumatóide (Kim, Park et al. 2011). Os glicocorticóides (GCs), como a dexametasona, exerce sua função anti-inflamatória através da inibição de fatores de transcrição como NF κ B e AP-1 (Chang, Chou et al. 2009). Além da modulação de citocinas inflamatórias, alguns fármacos possuem a capacidade de modular a síntese de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, citocina essa capaz de modular negativamente e indiretamente a síntese destes mediadores inflamatórios assim como moléculas de superfície (Chang, Lai et al. 2009). Os resultados aqui apresentados demonstram que Pyrenocine A tem um efeito anti-inflamatório profilático e terapêutico quanto a síntese de TNF- α , IL-1- α e PGE2 por macrófagos estimulados com LPS. No entanto, o tratamento de macrófagos com Pyrenocine A, independente da concentração e do protocolo utilizado, não foi capaz de modular positivamente da liberação de IL-10. Estes resultados sugerem que o efeito anti-inflamatório de Pyrenocine A é independente da ação de IL-10 e provavelmente exerce um efeito direto na transcrição e/ou tradução destes mediadores inflamatórios.

O recrutamento de células inflamatórias para os locais da inflamação é mediado por quimioatraentes e moléculas de adesão, tais como integrinas (CD11b), selectinas (L-selectinas) e quimiocinas (Dutra, Claudino et al. 2011). A presença de mediadores inflamatórios no microambiente promove o recrutamento de monócitos para o local da inflamação, que se diferenciam em macrófagos capazes de exercer diversas funções efetoras na presença de um componente inflamatório, dentre elas fagocitose e destruição de microrganismos e produção de mediadores pró-inflamatórios, anti-inflamatórios/pró-angiogênico. Macrófagos pró-inflamatórios, através da liberação de citocinas, quimiocinas e expressão de moléculas de superfície, promovem o recrutamento e ativação tanto de células da imunidade inata, como neutrófilos como posteriormente de células da resposta imune adaptativa, como linfócitos T. Estes mediadores influenciam na expressão de moléculas coestimuladoras em macrófagos e células dendríticas, como CD80 e CD86, que são imprescindíveis na ativação de células T. Por sua vez, a expressão de CD11b em macrófagos é importante não apenas no recrutamento e ativação celular, mas também na fagocitose de microrganismos. Os resultados aqui apresentados demonstram um efeito anti-inflamatório profilático e terapêutico da Pyrenocine A quanto diminuição da expressão das moléculas de superfície CD11b e B7-1 e apenas uma discreta modulação na expressão de B7-2 e TLR-4. Nossos resultados sugerem que o efeito anti-inflamatório desta substância pura difere do observado com outros fármacos (Hsing, Lin et al. 2011) que além de modular a expressão de citocinas inflamatórias também foi hábil em inibir a expressão de receptores TLR. A ausência de modulação na expressão de PRR como TLR-4, e o potencial supressor de Pyrenocine A em moléculas diretamente envolvidas no processo de migração e ativação ao nosso ver seria uma vantagem comparado a outros fármacos. Isso porque esse fármaco especificamente inibiria o recrutamento e a ativação de células

tanto da imunidade inata como adquirida, porém não modularia negativamente outras funções efetoras dos macrófagos como o reconhecimento de microorganismos que o indivíduo possa vir a ser acometido em durante o tratamento de um processo inflamatório crônico.

Durante o processo inflamatório, grandes quantidades de mediadores inflamatórios, como NO e prostaglandina E2 (PGE2), são gerados por isoformas induzíveis de NO síntase (NOS) e ciclooxigenase 2 (COX-2) (Yang, Lee et al. 2012). Nossos resultados demonstram que Pyrenocine A não foi capaz de inibir a expressão da enzima COX-2, porém foi eficiente em inibir a síntese de PGE2 utilizando o tratamento profilático. Esses resultados sugerem que provavelmente a inibição de PGE2 por Pyrenocine A em macrófagos estimulados com LPS ocorra diretamente na enzima PGE2 sintase, enzima essa responsável pela síntese específica de PGE2 nos diferentes tipos celulares (Yang, Lee et al. 2012). No entanto, essa hipótese será testada utilizando real time-PCR e confirmada por *immunoblotting*.

Sabe-se que durante o processo inflamatório crônico, por exemplo, a artrite reumatóide, além de macrófagos, que através da síntese de citocinas inflamatórias contribuem ativamente na injúria tecidual, a ativação e proliferação de linfócitos influenciam diretamente no agravamento e reação inflamatória local. Portanto, a busca de novos fármacos que apresentem um potente efeito anti-inflamatório tanto em células da imunidade inata quanto da imunidade adaptativa são promissores candidatos para o tratamento de processos inflamatórios crônicos. Nossos resultados demonstram que além do efeito supressor da substância pura Pyrenocine A em células da resposta imune inata, essa substância também foi capaz de inibir a proliferação de células B, células estas diretamente envolvidas na produção de auto-anticorpos em doenças auto-imunes (Novikova, Popkova et al. 2012). Apesar da inibição da proliferação de linfócitos por

Pyrenocine A não garantir que a haverá um inibição da produção de anticorpos, a inibição da ativação policlonal induzida por LPS pela Pyrenocine A em linfócitos B ao menos impede que haja um grande número de clones capazes de produzir futuramente auto-anticorpos. No entanto, novos ensaios serão realizados para avaliar a capacidade destes clones, tratados com Pyrenocine A, em produzir IgM após a ativação por LPS.

LPS interage com o complexo CD14/LBP/TLR4 resultando na ativação de uma complexa cascata bioquímica dependente de MyD88 e IRAK que culmina da ativação de TRAF6 e subsequentemente de NFκB e AP-1 através do complexo IKK e MAP kinases, respectivamente (Park, Song et al. 2009) levando a síntese de diferentes mediadores solúveis como citocinas, quimiocinas (Akira and Sato 2003; Kumar, Kawai et al. 2009) e metabólitos do ácido araquidônico (AA) (Brock, McNish et al. 2003). Finalmente, para iniciar os estudos referentes aos possíveis mecanismos pelos quais Pyrenocine A seria capaz de exercer seus efeitos imunossupressores, nós utilizamos como estratégia a estimulação de macrófagos com agonistas ligantes de TLR3 (Poly I:C) e o TLR9 (CpG). A interação de Poly I:C a TLR3 promove a ativação da cascata bioquímica dependente de MyD88 e CpG a TLR9 independente de MyD88. Nossos resultados sugerem que o efeito supressor de Pyrenocine A em macrófagos são mediados pela inibição da cascata bioquímica via MyD88 visto que não foi observado nenhum efeito supressor quanto a produção de nitrito quando utilizando como estímulo inflamatório o agonista de TLR9, ou seja via dependente de TRIF e independente de MyD88.

Apesar de termos elucidado neste estudo alguns dos possíveis mecanismos pelos quais a Pyrenocine A exerce suas funções anti-inflamatórias, novos experimentos serão realizados para validar seu efeito supressor em diferentes modelos experimentais de

inflamação aguda e crônica utilizando tanto uma abordagem profilática como terapêutica.

6. CONCLUSÃO

O conjunto destes resultados demonstra que Pyrenocine A possui um potente efeito anti-inflamatório profilático e terapêutica tanto em células da resposta imune inata e adaptativa.

7. REFERÊNCIAS

- (2012). "Role of PGE2 in Asthma and Nonasthmatic Eosinophilic Bronchitis." Mediators of Inflammation **2012**.
- Akira, S. and S. Sato (2003). "Toll-like receptors and their signaling mechanisms." Scand J Infect Dis **35**(9): 555-562.
- Barillaro, V., P. Bertholet, et al. (2004). "Effect of acidic ternary compounds on the formation of miconazole/cyclodextrin inclusion complexes by means of supercritical carbon dioxide." J Pharm Pharm Sci **7**(3): 378-388.
- Beutler, B. A. (2009). "TLRs and innate immunity." Blood **113**(7): 1399-1407.
- Blunt, J. W., B. R. Copp, et al. (2012). "Marine natural products." Nat Prod Rep **29**(2): 144-222.
- Boniface, K., K. S. Bak-Jensen, et al. (2009). "Prostaglandin E2 regulates Th17 cell differentiation and function through cyclic AMP and EP2/EP4 receptor signaling." The Journal of Experimental Medicine **206**(3): 535-548.
- Bour-Jordan, H., J. H. Esensten, et al. (2011). "Intrinsic and extrinsic control of peripheral T-cell tolerance by costimulatory molecules of the CD28/ B7 family." Immunol Rev **241**(1): 180-205.
- Breyer, R. M., C. K. Bagdassarian, et al. (2001). "Prostanoid receptors: Subtypes and signaling." Annual Review of Pharmacology and Toxicology **41**: 661-690.
- Brock, T. G., R. W. McNish, et al. (2003). "Prolonged lipopolysaccharide inhibits leukotriene synthesis in peritoneal macrophages: mediation by nitric oxide and prostaglandins." Prostaglandins Other Lipid Mediat **71**(3-4): 131-145.
- Chang, C. F., Y. P. Chau, et al. (2012). "The lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory response in RAW264.7 cells is attenuated by an unsaturated fatty acid-bovine serum albumin complex and enhanced by a saturated fatty acid-bovine serum albumin complex." Inflammation Research **61**(2): 151-160.
- Chang, L. P., Y. S. Lai, et al. (2009). "Liquid perfluorochemical inhibits inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide formation in lipopolysaccharide-treated RAW 264.7 macrophages." Journal of Pharmacological Sciences **111**(2): 147-154.
- Chang, S. F., B. H. Chou, et al. (2009). "Microbial transformation of isosteviol oxime and the inhibitory effects on NF-kappaB and AP-1 activation in LPS-stimulated macrophages." Bioorg Med Chem **17**(17): 6348-6353.
- Czekanska, E. M. (2011). "Assessment of cell proliferation with resazurin-based fluorescent dye." Methods Mol Biol **740**: 27-32.
- da Matta, C. B., E. T. de Souza, et al. (2011). "Antinociceptive and anti-inflammatory activity from algae of the genus *Caulerpa*." Mar Drugs **9**(3): 307-318.
- Dutra, R. C., R. F. Claudino, et al. (2011). "Preventive and therapeutic euphol treatment attenuates experimental colitis in mice." PLoS One **6**(11): e27122.
- Ehlers, M. R. (2000). "CR3: a general purpose adhesion-recognition receptor essential for innate immunity." Microbes Infect **2**(3): 289-294.
- Ghosh, S. and R. K. Saxena (2004). "Early effect of Mycobacterium tuberculosis infection on Mac-1 and ICAM-1 expression on mouse peritoneal macrophages." Exp Mol Med **36**(5): 387-395.
- Gualde, N. and H. Harizi (2004). "Prostanoids and their receptors that modulate dendritic cell-mediated immunity." Immunol Cell Biol **82**(4): 353-360.

- Hernandez, I. L., M. J. Godinho, et al. (2000). "N-acetyl-gamma-hydroxyvaline lactone, an unusual amino acid derivative from a marine streptomycete." J Nat Prod **63**(5): 664-665.
- Hsing, C. H., M. C. Lin, et al. (2011). "Anesthetic propofol reduces endotoxic inflammation by inhibiting reactive oxygen species-regulated Akt/IKKbeta/NF-kappaB signaling." PLoS ONE **6**(3): 0017598.
- Kim, H. A., J. H. Park, et al. (2011). "Combined delivery of dexamethasone and plasmid DNA in an animal model of LPS-induced acute lung injury." J Control Release **156**(1): 60-69.
- Konig, G. M., S. Kehraus, et al. (2006). "Natural products from marine organisms and their associated microbes." Chembiochem **7**(2): 229-238.
- Kossuga, M. H., S. Romminger, et al. (2012). "Evaluating methods for the isolation of marine-derived fungal strains and production of bioactive secondary metabolites." Revista Brasileira de Farmacognosia **22**: 257-267.
- Kumar, H., T. Kawai, et al. (2009). "Toll-like receptors and innate immunity." Biochem Biophys Res Commun **388**(4): 621-625.
- Lane, T. E., B. A. Wu-Hsieh, et al. (1993). "Gamma interferon cooperates with lipopolysaccharide to activate mouse splenic macrophages to an antihistoplasma state." Infect Immun **61**(4): 1468-1473.
- Lee, J. Y., M. H. Rhee, et al. (2008). "Novel modulatory effects of SDZ 62-434 on inflammatory events in activated macrophage-like and monocytic cells." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **377**(2): 111-124.
- Li, J., H. C. Hsu, et al. (2012). "Managing macrophages in rheumatoid arthritis by reform or removal." Curr Rheumatol Rep **14**(5): 445-454.
- Li, Z. (1999). "The alphaMbeta2 integrin and its role in neutrophil function." Cell Res **9**(3): 171-178.
- Lu, P., Y. L. Wang, et al. (1997). "Regulation of self-tolerance by CD80/CD86 interactions." Curr Opin Immunol **9**(6): 858-862.
- Mayer, A. M., A. D. Rodriguez, et al. (2011). "Marine pharmacology in 2007-8: Marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous system, and other miscellaneous mechanisms of action." Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol **153**(2): 191-222.
- McCoy, J. M., J. R. Wicks, et al. (2002). "The role of prostaglandin E2 receptors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis." J Clin Invest **110**(5): 651-658.
- Medeiros, A. I., A. Sa-Nunes, et al. (2008). "Leukotrienes are potent adjuvant during fungal infection: effects on memory T cells." J Immunol **181**(12): 8544-8551.
- Medzhitov, R. (2007). "Recognition of microorganisms and activation of the immune response." Nature **449**(7164): 819-826.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." J Immunol Methods **65**(1-2): 55-63.
- Nagamachi, M., D. Sakata, et al. (2007). "Facilitation of Th1-mediated immune response by prostaglandin E receptor EP1." J Exp Med **204**(12): 2865-2874.
- Newman, D. J. and G. M. Cragg (2007). "Natural products as sources of new drugs over the last 25 years." J Nat Prod **70**(3): 461-477.
- Novikova, D. S., T. V. Popkova, et al. (2012). "The effect of anti-B-cell therapy on the development of atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis." Curr Pharm Des **18**(11): 1512-1518.

- Park, B. S., D. H. Song, et al. (2009). "The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex." *Nature* **458**(7242): 1191-1195.
- Paul, V. J., K. E. Arthur, et al. (2007). "Chemical defenses: from compounds to communities." *Biol Bull* **213**(3): 226-251.
- Perera, P. Y., T. N. Mayadas, et al. (2001). "CD11b/CD18 acts in concert with CD14 and Toll-like receptor (TLR) 4 to elicit full lipopolysaccharide and taxol-inducible gene expression." *J Immunol* **166**(1): 574-581.
- Rowley, A. F. and A. Powell (2007). "Invertebrate immune systems specific, quasi-specific, or nonspecific?" *J Immunol* **179**(11): 7209-7214.
- Rukachaisirikul, V., J. Kaeobamrung, et al. (2007). "A new pyrone derivative from the endophytic fungus *Penicillium paxilli* PSU-A71." *Chem Pharm Bull* **55**(9): 1383-1384.
- Sastre, B. and V. del Pozo (2012). "Role of PGE2 in asthma and nonasthmatic eosinophilic bronchitis." *Mediators Inflamm* **645383**(10): 19.
- Schafer, P. H., S. K. Pierce, et al. (1995). "The structure of MHC class II: a role for dimer of dimers." *Semin Immunol* **7**(6): 389-398.
- Shin, S., S. S. Joo, et al. (2010). "Ethanol extract of *Angelica gigas* inhibits croton oil-induced inflammation by suppressing the cyclooxygenase - prostaglandin pathway." *J Vet Sci* **11**(1): 43-50.
- Strangman, W. K., H. C. Kwon, et al. (2009). "Potent inhibitors of pro-inflammatory cytokine production produced by a marine-derived bacterium." *J Med Chem* **52**(8): 2317-2327.
- Sugimoto, Y., Y. Fukada, et al. (2005). "Prostaglandin E2 stimulates granulocyte colony-stimulating factor production via the prostanoid EP2 receptor in mouse peritoneal neutrophils." *J Immunol* **175**(4): 2606-2612.
- Tamba, S., R. Yodoi, et al. (2008). "Timely interaction between prostaglandin and chemokine signaling is a prerequisite for successful fertilization." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(38): 14539-14544.
- Van Gool, S. W., P. Vandenberghe, et al. (1996). "CD80, CD86 and CD40 provide accessory signals in a multiple-step T-cell activation model." *Immunol Rev* **153**: 47-83.
- Yang, G., K. Lee, et al. (2012). "Inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide and prostaglandin E2 production by chloroform fraction of *Cudrania tricuspidata* in RAW 264.7 macrophages." *BMC Complement Altern Med* **12**(1): 250.

ANEXO I

Aprovação do Comitê de Ética

Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 19/2012

Pesquisador: THAÍS REGINA TOLEDO

Orientadora: ProfªDrª Alexandra Ivo de Medeiros

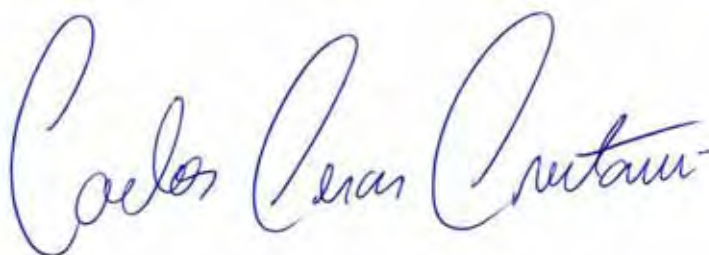
Projeto: Avaliação do Potencial Imunomodulador de Compostos Isolados de Microorganismos Marinhos.

Parecer nº 22/2012 – Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais, em reunião do dia 15 de junho de 2012, verificou que o protocolo para uso de animais na pesquisa: “Obtenção de células T naive provenientes do baço”, apresentado pela pós-graduanda Thaís Regina Toledo, sob orientação da ProfªDrª Alexandra Ivo de Medeiros, do Departamento de Ciências Biológicas desta Faculdade, esta estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em OUTUBRO 2013, em formulário próprio para esse fim.

Araraquara, 19 de junho de 2012.

A handwritten signature in blue ink, reading "Carlos Cesar Crestani". The signature is fluid and cursive, with the first name "Carlos" being the most prominent.

Prof. Dr. CARLOS CESAR CRESTANI
Coordenador da CEUA

ANEXO II

Submissão do Artigo Científico

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

Oedem Paulo Almeida Jr; Thais Regina Toledo; Danuza Rossi; Daniella de Barros Rossetto; Tatiana Faria Watanabe; Alexandra Ivo Medeiros; Cleslei Fernando Zanelli and Sandro Roberto Valentini*

Department of Biological Sciences, Univ Estadual Paulista – UNESP, Araraquara-SP, Brazil

*corresponding author:

Sandro Roberto Valentini

valentsr@fctar.unesp.br

Telephone: +55 16 3301-6954

Fax: +55 16 3301-6940

ABSTRACT

Inflammation is part of an important mechanism triggered by the innate immune response that rapidly responds to invading microorganisms and tissue injury. One important elicitor of the inflammatory response is the gram-negative bacteria component lipopolysaccharide (LPS), which induces the activation of innate immune response cells, the release of proinflammatory cytokines, such as interleukin 1 and tumor necrosis factor α (TNF- α), and the cellular generation of nitric oxide (NO) by the inducible nitric oxide synthase (iNOS). Although essential to the immune response, uncontrolled inflammatory responses can lead to pathological conditions, such as sepsis and rheumatoid arthritis. Therefore, identifying cellular targets for new anti-inflammatory treatments is crucial to improving therapeutic control of inflammation-related diseases. More recently, the translation factor eIF5A has been demonstrated to have a proinflammatory role in the release of cytokines and the production of NO. Because, in order to function, eIF5A requires a unique modification of a specific residue of lysine, changing it to hypusine, eIF5A is an interesting cellular target for anti-inflammatory treatment. The present study reviews the literature concerning the anti-inflammatory effects of inhibiting eIF5A function. We also present new data showing that the inhibition of eIF5A function by the small molecule GC7 significantly decreases TNF- α release without affecting TNF- α mRNA levels. We discuss the mechanisms by which eIF5A may interfere with TNF- α mRNA translation by binding to and regulating the function of ribosomes during protein synthesis.

Inflammation and the role of macrophages

The inflammatory response is a defense mechanism used by the host immune system against stimuli such as components of microorganisms (PAMPs - pathogen-associated molecular patterns) and intracellular components leaking from necrotic cells (DAMPs - damage-associated molecular patterns). The macrophages are distributed through different tissues and comprise one of the most important cell types responsible for triggering inflammatory responses against agent aggressors (1, 2). These phagocytes have a diversity of cell surface receptors known as pattern recognition receptors (RRPs), such as Toll-like receptors (TLRs), that can interact with the PAMPs of bacteria, viruses, parasites and fungi. Lipopolysaccharide (LPS), a PAMP from gram-negative bacterial outer cell membranes, interacts with TLR4 through a CD14/LBP/TLR4 complex, resulting in the activation of a complex biochemical cascade (1, 2). This interaction promotes the recruitment of the proteins MyD88 and IRAK kinases and the activation of TRAF6 and, subsequently, NF κ B and AP-1 (3). The activation of these transcription factors promotes the synthesis of inflammatory mediators such as cytokines, chemokines (4, 5) and arachidonic acid (AA) metabolites (6), as well as the expression of surface molecules involved in cell recruitment and activation (1-6). In the absence of stimuli, NF κ B remains inactive in the cytoplasm as an I κ B-NF κ B complex; however, in the presence of LPS, cytosolic I κ B can be phosphorylated by I κ B kinase (IKK). This I κ B phosphorylation leads to dissociation from the I κ B-NF κ B complex, thereby allowing the translocation of NF κ B into the nucleus and resulting in the transcription of genes encoding inflammatory mediators (7). The activation of these genes results in the production of inflammatory cytokines such as TNF- α , interleukin-1 α (IL-1 α), IL-1 β , and IL-6 and other inflammatory mediators such as nitric oxide (NO) and prostaglandin E2 (PGE2), which can play deleterious roles in acute and chronic inflammatory diseases, such as sepsis and rheumatoid arthritis, respectively (3). In the presence of inflammatory stimuli, macrophages are able to produce NO via the conversion of L-arginine by nitric oxide synthase (NOS) as well as that of ornithine/polyamines by arginase-ornithine decarboxylase (ODC). These mediators (NO and ornithine/polyamines), which are expressed by macrophages during the inflammatory response time-course, can provide critical markers for identifying two distinct macrophage phenotypes: pro-inflammatory (M1) and anti-inflammatory (M2) (8) macrophages.

Polyamines and eIF5A

The polyamines putrescine, spermidine and spermine are ubiquitous molecules in eukaryotic cells and are involved in a series of processes related to cell proliferation and cell survival, acting through several diverse mechanisms that may involve binding to DNA, RNA, proteins and phospholipids (9, 10). The cellular polyamines are low-molecular-weight, flexible, organic polycations that are both imported into cells and synthesized enzymatically via controlled pathways. As mentioned above, the polyamine synthesis pathway originates with L-arginine, which is converted into L-ornithine by arginase. The amino acid L-ornithine is then converted into the polyamine putrescine by ornithine decarboxylase (ODC), a highly regulated enzyme. In turn, putrescine is converted into spermidine by spermidine synthase, which is subsequently used to synthesize spermine via spermine synthase (Figure 1) (11).

Spermidine plays an essential role in the maturation of the eIF5A protein, by which a specific lysine residue is posttranslationally modified into hypusine (hydroxyputrescine-lysine), an N ϵ -(4-amino-2-hydroxybutyl)-lysine (Figure 1). This reaction occurs via the following two steps: first, the enzyme deoxyhypusine synthase (DHS) transfers a 4-aminobutyl moiety of the polyamine spermidine to a specific lysine residue in eIF5A; second, the deoxyhypusine residue is hydroxylated by the enzyme deoxyhypusine hydroxylase (DOHH) to form the hypusine residue (12).

The eIF5A protein is highly conserved from archaea to mammals and is an essential protein in all organisms studied to date. The first step of hypusine synthesis, which is also highly conserved throughout evolution, is essential for eIF5A function. The eIF5A molecule is a small (~18 kDa, depending on the species) acidic protein comprised of two β -barrel domains. Although eIF5A and the hypusine modification were first described approximately 30 years ago, neither the precise action of eIF5A in the cell nor the requirement for the hypusine residue have been precisely defined. Numerous studies have related eIF5A to several processes in the cell, but it is not clear whether the results obtained reflect the direct role of eIF5A in a pathway or secondary effects of this essential protein in a specific model organism, cell line or experimental design. The name eIF5A, ekaryotic translation initiation factor 5A, was given to this protein due to its initial identification as a component of the protein synthesis machinery associated with ribosomes (13, 14). However, eIF5A was also involved in mRNA degradation, nucleocytoplasmic transport, cell cycle progression / tumorigenesis and apoptosis (for reviews, see (15) and (16). More recently, eIF5A has been confirmed as a factor directly involved in protein synthesis (17-21). Moreover, a structural homologue of eIF5A in bacteria, EF-P, has been shown to associate with ribosomes, and observations of its crystal structure bound to the 70S and Met-tRNAⁱ suggest that this factor has a direct role in the formation of the peptide bond (22).

Studies have also shown that eIF5A binds to RNA, and an *in vitro* study involving selection of RNA ligands identified specific sequence motifs that bind eIF5A. However, the presence of these putative, specific eIF5A-RNA-binding consensus sequences has not been validated in endogenous mRNAs using a bioinformatics search (23). An independent study has demonstrated that eIF5A is able to co-purify the iNOS mRNA, coding for the inducible nitric oxide synthase (iNOS), from whole cell extracts in a hypusine-dependent manner. Interestingly, the iNOS mRNA harbors a 6-nucleotide sequence that is contained in the putative eIF5A-RNA-binding consensus (24). Although co-purification of iNOS mRNA by eIF5A from whole cell extracts could occur through bridging via the binding of eIF5A to the ribosome, that work provides the first evidence of an endogenous mRNA co-purifying with eIF5A in a sequence-specific manner. More importantly, Maier *et al.* (2010) have demonstrated that although iNOS mRNA levels are not reduced when the rat insulinoma cell line INS-1 is treated with the DHS inhibitor GC7, the protein levels of iNOS are significantly decreased, suggesting that active, hypusine-containing eIF5A is necessary for translation of iNOS mRNA. In addition, treatment of INS-1 cells with GC7 did not alter the mRNA levels of the Endoplasmic Reticulum (ER) stress marker CHOP, while CHOP protein production was abolished by GC7 treatment (25). Similarly, GC7 treatment generated a large reduction in CD83 protein on the surface of *in vitro*-differentiated human dendritic cells (DCs), while no alteration in the CD83 mRNA levels occurred (26). It is important to note that no transcript variants of either CHOP or CD83 mRNAs contain the 6-

nucleotide putative eIF5A-RNA-binding consensus sequence proposed (data not shown). Therefore, despite the precise mechanism that dictates the differential expression of specific mRNAs caused by the depletion of eIF5A or the hypusine modification of eIF5A, these studies show that eIF5A regulates gene expression posttranscriptionally. Given the fact that recently published data strongly support a function for eIF5A in the elongation step of protein synthesis in different organisms and cell lines (20, 21, 27-30), it is likely that eIF5A can regulate the translation of specific mRNAs during cellular stresses or other special situations, such as cell differentiation or proliferation.

Anti-inflammatory effect of eIF5A-siRNA and GC7

Recent studies investigating inflammatory responses related to diabetes have found that eIF5A inhibition results in a proinflammatory effect mediated via hypusine-containing eIF5A. It has been shown that eIF5A-siRNA knockdown or administration of the hypusine-formation blocker GC7 improves phenotypical actions related to inflammation-induced diabetes in mice models, such as insulin release, glycemic control and islet mass (24, 25). These studies have also shown that decreases in iNOS levels and increases in NO production are directly correlated with eIF5A inhibition by siRNA of eIF5A, GC7 treatment or deoxyhypusine synthase gene (*DHPS*) haploinsufficiency [Maier, 2010; Templin, 2011]. The production of NO by iNOS in response to proinflammatory stimuli is proposed to play a major role in islet β cells and the pathogenesis of diabetes, as are the iNOS-independent effects of proinflammatory cytokines (31, 32).

In addition to correlating the action(s) of eIF5A with proinflammatory stimuli related to diabetes, studies have shown that the administration of eIF5A-siRNA liposomes increases the survival rates of mice after LPS intraperitoneal injection (in a murine model of severe sepsis (33)). Previous studies have also demonstrated decreases in the serum levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and other inflammatory mediators after the administration of eIF5A-siRNA. A similar reduction in the release of inflammatory cytokines was observed when eIF5A-siRNA was administered to mice challenged with LPS intranasally. Moreover, eIF5A-siRNA administration after intranasal LPS induced a significant decrease in lung myeloperoxidase, a cytotoxic enzyme produced and released by neutrophil granulocytes (33). In addition to the obvious effect of eIF5A-siRNA on the neutrophilic response to LPS, it is anticipated that eIF5A-siRNA is also involved in decreasing the release of inflammatory mediators from macrophages. However, to date, the direct effects of inhibiting eIF5A inhibition in murine macrophages have not been demonstrated *in vitro*.

Anti-inflammatory effects of GC7 on cultured murine macrophages

In chronic inflammation, macrophages and T cells are major sources of inflammatory mediators such as TNF- α , IL-1 α , IL-1 β and IL-6 (34). To study the direct inhibition of eIF5A in macrophages, we used the mouse macrophage cell line RAW264.7 and the deoxyhypusine inhibitor GC7, to determine the effects of this treatment on global cell physiology and proinflammatory cytokine production. We first confirmed that GC7 is able to cause a significant inhibition of hypusine formation in eIF5A in RAW264.7 cells using [3 H]-spermidine incorporation. As shown in Figure 2A, GC7 treatment resulted in significant inhibition of eIF5A hypusination (to less than half of that observed in

untreated cells). This decrease occurred after a 24 h incubation period with GC7, suggesting that, although the treatment is effective, the half-life of eIF5A in RAW264.7 cells must be as long as 15-24 h, as previously observed (19, 24, 35, 36). On the other hand, published results have shown that, specifically in the case of INS-1 insulinoma cells, eIF5A has a short half-life (approximately 6 h) [Maier, 2010]. Because the eIF5A half-life may influence the effectiveness of treatment with blockers of hypusine formation, future work should address the eIF5A half-life and how this process is differentially controlled in a comprehensive number of cell lines.

Next, we investigated cell viability after treatment with different concentrations of GC7 (Figure 2B). The data show that concentrations up to 150 μ M were not significantly cytotoxic, demonstrating that GC7 is well tolerated by RAW264.7 cells.

Because eIF5A has been demonstrated to play a role in translation and to be a component of protein synthesis machinery, we also analyzed global protein synthesis using a polysome profile assay to verify the number of ribosomes associated with mRNAs in the cell. A single mRNA may associate with more than one 80S ribosome, generating a polysome. The average number of polysomes on cellular mRNAs indicates the rate of translation in the cell. Differences in polysome profiles obtained from untreated and treated cells can also distinguish whether the protein synthesis defect occurs at the initiation or elongation steps of translation. As observed in Figure 2C, treatment with GC7 increased the 80S (monosome) peak and decreased the number of polysome peaks and the amount of mRNAs associated with 5 or more ribosomes (demonstrated by the area below the graph). These results are indicative of defects in protein synthesis, particularly during the initiation step of translation. Although eIF5A has been associated with the elongation step of protein synthesis, our results agree with published data showing that in addition to blocking eIF5A function in the cell by inhibiting hypusine formation, GC7 also activates down-regulating factors of eIF2 and eIF4E as a secondary effect in the cell, resulting in the characteristic polysome profile of a defect at the initiation step of translation (28).

To further investigate the effects of GC7 on the global cell physiology, we analyzed differences in whole-cell proteome profiles between untreated cells and cells treated with GC7. To evaluate these differences in a qualitative and quantitative manner, 2D-PAGE proteome analysis was performed. The same amount of whole-cell extract from RAW264.7 cells was prepared in triplicate for control (untreated) experiments and experiments involving treatment with GC7. After performing 2D-PAGE in experimental triplicates, the images were analyzed, revealing the differential presence of 103 protein-spots after statistical validation ($p \leq 0.05$ as determined by Student's *t* test). The spots were then selected from preparative gels, and the proteins were identified by MS/MS. As an example, Figure 3A shows a close-up view of the protein-spot pair of Lcp1 and a graph revealing an increase in this protein in treated cells compared to untreated cells. The functional correlation among the identified proteins was obtained by Genetic Ontology Analysis (GOA) (<http://omicslab.genetics.ac.cn/GOEAST/index.php>). The GOA results reveal 13 proteins significantly correlated with GO terms, such as "metabolic process" (26%), "protein metabolic process" (17%) and "stress response" (15%), as shown in Figure 3B. Figure 3C shows the differentially expressed proteins according to their classification with regard to GOA terms. The results show no direct correlation between treatment with GC7 and specific pathways in the cell. In contrast, most proteins identified are

involved in general metabolism and stress response(s) (“protein metabolism and folding”, “catabolic process”, “stress response”), for instance, chaperones (proteins from the Hsp90 family and Hsp70 family). It is possible to conclude from this analysis that despite causing some alterations in protein levels, GC7 does not affect specific pathways in RAW264.7 cells and has no significant physiological effect on macrophages. The data obtained so far have confirmed that GC7 is active in inhibiting eIF5A function and is not toxic to general cellular metabolism.

Finally, to address whether GC7 reproduces the anti-inflammatory effects of eIF5A-siRNA observed after administration of LPS [Moore, 2008], we analyzed the release of TNF- α from RAW264.7 macrophage cells following stimulation with LPS. As observed in Figure 3A, at all concentrations tested, treatment with GC7 generated significant reductions in TNF- α release from macrophages challenged with LPS. These results demonstrate that GC7 is able to induce an anti-inflammatory effect in macrophages similar to the results obtained with eIF5A-siRNA in models of murine severe sepsis and acute lung injury (33). These results are in agreement with the hypothesis that macrophage secretion of TNF- α is a significant factor during severe sepsis and acute lung injury. We next verified the mRNA levels for TNF- α in RAW264.7 cells stimulated with LPS and treated (or not treated) with GC7. Interestingly, we observed a small but significant increase in TNF- α mRNA levels, ruling out the possibility that GC7 impairs the transcriptional induction of TNF- α gene upon LPS stimulation. The fact that there is no decrease in TNF- α mRNA levels in macrophage cells treated with GC7, while a large decrease in TNF- α protein release (into the medium) is observed, suggests that TNF- α production is posttranscriptionally regulated by eIF5A. This observation and previously published data correlating eIF5A and posttranscriptional regulation of gene expression are discussed below.

We also determined the mRNA levels for other cytokines and immune response factors to more generally characterize the impact of GC7 treatment and the resulting inhibition of eIF5A on the response(s) of RAW264.7 macrophage cells to LPS. For most of the genes tested, there were no significant (p -value ≤ 0.05) differences in mRNA levels (Supplementary Table). Interestingly, mRNA levels of the proinflammatory cytokines IL-1 α and IL-1 β and of iNOS were largely decreased. These results suggest that GC7 may exert its anti-inflammatory effects by altering the translation of a specific mRNA, as in the case of TNF- α , and also by decreasing the mRNA levels of other factors, such as IL-1 α , IL-1 β and iNOS.

Although some recent studies have demonstrated proinflammatory effects of eIF5A in different models, the mechanism by which eIF5A promotes these effects remain elusive. Interestingly, as mentioned above, different studies correlating eIF5A with immune cells or inflammation have suggested that eIF5A regulates a posttranscriptional step of gene expression (24-26). Indeed, eIF5A has been shown to bind to RNA directly and has been implicated in the general and specific control of mRNA stability (15, 37). On the other hand, no study has demonstrated the direct binding of eIF5A to endogenous mRNAs, and the biological relevance of such binding has not been demonstrated thus far. Because eIF5A binds to translationally active ribosomes (18), it is expected that eIF5A may be able to co-purify with cellular mRNAs from whole-cell extracts, as demonstrated for the iNOS mRNA [Maier, 2010 PMID: 20501948]. It is also known that different populations of ribosomes co-exist in the cell

(38) and it is possible that eIF5A may preferentially bind to a specific subset of these ribosomes. Moreover, we have demonstrated that eIF5A indirectly affects mRNA degradation by acting at the elongation step of protein synthesis and that blocking the eIF5A function reproduces the effects caused by the small molecule cycloheximide (20), whose mechanism of action is to block translation elongation by binding to the E-site on the ribosome (39). Therefore, eIF5A binding to ribosomes may impact the translation and the degradation rates of specific mRNAs in the cell.

Concluding remarks and perspectives

Interestingly, several genes involved in inflammation and immune responses harbor elements in their mRNAs that are responsible for posttranscriptional regulation of their expression through modulation of their localization and translation and degradation rates. The most studied of these mRNA consensus sequences are the AU-rich elements (AREs), which are present in mRNAs for genes such as *Il1b*, *Il6*, *Il8*, *Nos2* (iNOS), *Ptgs2* (COX-2) and *Tnfa*. In addition, the posttranscriptional regulatory element (PRE) is found in the CD83 mRNA. These elements are bound by proteins, such as tristetraprolin (TTP), BRF1, KSRP, AUF1, CUGBP2, HuR (ELAV1), TIA-1 and TIAR (40). In the specific case of TNF- α mRNA, in addition to its tight transcriptional control, it exhibits posttranscriptional and posttranslational controls that guarantee rapid, transient production of TNF- α in response to stimuli, such as LPS and cytokines (41). TNF- α mRNA is bound by the ARE-binding protein TTP, which renders it translationally repressed and unstable. Macrophage stimulation induces phosphorylation of HuR by both p38 and MK2, changing HuR subcellular localization from the nucleus to the cytoplasm, where it can compete with TTP for binding to TNF- α mRNA. In addition, the kinases MK2 and MK3 phosphorylate TTP, decreasing its ability to compete with HuR for binding to the mRNA ARE. HuR-bound TNF- α mRNA is translationally active, meaning that it can associate with ribosomes, initiate protein synthesis and attach to the ER (via SRP) to produce pro-TNF- α protein (42).

Given that eIF5A has been demonstrated to have a direct function in protein synthesis and is suggested to control the translation of a subset of mRNAs in the cell (43-45). It is likely that eIF5A may impact the translation or mRNA stability of these ARE-containing mRNAs. The results herein suggest that GC7 decreases the translation rates of TNF- α mRNA. Likewise, the anti-inflammatory small molecule CNI-1493 (also known as semapimod), has been also been found to decrease translation of the TNF- α mRNA (46). Interestingly, CNI-1493 has been found to be an inhibitor of the hypusine formation in eIF5A by blocking the deoxyhypusine synthase enzyme (DHS) (47), that is, acting in the same manner as GC7. Therefore, at least for the case of TNF- α mRNA, there is strong evidence that eIF5A controls specific translation. Further studies are required to determine whether eIF5A control of TNF- α mRNA translation is dependent on ARE and ARE-binding proteins or involves the direct binding of eIF5A to TNF- α mRNA. It is also important to note that the mRNAs for CD83 and iNOS genes, which have also been hypothesized to be posttranscriptionally/translationally regulated by eIF5A, harbor *cis* elements that are bound by HuR (40, 48). Another important observation is that 3 out of 4 of the mRNAs demonstrated to have their translation regulated by eIF5A (*Chop*, *Cd83* and *Tnfa*) are translated in association with the ER. In addition, eIF5A has been shown to

associate with the ER during an ER stress condition that induces CHOP mRNA translation in insulinoma INS-1 cells. Association of eIF5A with the ER has also been observed in other mammalian cell lines and in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in non-stress conditions (49, 50). Moreover, using the yeast model, eIF5A was functionally related to Ypt1, an essential ER-to-Golgi Rab GTPase, and eIF5A association with ER membranes was found to be dependent on the translating ribosomes (19, 51). To understand how eIF5A interferes with protein synthesis from specific mRNAs, future research should involve a more comprehensive approach to elucidate the translational control exerted by eIF5A (for instance, determining the translational or ribosomal profiles of cells treated with blockers of hypusine formation),

Finally, to determine precisely how eIF5A is involved in translating specific mRNAs, we must work toward identifying the eIF5A binding site in the ribosome and clarifying how eIF5A and its hypusine residue affects the function of ribosomes. Our laboratory is now addressing this question for *Saccharomyces cerevisiae* and human eIF5A homologues and isoforms using several approaches, including directed hydroxyl radical probing of rRNA by eIF5A.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture

For all experiments, mouse RAW 264.7 cells were grown as adherent cells in DMEM (Life Technologies) with 10% fetal bovine serum (FBS) (Life Technologies) and gentamicin (Life Technologies) at 37°C in a humidified atmosphere of air containing 5% CO₂ for the time periods indicated in each experiment. For RNA isolation, ELISA, MTT and Polysomal Profile assays, the cells were grown to 70% of confluence and treated with 1 mM aminoguanidine (Sigma) and 150 µM GC7 (N1-guanyl-1,7-diaminoheptane) (Biosearch Technologies) for 16 h and then stimulated with LPS 1 µg/mL (Sigma) for 4 h.

GC7 cytotoxicity (MTT assay)

Cytotoxicity of 11-oxo-aerthionin towards the RAW264.7 cells was determined using the colorimetric MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) as described previously (52). Cytotoxicity was evaluated using spectrophotometry with a 595-nm interference filter.

Measurement of TNF- α release

TNF- α levels in culture supernatants obtained after treatment with GC7 and/or LPS were determined by ELISA using specific antibodies (purified and biotinylated) according to the manufacturer's instructions (BD Biosciences, OptEIA ELISA kits, San Diego, CA, USA).

Measurement of hypusination

RAW264.7 cells were grown to 70% confluence and treated with 1 mM of aminoguanidine, 2 µCi/mL [3H]-spermidine and 100 µM GC7 for 24 h. Then, the cells were harvested by scraping, transferred to centrifuge tubes and pelleted at 3000 rpm for 5 min at 4°C. The tubes were placed on ice, and the cells were lysed by gentle resuspension in 0.5 mL of cold lysis buffer (0.25 M EDTA, pH 8.0; 50 mM Tris-HCl, pH 7.9; 150 mM KCl; 0.1% Triton X-100; 10% glycerol and protease inhibitor cocktail) and vortex for 1 min. The lysate was centrifuged at 14000 rpm for 10 min at 4°C. Subsequently, the supernatant was carefully transferred to a new tube, and the total protein was quantified by the Bradford method. The cell extract containing 0.5 mg of protein was precipitated with 1 ml of 10% TCA containing 1 mM spermidine solution, incubated on ice for 10 minutes and centrifuged at 15,000 rpm for 10 minutes at 4°C. This step was repeated 3 times to remove the unincorporated [3H]-spermidine. The final pellet was resuspended in 100 µL of 0.1 M NaOH and counted in a scintillator (Beckman LS6500).

Polysome profile analysis

The cultures were placed on ice and treated with 100 µg/ml cycloheximide for 10 min and then rinsed with 10 mL of ice-cold phosphate-buffered saline. Adherent cells were scraped off the plate with a plastic scraper and transferred to an RNase-free conical tube. Cells were pelleted at 4000 rpm for 4 min

at 4°C. The tubes were immediately placed on ice, and the cells were lysed by gentle resuspension in 0.5 mL of cold RNase-free buffer A (50 mM NaCl, 15 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH7.4, and 30 U/mL RNase inhibitor Ribolock (Thermo Scientific)) containing 1% triton X-100. The lysate was cleared by centrifugation at 14,000 rpm at 4°C for 10 min and the supernatant was carefully removed and layered directly on top of a precooled 7–47% sucrose gradient in buffer A. The gradient tube was placed into a SW40Ti swinging bucket rotor (Beckman Instruments) and centrifuged at 39000 rpm for 3 h in a Beckman ultracentrifuge. The gradients were then fractionated by upward displacement with 60% (w/v) sucrose using a gradient fractionator connected to a Control Unit UV-1 monitor (Amersham Pharmacia Biotech) for continuous measurement of the absorbance at 254 nm.

RNA Isolation and Quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted and purified using silica-based spin columns (Qiagen RNeasy Mini Kit), following the manufacturer's instructions. The isolated total RNA (5 µg) was reverse transcribed using a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was performed with Applied Biosystems 7500 Real Time PCR equipment, using the hydrolysis probe and SYBR Green methods. Selected target genes were measured in a 96-well TaqMan Array Immune Response plate (catalog number 4414210 - Applied Biosystems), as described by the manufacturer's protocol. The resulting data from two independent samples were analyzed based on the $\Delta\Delta CT$ method (53), using the geometric means of reference *Gusb* and *Hprt1* as endogenous normalization genes. For the *I11b*, *Nos2* and *Ptgs2* genes, specific primers were used in reaction mixtures containing the SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems). Gene expression levels were calculated based on Pfaffl (2001), using the endogenous reference gene *Gapdh* message. Statistical significance was calculated using the two-tailed Student's t test. P values of less than 0.05 were considered significant.

Proteomic Analysis

2D Electrophoresis. The cells were grown to 70% confluence and treated with 1 mM aminoguanidine and 150 µM GC7 for 24 h. Adhered RAW 264.7 cells were then washed with cold TBS buffer (pH 7.8), resuspended (using a cell scraper) and pelleted at 500 xg for 5 min. The cells were resuspended in 200 µL of lysis buffer (2 M thiourea, 7 M urea, 4% CHAPS, 0.5% Triton X-100, 1X PLAC, 20 mM PMSF, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM sodium orthovanadate), lysed in vortex for 1 min and clarified at 20,000 xg for 15 min. The supernatant was collected, and the total protein was quantified by Bradford assay (BioRad). Next, 300 µg of total protein were loaded onto an IPG strip (pH 4-7, 13 cm) (GE Healthcare) after mixing with 1.5% IPG buffer (pH 4-7) and DeStreak solution to a total volume of 250 µL. The strips were incubated at room temperature overnight for the rehydration step. The IPGphor 3 (GE Healthcare) running focalization conditions were as follows: 300 V for 12 h; grad – 1,000 V up to 1,000 V/h; grad – 8,000 V up to 8,000 V/h and step – 8,000 V up to 20,000 V/h. After the first dimension of electrophoresis, each strip was equilibrated in a buffer containing 50 mM Tris HCl (pH 8.8), 30% glycerol, 2% SDS, 6 M urea and 1% DTT for 20 min at room temperature. This incubation was followed by a second equilibration period of 20 min using the same buffer, except that

DTT was replaced with 2.5% iodoacetamide to prevent thiol reoxidation. The second dimension electrophoresis was run in 12% SDS-PAGE on a GE Healthcare SE600 system.

Protein Quantification and Profiling. A total of nine 2D gels were performed to analyze all differential expressions after treatment with GC7. After electrophoresis, the gels were fixed and stained with Coomassie Blue G (Sigma) and destained according to the manufacturer's protocol. Gel images were captured on a Typhoon Trio scanner (GE Healthcare). Quantification of protein spots and comparative analyses were performed using ImageMaster 2D software (Nonlinear Dynamics), according to the manufacturer's instructions. On average, approximately 60-70% of all protein spots on each 2D gel were successfully matched to their respective protein spots on the reference gel.

Statistical Determination of Proteome Differences between treated and untreated cells. All the variation values were subjected to a logarithmic transformation to obtain an approximate normal distribution. For each spot, the transformed values between the two cell types were compared by a two-tailed Student's t test to determine if they were significantly different using a significance level of 5% (p values ≤ 0.05).

Protein Identification by MS/MS. Protein identification was performed using MALDI Q-ToF Premier - ESI (Walters). Briefly, the spots cut from each 2D gel were washed two times with water and then washed three times with 25 mM ammonium bicarbonate followed by acetonitrile. Once dehydrated with acetonitrile, the gels were treated with trypsin at 5 ng/ μ L in 25 mM ammonium bicarbonate for 10 min at room temperature. The samples were then digested overnight at 37°C, treated with 20 μ L of 0.3% formic acid and subjected to mass spectrometry. The resulting mass spectra were interpreted using the Mascot software from Matrix Sciences (www.matrixsciences.com).

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Hypusine modification of eIF5A. The polyamine spermidine, which is synthesized from putrescine, is the source of the aminobutyl moiety of hypusine, as indicated in bold structures. The synthesis of hypusine occurs at the specific lysine 50 residue (K50) of the unhyposinated eIF5A precursor by two enzymatic steps involving deoxyhypusine synthase (DHS) and deoxyhypusine hydroxylase (DOHH).

Figure 2. (A) Inhibition of hypusine formation by GC7. Detection of hypusine-containing eIF5A of RAW264.7 cells incubated for 24 h with 2 $\mu\text{Ci/mL}$ [^3H]-spermidine and treated with 100 μM GC7. The total protein from cellular extracts obtained from untreated and GC7 treated cultures was precipitated and washed with 10% TCA and free cold spermidine. Hypusine-containing eIF5A (eIF5A^{Hyp}) was detected by scintillation counting of incorporated radiation and normalized relative to the content of total eIF5A in the cell. **(B) Cellular viability upon GC7 treatment.** Percent cell viability of cells after 16 h treatments with different concentrations of GC7 (50, 100 and 150 μM) and LPS stimulations (1 $\mu\text{g/mL}$) for 4 h. **(C) Polysomal profile of RAW264.7 cells treated with GC7.** Polysomal profile of cells untreated or treated with 150 μM GC7. Cycloheximide was added to the growth medium shortly before harvesting. Whole cell extracts were prepared and resolved on sucrose gradients to visualize the indicated ribosomal species. 10 ODs of the lysate were loaded onto a sucrose gradient and fractionated.

Figure 3. Evaluation of cytokine mRNA levels. (A) Effect of treatment with different concentrations of GC7 for 16 h and LPS stimulation for 4 h on TNF- α release. The bar graph shows the levels of TNF- α release from RAW 264.7 cells after growth with no LPS stimulus, after activation with 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS and after treatment with 50, 100 and 150 μM of GC7. The graph shows the mean and standard deviation of 3 independent experiments. * $P < 0.05$. **(B)** RAW264.7 cells were cultured in the presence (y-axis) or absence (x-axis) of GC7 for 16 h and challenged with LPS stimulation for 4 h; two samples for each condition were pooled for a total of 10 μg cDNA. The results are presented as log ddCt and considered significantly up- (circles) or down-regulated (diamonds). The gray line represents no significant change in gene expression between conditions. **(C)** Bar graph showing the relative expression for genes considered significantly different in **(B)**.

Figure 4. Proteins identified to be up- or down-regulated in RAW264.7 cells after treatment with GC7. (A) Representative 2D electrophoresis analysis and close-up views of a regulated protein-spot, including a 3D view of spots from 2D gels of cells untreated (NT) or treated with GC7. The protein fold-change is displayed relative to NT (1). **(B)** Proteome analysis. Regulated proteins were classified according to their cellular function or localization using the GO tool. The gray scale indicates the relative fold-change of the noted proteins. **(C)** Percentage distribution. The proteins are illustrated according to their respective functional groups in a pie chart (relative to the number of total proteins found to be regulated). The numbers corresponding to the p-value for the analysis are also indicated ($p \leq 0.06$).

REFERENCES

1. Beutler BA. TLRs and innate immunity. *Blood*. 2009 Feb 12;113(7). PubMed PMID: WOS:000263316400004.
2. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*. 2007 Oct 18;449(7164). PubMed PMID: WOS:000250230600031.
3. Park BS, Song DH, Kim HM, Choi B-S, Lee H, Lee J-O. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature*. 2009 Apr 30;458(7242). PubMed PMID: WOS:000265754600051.
4. Akira S. Toll-like receptor signaling. *Journal of Biological Chemistry*. 2003 Oct 3;278(40). PubMed PMID: WOS:000185575100001.
5. Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2009 Oct 30;388(4). PubMed PMID: WOS:000274534700001.
6. Brock TG, McNish RW, Mancuso P, Coffey MJ, Peters-Golden M. Prolonged lipopolysaccharide inhibits leukotriene synthesis in peritoneal macrophages: mediation by nitric oxide and prostaglandins. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*. 2003 Jul;71(3-4). PubMed PMID: WOS:000185357600004.
7. Chang CF, Chau YP, Kung HN, Lu KS. The lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory response in RAW264.7 cells is attenuated by an unsaturated fatty acid-bovine serum albumin complex and enhanced by a saturated fatty acid-bovine serum albumin complex. *Inflammation Research*. 2012 Feb;61(2). PubMed PMID: WOS:000299525300008.
8. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature Immunology*. 2010 Oct;11(10). PubMed PMID: WOS:000281926900007.
9. Miyamoto S, Kashiwagi K, Ito K, Watanabe S, Igarashi K. ESTIMATION OF POLYAMINE DISTRIBUTION AND POLYAMINE STIMULATION OF PROTEIN-SYNTHESIS IN ESCHERICHIA-COLI. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1993 Jan;300(1). PubMed PMID: WOS:A1993KG98400009.
10. Watanabe S, Kusamaeguchi K, Kobayashi H, Igarashi K. ESTIMATION OF POLYAMINE BINDING TO MACROMOLECULES AND ATP IN BOVINE LYMPHOCYTES AND RAT-LIVER. *Journal of Biological Chemistry*. 1991 Nov 5;266(31). PubMed PMID: WOS:A1991GN00100035.
11. Perez-Leal O, Merali S. Regulation of polyamine metabolism by translational control. *Amino Acids*. 2012 Feb;42(2-3). PubMed PMID: WOS:000299506000019.
12. Park MH, Nishimura K, Zanelli CF, Valentini SR. Functional significance of eIF5A and its hypusine modification in eukaryotes. *Amino Acids*. 2010 Feb;38(2):491-500. PubMed PMID: WOS:000274384100015.
13. Kemper WM, Merrick WC, Redfield B, Liu CK, Weissbach H. PURIFICATION AND PROPERTIES OF RABBIT RETICULOCYTE ELONGATION FACTOR-1. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1976 1976;174(2):603-12. PubMed PMID: WOS:A1976BS79200026.

14. Acker MG, Kolitz SE, Mitchell SF, Nanda JS, Lorsch JR. Reconstitution of yeast translation initiation. *Methods Enzymol.* 2007;430:111-45. PubMed PMID: 17913637. eng.
15. Zanelli CF, Valentini S. Is there a role for eIF5A in translation? *Amino Acids.* 2007;33(2):351-8.
16. Caraglia M, Park M, Wolff E, Marra M, Abbruzzese A. eIF5A isoforms and cancer: two brothers for two functions? *Amino Acids.* 1-7.
17. Jao DLE, Chen KY. Tandem affinity purification revealed the hypusine-dependent binding of eukaryotic initiation factor 5A to the translating 80S ribosomal complex. *Journal of Cellular Biochemistry.* 2006 Feb 15;97(3):583-98. PubMed PMID: WOS:000235124100015.
18. Zanelli CF, Maragno AL, Gregio AP, Komili S, Pandolfi JR, Mestriner CA, et al. eIF5A binds to translational machinery components and affects translation in yeast. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;348(4):1358-66.
19. Dias CA, Cano VS, Rangel SM, Apponi LH, Frigieri MC, Muniz JR, 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.* 2008;275(8):1874-88.
20. Gregio AP, Cano VP, Avaca JS, Valentini SR, Zanelli CF. eIF5A has a function in the elongation step of translation in yeast. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;380(4):785-90.
21. Saini P, Eyler DE, Green R, Dever TE. Hypusine-containing protein eIF5A promotes translation elongation. *Nature.* 2009;459(7243):118-21.
22. Blaha G, Stanley RE, Steitz TA. Formation of the first peptide bond: the structure of EF-P bound to the 70S ribosome. *Science.* 2009;325(5943):966-70.
23. Xu AG, Chen KY. Hypusine is required for a sequence-specific interaction of eukaryotic initiation factor 5A with postsystematic evolution of ligands by exponential enrichment RNA. *Journal of Biological Chemistry.* 2001 Jan 26;276(4):2555-61. PubMed PMID: WOS:000166784800037.
24. Maier B, Ogihara T, Trace AP, Tersey SA, Robbins RD, Chakrabarti SK, et al. The unique hypusine modification of eIF5A promotes islet beta cell inflammation and dysfunction in mice. *Journal of Clinical Investigation.* 2010 Jun;120(6). PubMed PMID: WOS:000278324400037.
25. Robbins RD, Tersey SA, Ogihara T, Gupta D, Farb TB, Ficorilli J, et al. Inhibition of Deoxyhypusine Synthase Enhances Islet beta Cell Function and Survival in the Setting of Endoplasmic Reticulum Stress and Type 2 Diabetes. *Journal of Biological Chemistry.* 2010 Dec 17;285(51). PubMed PMID: WOS:000285185500039.
26. Kruse M, Rosorius O, Kratzer F, Bevec D, Kuhnt C, Hauber J, et al. The inhibitor of hypusine formation, GC7, selectively inhibits CD83 expression of mature dendritic cells and affects their T cell stimulatory function. *Journal of Investigative Dermatology.* 2000 Jan;114(1). PubMed PMID: WOS:000084866700150.
27. Patel PH, Costa-Mattioli M, Schulze KL, Bellen HJ. The *Drosophila* deoxyhypusine hydroxylase homologue nero and its target eIF5A are required for cell growth and the regulation of autophagy. *Journal of Cell Biology.* 2009 Jun 29;185(7). PubMed PMID: WOS:000267444400007.
28. Landau G, Bercovich Z, Park MH, Kahana C. The Role of Polyamines in Supporting Growth of Mammalian Cells Is Mediated through Their Requirement

for Translation Initiation and Elongation. *Journal of Biological Chemistry*. 2010 Apr 23;285(17):12474-81. PubMed PMID: WOS:000276787800003.

29. Li CH, Ohn T, Ivanov P, Tisdale S, Anderson P. eIF5A Promotes Translation Elongation, Polysome Disassembly and Stress Granule Assembly. *Plos One*. 2010 Apr 1;5(3). PubMed PMID: WOS:000276418200018.

30. Dias CAO, Borges Gregio AP, Rossi D, Galvao FC, Watanabe TF, Park MH, et al. eIF5A interacts functionally with eEF2. *Amino Acids*. 2012 Feb;42(2-3). PubMed PMID: WOS:000299506000027.

31. Scheuner D, Kaufman RJ. The unfolded protein response: A pathway that links insulin demand with beta-cell failure and diabetes. *Endocrine Reviews*. 2008 May;29(3). PubMed PMID: WOS:000255871000006.

32. Maier B, Tersey SA, Mirmira RG. Hypusine: a new target for therapeutic intervention in diabetic inflammation. *Discov Med*. 2010 Jul;10(50):18-23. PubMed PMID: 20670594. Epub 2010/07/31. eng.

33. Moore CC, Martin EN, Lee G, Taylor C, Dondero R, Reznikov LL, 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. *Journal of Infectious Diseases*. 2008 Nov 1;198(9). PubMed PMID: WOS:000260030200022.

34. Strand V, Kimberly R, Isaacs JD. Biologic therapies in rheumatology: lessons learned, future directions. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2007 Jan;6(1). PubMed PMID: WOS:000243255700017.

35. Duncan RF, Hershey JW. Changes in eIF-4D hypusine modification or abundance are not correlated with translational repression in HeLa cells. *J Biol Chem*. 1986;261(27):12903-6.

36. Gerner EW, Mamont PS, Bernhardt A, Siat M. POSTTRANSLATIONAL MODIFICATION OF THE PROTEIN-SYNTHESIS INITIATION-FACTOR EIF-4D BY SPERMIDINE IN RAT HEPATOMA-CELLS. *Biochemical Journal*. 1986 Oct 15;239(2). PubMed PMID: WOS:A1986E476900018.

37. Schrader R, Young C, Kozian D, Hoffmann R, Lottspeich F. Temperature-sensitive eIF5A mutant accumulates transcripts targeted to the nonsense-mediated decay pathway. *J Biol Chem*. 2006;281(46):35336-46.

38. Xue S, Barna M. Specialized ribosomes: a new frontier in gene regulation and organismal biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2012 Jun;13(6). PubMed PMID: WOS:000304354100011.

39. Schneider-Poetsch T, Ju J, Eyler DE, Dang Y, Bhat S, Merrick WC, et al. Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. *Nature Chemical Biology*. 2010 Mar;6(3). PubMed PMID: WOS:000274565100013.

40. Khabar KSA. Post-transcriptional control during chronic inflammation and cancer: a focus on AU-rich elements. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2010 Sep;67(17). PubMed PMID: WOS:000280917900006.

41. Gaestel M, Kotlyarov A, Kracht M. Targeting innate immunity protein kinase signalling in inflammation. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2009 Jun;8(6). PubMed PMID: WOS:000266516500014.

42. Tiedje C, Ronkina N, Tehrani M, Dhamija S, Laass K, Holtmann H, et al. The p38/MK2-Driven Exchange between Tristetraprolin and HuR Regulates AU-Rich. *PLoS Genet*. 2012 Sep;8(9):e1002977. PubMed PMID: 23028373. Pubmed Central PMCID: Pmc3459988. Epub 2012/10/03. eng.

43. Park MH, Wolff EC, Folk JE. Hypusine: its post-translational formation in eukaryotic initiation factor 5A and its potential role in cellular regulation. *Biofactors*. 1993;4(2):95-104.
44. Kang HA, Hershey JW. Effect of initiation factor eIF-5A depletion on protein synthesis and proliferation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 1994;269(6):3934-40.
45. Zanelli CF, Valentini SR. Pkc1 acts through Zds1 and Gic1 to suppress growth and cell polarity defects of a yeast eIF5A mutant. *Genetics*. 2005 Dec;171(4):1571-81. PubMed PMID: WOS:000234407100013.
46. Cohen PS, Nakshatri H, Dennis J, Caragine T, Bianchi M, Cerami A, et al. CNI-1493 inhibits monocyte/macrophage tumor necrosis factor by suppression of translation efficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996 Apr 30;93(9):3967-71. PubMed PMID: WOS:A1996UK55700043.
47. Sommer MN, Bevec D, Klebl B, Flicke B, Holscher K, Freudenreich T, et al. Screening assay for the identification of deoxyhypusine synthase inhibitors. *Journal of Biomolecular Screening*. 2004 Aug;9(5):434-8. PubMed PMID: WOS:000223237300008.
48. Pieper D, Schirmer S, Prechtel AT, Kehlenbach RH, Hauber J, Chemnitz J. Functional Characterization of the HuR:CD83 mRNA Interaction. *Plos One*. 2011 Aug 4;6(8). PubMed PMID: WOS:000293561200062.
49. Shi XP, Yin KC, Zimolo ZA, Stern AM, Waxman L. The subcellular distribution of eukaryotic translation initiation factor, eIF-5A, in cultured cells. *Exp Cell Res*. 1996;225(2):348-56.
50. Frigieri MC, Joao Luiz MV, Apponi LH, Zanelli CF, Valentini SR. Synthetic lethality between eIF5A and Ypt1 reveals a connection between translation and the secretory pathway in yeast. *Mol Genet Genomics*. 2008;280(3):211-21.
51. Frigieri MC, Thompson GM, Pandolfi JR, Zanelli CF, Valentini SR. Use of a synthetic lethal screen to identify genes related to TIF51A in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics and Molecular Research*. 2007 2007;6(1):152-65. PubMed PMID: WOS:000251613400018.
52. Mosmann T. RAPID COLORIMETRIC ASSAY FOR CELLULAR GROWTH AND SURVIVAL - APPLICATION TO PROLIFERATION AND CYTO-TOXICITY ASSAYS. *Journal of Immunological Methods*. 1983 1983;65(1-2). PubMed PMID: WOS:A1983RW94600004.
53. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
54. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(9):e45.

Figure 1

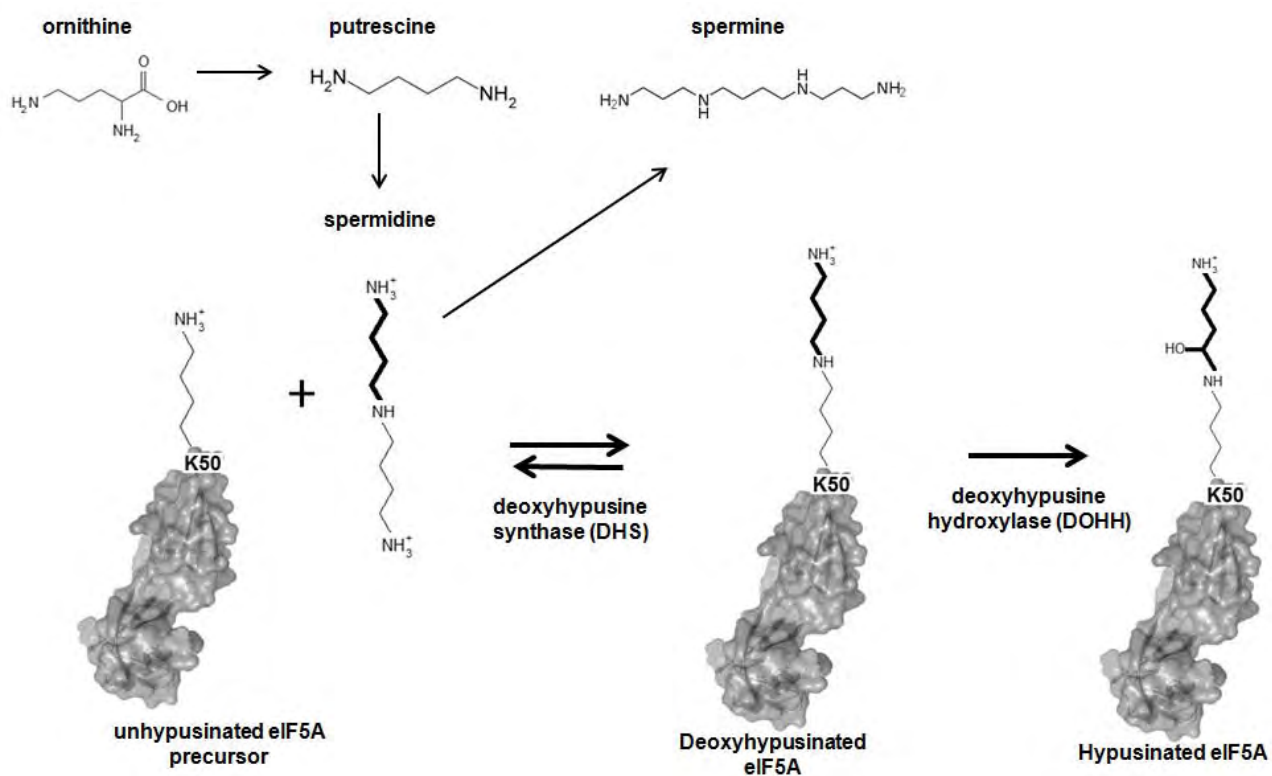


Figure 2

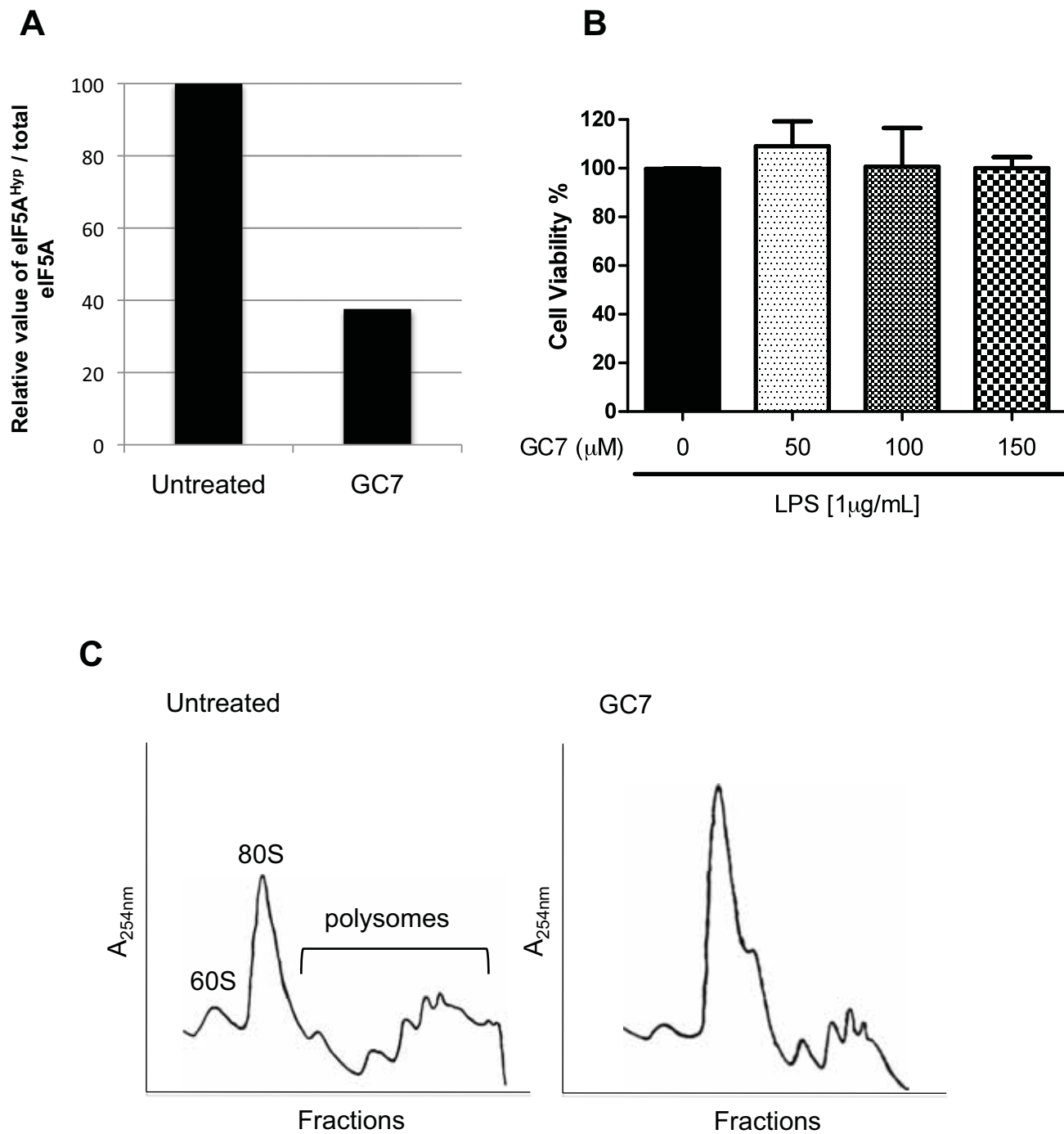


Figure 3

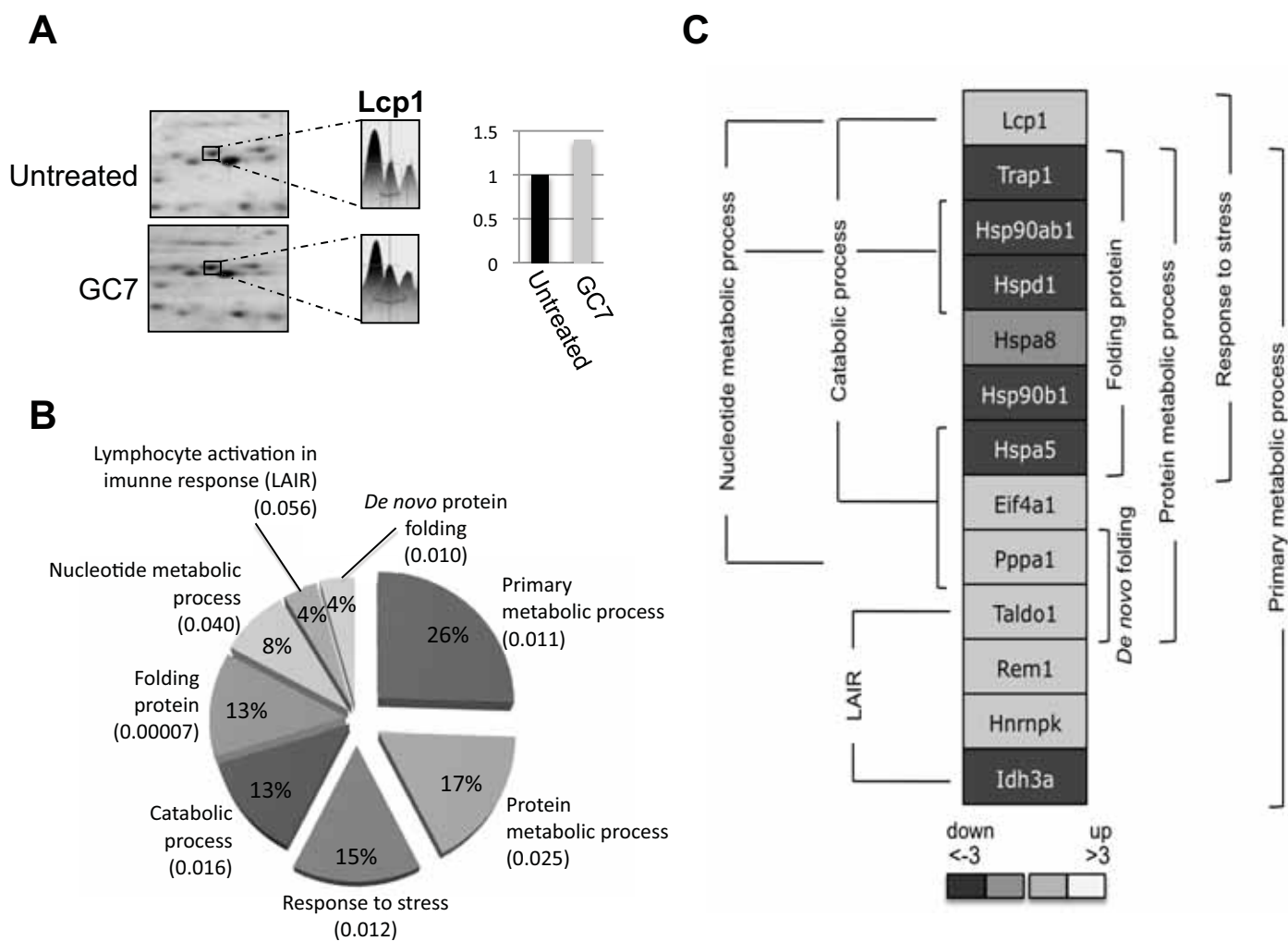
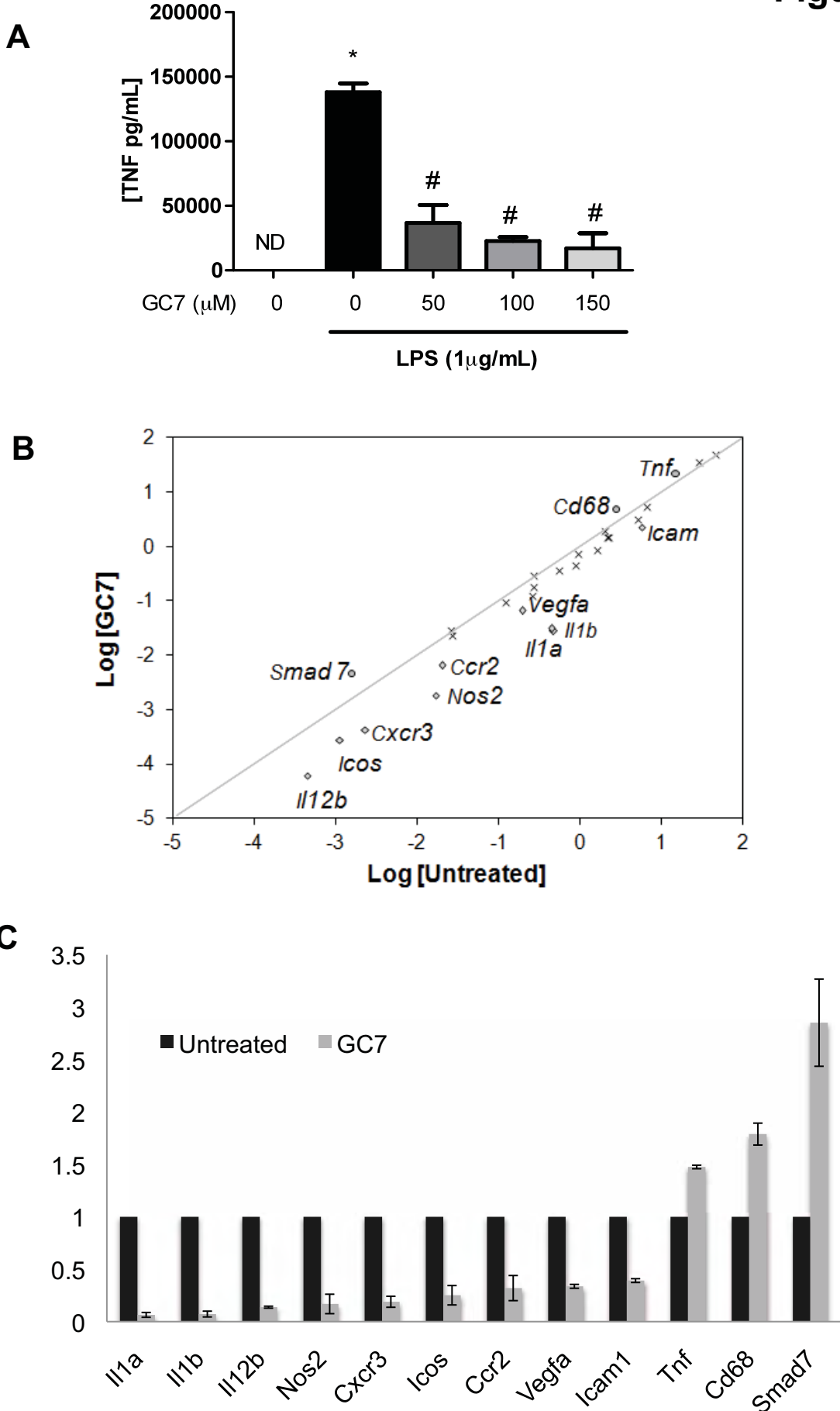


Figure 4



Supplementary Table. Set of genes tested by qRT-PCR. The genes not present in panels B and C of figure 4 were not statistically significant.

Gene	Untreated (RQ)	Treated (RQ)	Relative Gene expression
<i>Il1a</i>	1	0,0644	decreased
<i>Il1b</i>	1	0,0722	
<i>Il12b</i>	1	0,1379	
<i>Nos2</i>	1	0,1084	
<i>Cxcr3</i>	1	0,1893	
<i>Icos</i>	1	0,2518	
<i>Ccr2</i>	1	0,3201	
<i>Vegfa</i>	1	0,3368	
<i>Icam1</i>	1	0,3916	
<i>Socs1</i>	1	0,4836	not changed
<i>Nfkb2</i>	1	0,5085	
<i>Nfkb1</i>	1	0,5361	
<i>Ccl2</i>	1	0,6189	
<i>Bcl2l1</i>	1	0,6401	
<i>Stat6</i>	1	0,6417	
<i>Lif</i>	1	0,7487	
<i>Tgfb1</i>	1	0,7740	
<i>C3</i>	1	0,7814	
<i>Nfatc3</i>	1	0,7952	
<i>Cxcl11</i>	1	0,8814	
<i>Ly96</i>	1	1,0972	
<i>Cxcl10</i>	1	1,1144	
<i>Ptgs2</i>	1	1,1461	
<i>Bax</i>	1	1,1678	
<i>Ccl3</i>	1	1,2200	increased
<i>Tnfa</i>	1	1,4756	
<i>Cd68</i>	1	1,7893	
<i>Smad7</i>	1	2,8524	