
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)**

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO AMINOÁCIDO HIPUSINA

LETICIA TAMBORLIN

**Rio Claro - SP
2023**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO AMINOÁCIDO HIPUSINA

LETICIA TAMBORLIN

Orientador: Prof. Dr. Augusto Ducati Luchessi

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Rio Claro - SP

2023

T155c Tamborlin, Leticia
Caracterização funcional do aminoácido hipusina / Leticia
Tamborlin. -- Rio Claro, 2023
96 f. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientador: Augusto Ducati Luchessi

1. Modificação pós-traducional. 2. eIF5A. 3. Proliferação
celular. 4. Síntese proteica. 5. Metabolismo oxidativo. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do
Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO AMINOÁCIDO HIPUSINA

AUTORA: LETICIA TAMBORLIN

ORIENTADOR: AUGUSTO DUCATI LUCHESSI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. AUGUSTO DUCATI LUCHESSI (Participação Presencial)
Faculdade de Ciências Aplicadas / Universidade Estadual de Campinas



Profa. Dra. KAREN CRISTIANE MARTINEZ DE MORAES (Participação Presencial)
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / Unesp - IB Rio Claro



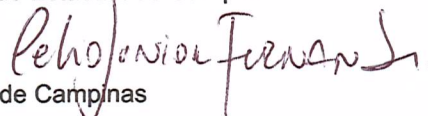
Prof. Dr. FERNANDO MOREIRA SIMABUCO (Participação Presencial)
Departamento de Bioquímica / Universidade Federal de São Paulo



Prof. Dr. ROGERIO FERREIRA LOURENÇO (Participação Presencial)
Departamento de Genética, Evolução, Microbiologia e Imunologia / Universidade Estadual de Campinas



Prof. Dr. CELIO JUNIOR DA COSTA FERNANDES (Participação Presencial)
Pós-Doutorado da Faculdade de Ciências Aplicadas / Universidade Estadual de Campinas



Rio Claro, 24 de fevereiro de 2023

Dedico esta, bem como todas as minhas demais conquistas, aos meus pais, Adriana e Edvaldo, que com muito carinho e apoio não mediram esforços para que eu concluísse mais esta etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente a Deus pela minha vida, pela saúde e pelas pessoas ao meu redor, sem tudo isso não seria possível a realização deste trabalho.

Aos meus pais, Adriana e Edvaldo, que me deram toda a estrutura para que eu me tornasse a pessoa que eu sou hoje. Agradeço especialmente pela confiança, carinho, compreensão, dedicação, por serem meu alicerce de todas as formas e pelo amor que me fortalece todos os dias. Vocês são o meu porto seguro. Muito obrigada. Amo vocês.

Ao meu esposo, Danilo Donato Xavier, pelo apoio, incentivo, respeito e carinho, por ter paciência comigo, me acalmar nos momentos difíceis e acreditar no meu potencial. Obrigada por me dar segurança e tranquilidade para seguir em frente. Amo você.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Augusto Ducati Luchessi, cabe-se um agradecimento muito especial, pela confiança depositada em meu trabalho, por toda sua capacidade de ensinar e transmitir seu amplo conhecimento, pela amizade que construímos ao longo do tempo de trabalho juntos, pelo apoio, incentivo e orientação.

A todos os meus companheiros de trabalho no Laboratório de Biotecnologia, desde de todos os membros que já passaram pelo laboratório até os membros atuais. Agradeço especialmente pela ajuda e apoio oferecidos, que contribuíram diretamente para a execução deste trabalho e também pela ótima convivência, com muitos bons momentos e risadas dentro e fora do laboratório, que me proporcionaram momentos de descontração e alegria nesta jornada.

Agradeço em especial às minhas amigas e companheiras de laboratório, Karina D. Pereira Thomaz, Jéssica Nayara de Araújo Góes, Bárbara Luísa Chagas, por toda ajuda, amizade, companheirismo, pelas muitas risadas e bons momentos compartilhados dentro e fora do laboratório.

Agradeço a Faculdade de Ciências Aplicadas da UNICAMP (FCA-UNICAMP) e todo seu corpo docente, por todo o conhecimento transmitido, que foram fundamentais para a minha formação acadêmica. Agradeço também a estrutura cedida pela Universidade e a todos os funcionários, sempre solícitos, que possibilitaram a execução deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular) do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro (IB-UNESP-RC), pela oportunidade de realização do doutorado e a todos os docentes e profissionais envolvidos no programa e na sessão técnica de pós-graduação.

Um agradecimento especial para minhas amigas da graduação Isadora Pavan, Kamila Ramponi e Karina Martins, que durante a graduação foram como irmãs para mim. Além disso, todas seguimos o mesmo caminho após a graduação, o que possibilitou que pudéssemos compartilhar experiências e conselhos durante mais essa etapa de nossas vidas. Muito obrigada por sempre estarem ao meu lado, sendo minhas companheiras, amigas e um dos pilares que me fortalecem.

Agradeço a todos os meus amigos e amigas que caminham comigo ao longo dos anos, alguns até se tornaram meus companheiros de pós-graduação, obrigada por me apoiarem na minha trajetória, por me proporcionarem bons momentos e de conforto emocional nas horas difíceis. São muitas pessoas que me vêm à cabeça agora e eles sabem quem são, muito obrigada a todos.

À Prof.^a Dra. Maria Izabel Souza Camargo por aceitar ser minha orientadora no início do meu doutorado, quando o Prof. Dr. Augusto Ducati Luchessi estava fora do país e não podia ser meu orientador. Este fato me abriu caminhos para iniciar o curso de forma imediata e também possibilitou a aprovação da bolsa logo no começo do doutorado.

Ao Prof. Dr. Leonardo Reis Silveira e Ms. Dimitrius S.P.S.F. Guimarães pela colaboração com os experimentos envolvendo o metabolismo energético, pelas discussões e trocas de informações relevantes para o trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de estudos contemplada no Processo nº: 2017/21914-1 e também pelo auxílio regular concedido ao laboratório no Processo nº: 2019/06951-3, o que possibilitou a aquisição de equipamentos e reagentes utilizados neste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Por fim, gostaria de agradecer a todos que contribuíram diretamente ou indiretamente para a minha formação acadêmica, pessoal e para a realização/conclusão deste trabalho. A todos vocês o meu sincero agradecimento. Ninguém vence sozinho!

“Agir, eis a inteligência verdadeira. Serei o que quiser. Mas tenho que querer o que for. O êxito está em ter êxito, e não em ter condições de êxito. Condições de palácio tem qualquer terra larga, mas onde estará o palácio se não o fizerem ali? ”

Fernando Pessoa

RESUMO

O aminoácido hipusina [N^{ϵ} -(4-amino-2-hidroxibutil)-lisina] foi isolado pela primeira vez em 1971 a partir de extratos de cérebro bovino. A hipusina origina-se a partir de uma modificação pós-traducional que ocorre no fator de início de tradução de eucariotos 5A (eIF5A), uma proteína altamente conservada produzida por arqueobactérias e eucariotos. A proteína eIF5A é a única descrita contendo o resíduo de aminoácido hipusina, o qual é essencial para sua atividade. A hipusina como aminoácido livre é consequência da degradação proteolítica de eIF5A. Neste trabalho, mostramos pela primeira vez evidência de atividade biológica para a hipusina livre. Para isso, células C6 derivadas de glioma de rato foram tratadas com hipusina e diferentes parâmetros celulares foram avaliados. O tratamento com hipusina reduziu significativamente a proliferação de células C6 e suprimiu fortemente sua capacidade clonogênica sem levar as células à apoptose. O tratamento com hipusina também diminuiu o conteúdo do transcrito codificador de eIF5A e o perfil global de síntese proteica, o que pode ter ocorrido devido a um *feedback* negativo em resposta à alta concentração de hipusina adicionada de forma exógena. A hipusina pode ter afetado o conteúdo e/ou a hipusinação da proteína eIF5A recém-sintetizada, o que pode ter levado a uma estagnação no processo de tradução. Além disso, o tratamento com hipusina também alterou o metabolismo celular, por meio da regulação das vias para a produção de energia, reduzindo a respiração celular acoplada à fosforilação oxidativa e aumentando o metabolismo anaeróbico, evidenciado pelo aumento da produção de lactato. Esses resultados e a relação entre eIF5A e o processo de desenvolvimento tumoral nos levaram a testar a associação da hipusina com o quimioterápico temozolomida. A combinação de temozolomida com hipusina reduziu a conversão do MTT para os mesmos níveis observados utilizando o dobro da dose de temozolomida isoladamente, demonstrando então uma ação sinérgica entre os compostos. Assim, desde 1971, este é o primeiro estudo que mostra evidência de atividade biológica para a hipusina como um aminoácido livre e não como um componente essencial para a atividade da proteína eIF5A.

Palavras-chave: Modificação pós-traducional. eIF5A. Proliferação celular. Síntese proteica. Metabolismo oxidativo.

ABSTRACT

Hypusine amino acid [N^ε-(4-amino-2-hydroxybutyl)-lysine] was first isolated in 1971 from bovine brain extracts. Hypusine originates from a post-translational modification at the eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A), a protein produced by archaeobacteria and eukaryotes. The eIF5A protein is the only one described containing the hypusine residue, which is essential for its activity. Hypusine as a free amino acid is a consequence of proteolytic degradation of eIF5A. Herein, we showed, for the first time, evidence of biological activity for the free hypusine. C6 rat glioma cells were treated with hypusine, and different cellular parameters were evaluated. Hypusine treatment significantly reduced C6 cell proliferation and potently suppressed their clonogenic capacity without leading the cells to apoptosis. The treatment also decreased the content of the eIF5A-encoding transcript and the global protein synthesis profile, which may occur due to negative feedback in response to high hypusine concentration. Hypusine could have affected the protein content and/or the hypusination of newly synthesized eIF5A and led to stagnation in the translation process. Besides, hypusine treatment also altered cellular metabolism by changing the pathways for energy production, reducing cellular respiration coupled with oxidative phosphorylation, and increasing the anaerobic metabolism. These results, and the relationship between eIF5A and tumoral development, led us to test the combination of hypusine with the chemotherapeutic drug temozolomide. Combining temozolomide with hypusine reduced the MTT conversion to the same levels as those observed using double temozolomide dosage alone, demonstrating a synergetic action between the compounds. Thus, since 1971, this is the first study showing evidence of biological activity for hypusine as a free amino acid and not as an essential component of the eIF5A protein.

Keywords: Post-translational modification. eIF5A. Cell proliferation. Protein synthesis. Oxidative metabolism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura bidimensional (2D) do aminoácido hipusina	20
Figura 2 - Hipusina originada a partir da degradação de eIF5A, formação dos dipeptídeos contendo hipusina e linha do tempo das principais descobertas acerca da hipusina livre, desde sua identificação em 1971 até 2023	21
Figura 3 - Síntese de poliaminas e a hipusinação de eIF5A	25
Figura 4 - Otimização dos oligonucleotídeos para amplificação dos genes <i>β2M</i> , <i>Eif5a</i> e <i>Mcl-1</i>	40
Figura 5 - Validação dos oligonucleotídeos para amplificação dos genes <i>β2M</i> , <i>Eif5a</i> e <i>Mcl-1</i>	41
Figura 6 - Ensaios de MTT após o tratamento com diferentes concentrações de hipusina evidenciam uma redução da conversão do MTT em formazan em células de glioma de rato C6	49
Figura 7 - O tratamento com 2 mM de hipusina reduz significativa o crescimento das células C6, o que foi registrado por imagens de microscopia óptica e contagem do número de células	51
Figura 8 - A quantificação de proteínas e RNAs totais é significativamente menor em células C6 tratadas com 2 mM de hipusina comparadas às células com o tratamento controle	52
Figura 9 - O conteúdo proteico por célula não é significativamente alterado pelo tratamento com 2 mM de hipusina, mas o conteúdo de RNAs totais é significativamente menor após 48 horas de tratamento	53
Figura 10 - Os ensaios de cicatrização de feridas mostram que o tratamento com hipusina em células C6 não é capaz de afetar o processo de migração celular	55
Figura 11 - Células de glioma de rato C6 perderam completamente a capacidade clonogênica após o tratamento com 2 mM de hipusina	57

Figura 12 - A remoção do tratamento após 72 horas reestabelece a formação de colônias, mas a capacidade clonogênica nas células tratadas com hipusina ainda é significativamente menor.....	58
Figura 13 - O tratamento com uma dose intermediária de hipusina (1 mM) reduz significativamente o número e o tamanho médio das colônias formadas	59
Figura 14 - O tratamento com 2 mM de hipusina por 72 horas não causa alterações significativas na distribuição do ciclo celular e nem no tamanho/granulosidade das células	61
Figura 15 - O tratamento com hipusina não induz as células à apoptose e aumenta o conteúdo da proteína antiapoptótica Mcl-1 em células C6.....	63
Figura 16 - O tratamento com hipusina diminui o conteúdo do transcrito <i>Eif5a</i> e o perfil global de síntese proteica.....	66
Figura 17 - Avaliação da síntese e hipusinação da proteína eIF5A-FLAG, produzida de forma exógena em células C6 através de transfecção com PEI, após o tratamento com 2 mM de hipusina por 24 horas	68
Figura 18 - A hipusina é capaz de modular o requerimento das vias metabólicas para a produção de energia nas células C6, diminuindo a taxa de consumo de oxigênio e aumentando a produção de lactato	71
Figura 19 - A hipusina atua sinergicamente com a temozolomida na redução da proliferação celular em células C6	73

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Número de células de glioma de ratos (C6) plaqueadas de acordo com cada tipo de placa e experimento.....	32
Quadro 2 - Oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos genes <i>β2M</i> , <i>Eif5a</i> e <i>Mcl-1</i> por PCR em tempo real.	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D	Bidimensional
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> (Análise de variância)
Ant	Antimicina
ARG	Arginase
ATP	Adenosina trifosfato
BAK	Proteína antagonista assassino homólogo de Bcl-2
Bcl-XL	Proteína linfoma de células B extragrandes
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (Albumina de soro bovino)
CA	Califórnia
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCCP	Protonóforo carbonilcianeto m-clorofenil hidrazona
cDNA	DNA complementar
Ct	<i>Cycle threshold</i>
DEPC	Dicarbonato de dietila
Dhp	Deoxihipusina
DHPS	Desoxihipusina sintase
DMEM	<i>Dulbecco's modification of Eagle's medium</i>
DMSO	Dimetilsufóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
dNTP	Desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP)
DO	Densidade óptica
DOOH	Desoxihipusina hidroxilase
DTT	Ditiotreitol
EBOV	Vírus Ebola
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
eIF4D	Fator de início de tradução de eucariotos 4D
eIF5A	Fator de início de tradução de eucariotos 5A
eIF5A-Dhp	eIF5A intermediário deoxihipusina
eIF5A-Hpu	eIF5A hipusinada
eIF5A-Lys ⁵⁰	Precursor inativo de eIF5A
EPM	Erro padrão da média

EUA	Estados Unidos da América
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FCA	Faculdade de Ciências Aplicadas
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GC7	N1-guanil-1,7-diamino-heptano
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> (Proteína fluorescente verde)
HE	Hesse
HIV-1	Vírus da Imunodeficiência Humana-1
Hpu	Hipusina
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IB	Instituto de Biologia
IgG	Imunoglobulina G
IL	Illinois
Inc.	<i>Incorporated</i>
IP	Iodeto de propídeo
IU-88	Anticorpo anti-eIF5A hipusinada
LDH	Lactato desidrogenase
Ltda.	Limitada
MA	Massachusetts
Mcl-1	Proteína de diferenciação celular de leucemia mielóide induzida
MO	Missouri
mRNA	RNA mensageiro
MTDR	<i>MitoTracker™ Deep Red FM</i>
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
MW	<i>Molecular weight</i> (Peso molecular)
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NPC	<i>Nuclear Pore Complex</i> (Complexo do poro nuclear)
NY	Nova York
OCR	<i>Oxygen Consumption Rate</i> (Taxa de consumo de oxigênio)
OCRC	Centro de Pesquisa em Obesidade e Comorbidades
ODC	Ornitina descarboxilase

OH	Ohio
Oligo	Oligomicina
PA	Pensilvânia
PAGE	<i>PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i> (Eletroforese em gel de poliacrilamida)
PAOX	Poliamina oxidase
PARP1	Receptor ativado por proliferador de peroxissoma 1
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i> (Tampão fosfato-salino)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
PEI	Polietilenoimina
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ácido ribonucleico)
RT-qPCR	<i>Reverse Transcription – quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
SAT1	Espermidina/espermina N1-acetiltransferase 1
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (Dodecil sulfato de sódio)
SFB	Soro fetal bovino
SMOX	Espermina oxidase
SNC	Sistema nervoso central
SP	São Paulo
SPDS	Espermidina sintase
SPMS	Espermina sintase
SUnSET	<i>Surface sensing of translation</i>
TBS-T	<i>Tris Buffered Saline</i> com Tween 20
TMRM	<i>Tetramethylrhodamine, Methyl Ester, Perchlorate</i>
TMZ	Temozolomida
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
Triton X-100	Polietilenoglicol-terc-octilfenil eter
Tween 20	Monolaurato de polietilenoglicol-sorbitana
UNESP	Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
β2M	Microglobulina β2

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
Δ	Delta
ε	Epsilon
γ	Gamma
ω	Ômega
%	Percentual
°C	Grau Celsius
x	Multiplicação - número de vezes
xg	Aceleração gravitacional
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
C ₁₀ H ₂₃ N ₃ O ₃	Hipusina
cm ²	Centímetro quadrado
CO ₂	Dióxido de carbono
g/mol	Massa molar
h	Horas
H ₂ O	Água
HCl	Ácido clorídrico
KCl	Cloreto de potássio
kDa	Quilodalton
KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotássico
L	Litro
M	Molar
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	Fosfato dissódico heptahidratado
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
ng	Nanograma

nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
rpm	Rotações por minuto
™	<i>Trade Mark</i> (marca registrada)
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
µm	Micrômetro
U	Unidade de atividade enzimática
V	Volt
X	Multiplicação - número de vezes

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 A descoberta do aminoácido hipusina e dos dipeptídeos contendo hipusina	20
1.2 O fator de início de tradução de eucariotos 5A (eIF5A), a reação de hipusinação e sua relevância biológica.....	23
2 OBJETIVOS	29
2.1 Objetivo geral.....	29
2.2 Objetivos específicos	29
3 METODOLOGIA.....	30
3.1 Materiais e reagentes	30
3.2 Descongelamento, cultivo, subcultivo e plaqueamento das linhagens celulares de glioma de rato (C6)	31
3.3 Tratamento das células com hipusina.....	32
3.4 Tratamento das células com temozolomida.....	33
3.5 Ensaios de MTT	34
3.6 Contagem do número de células	34
3.7 Ensaio de migração celular (<i>wound healing assay</i>)	35
3.8 Ensaio de formação de colônias	35
3.9 Avaliação do perfil de ciclo celular e fragmentação do DNA por citometria de fluxo	36
3.10 Extração de RNA total utilizando TRIzol™	36
3.11 Síntese de cDNA: Transcrição reversa.....	37
3.12 Reação em cadeia pela polimerase (PCR) em tempo real	38
3.13 Otimização e validação dos oligonucleotídeos	39
3.14 Transfecção celular utilizando polietilenoimina (PEI).....	42
3.15 Tratamento com puromicina para avaliação do perfil global de síntese proteica pelo ensaio de <i>SUnSET</i> (<i>Surface Sensing of Translation</i>).....	42
3.16 Preparo de extratos proteicos, quantificação de proteína total e preparo das amostras para eletroforese em gel de poliacrilamida.....	43
3.17 <i>SDS-PAGE</i> (<i>Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>) seguido de <i>immunoblotting</i>	43
3.18 Taxa de consumo de oxigênio - <i>Oxygen Consumption Rate</i> (OCR).....	44

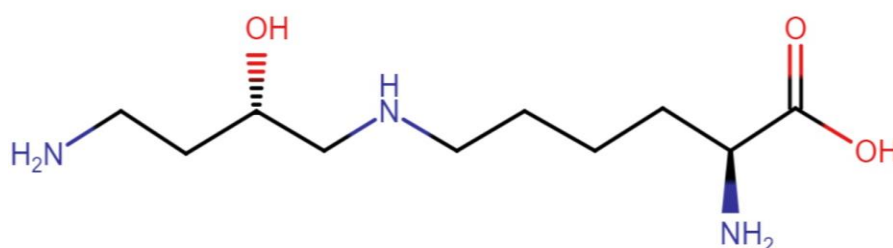
3.19 Dosagem de lactato	45
3.20 Sonda para avaliação da densidade mitocondrial: <i>MitoTracker™ Deep Red FM</i> (MTDR)	46
3.21 Sonda para avaliação do potencial de membrana mitocondrial: <i>Tetramethylrhodamine, Methyl Ester, Perchlorate</i> (TMRM).....	46
3.22 Análises estatísticas	47
4 RESULTADOS	48
4.1 O tratamento com hipusina reduz significativamente a conversão de MTT em formazan em células de glioma de rato C6.....	48
4.2 O tratamento com hipusina reduz significativamente a proliferação celular em células C6, reduzindo o número de células totais e, conseqüentemente, o conteúdo de proteínas e RNAs totais	50
4.3 O processo de migração celular não é afetado pelo tratamento com hipusina em células C6.....	54
4.4 A hipusina tem um potente efeito na redução do potencial clonogênico em células C6	56
4.5 O tratamento com hipusina em células C6 não altera o ciclo celular, não leva as células a apoptose, mas aumenta o conteúdo da proteína antiapoptótica Mcl-1.....	60
4.6 O conteúdo do transcrito <i>Eif5a</i> e o perfil global de síntese proteica são significativamente reduzidos pelo tratamento com hipusina em células C6	64
4.7 O tratamento com hipusina talvez seja capaz de regular a síntese e hipusinação de novas proteínas eIF5A em células C6 por meio de um <i>feedback</i> negativo, mas os dados ainda são inconclusivos	67
4.8 O tratamento com hipusina interfere no metabolismo energético das células C6, reduzindo a capacidade oxidativa dessas células e favorecendo a via anaeróbica para produção de energia	69
4.9 A hipusina apresenta ação sinérgica quando combinada com a temozolomida, o quimioterápico de escolha para o tratamento de gliomas.....	72
5 DISCUSSÃO	74
6 CONCLUSÃO.....	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
ANEXO I - LISTA DE PRODUÇÕES BIBLIOGRÁFICAS	92
ANEXO II - OUTRAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	94

1 INTRODUÇÃO

1.1 A descoberta do aminoácido hipusina e dos dipeptídeos contendo hipusina

Em 1971, um novo aminoácido básico denominado hipusina (Figura 1) foi isolado a partir de extrato solúvel de cérebro bovino, o qual teve sua estrutura determinada como N⁶-(4-amino-2-hidroxibutil)-2,6-diaminohexanóico (SHIBA; MIZOTE; KANEKO; NAKAJIMA *et al.*, 1971). O nome hipusina foi proposto devido ao fato de este aminoácido apresentar similaridade estrutural com parte das moléculas hidroxiputrescina e lisina (SHIBA; MIZOTE; KANEKO; NAKAJIMA *et al.*, 1971).

Figura 1 - Estrutura bidimensional (2D) do aminoácido hipusina. Fórmula molecular: C₁₀H₂₃N₃O₃. PubChem CID: 65396.

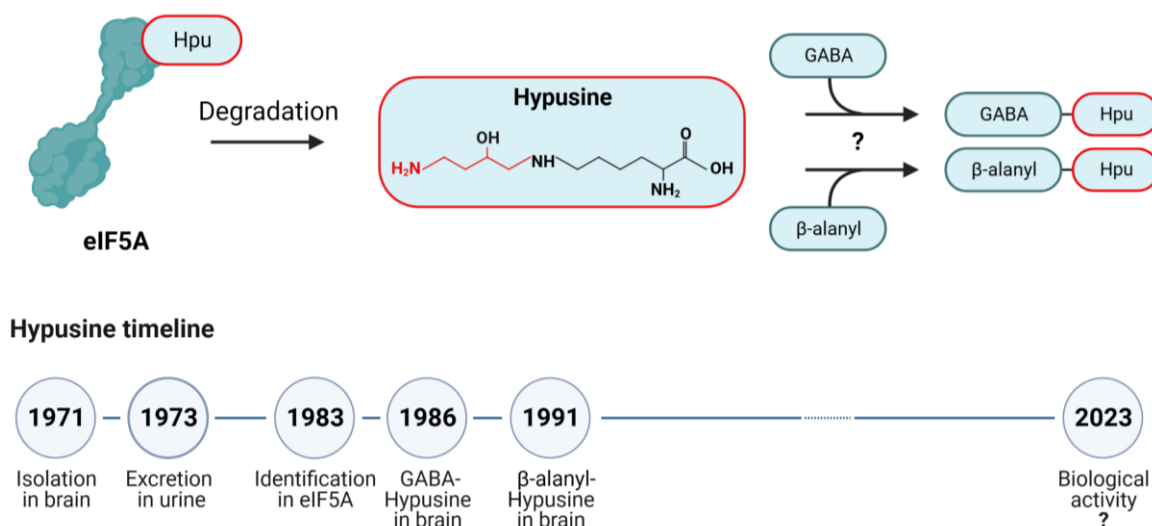


Fonte: Base de dados Reaxys® Copyright © 2022 Elsevier Life Sciences IP Limited. Reaxys é uma marca registrada da Elsevier Life Sciences IP Limited (Reaxys ID: 5737313). Disponível em: <https://www.reaxys.com/#/structure-editor>. Acessado em: 22/03/2022.

Além do cérebro, a hipusina também foi encontrada como aminoácido livre em outros tecidos, como fígado, rim, coração, músculo, pulmão, baço e sangue (NAKAJIMA; MATSUBAYASHI; KAKIMOTO; SANO, 1971; SANO; MIYAKE; KAKIMOTO, 1984) e também como componente de proteínas em diferentes tecidos de mamíferos (IMAOKA; NAKAJIMA, 1973). A hipusina também foi detectada na urina de pacientes com hiperlisinemia, inicialmente sugerindo que sua forma livre pudesse ser um produto do metabolismo da lisina (WOODY; PUPENE, 1973). Posteriormente, o resíduo de aminoácido hipusina marcado radioativamente foi identificado em uma única proteína obtida a partir de extratos de uma cultura de linfócitos oriundos de sangue periférico humano, cultivados com putrescina e espermidina marcadas com isótopos radioativos (PARK; COOPER; FOLK, 1981). Deste modo, foi proposto que a hipusina marcada radioativamente foi sintetizada por uma reação de modificação pós-traducional, desconhecida até então, envolvendo a

poliamina espermidina como substrato da reação (CHEN, 1983; COOPER; PARK; FOLK, 1982; PARK; COOPER; FOLK, 1982). A proteína contendo hipusina foi então identificada como o fator de início de tradução de eucariotos 4D (eIF-4D) (COOPER; PARK; FOLK; SAFER *et al.*, 1983), atualmente conhecida como fator de início de tradução de eucariotos 5A (eIF5A). Até o presente momento, o eIF5A continua sendo a única proteína descrita que contém o resíduo de aminoácido hipusina, da qual a degradação proteolítica resulta na liberação de hipusina livre (TAUC; COUGNON; CARCY; MELIS *et al.*, 2021). Além da hipusina livre, também foram identificados em cérebros de mamíferos variantes estruturais da hipusina na forma de dipeptídeos, como o α -(γ -aminobutiril)-hipusina (GABA-hipusina) (SANO; KOTANI; KAKIMOTO, 1986) e o α -(β -alanil)-hipusina (UENO; KOTANI; SANO; KAKIMOTO, 1991), sintetizados por vias bioquímicas ainda desconhecidas. Deste então, até o presente momento, não há estudos na literatura que descrevam evidências de atividade biológica tanto para hipusina em sua forma livre, como na forma de dipeptídeos (Figura 2).

Figura 2 - Hipusina originada a partir da degradação de eIF5A, formação dos dipeptídeos contendo hipusina e linha do tempo das principais descobertas acerca da hipusina livre, desde sua identificação em 1971 até 2023.



Fonte: Elaborada pela autora.

Os mamíferos em geral formam vários outros dipeptídeos contendo β -alanina e o ácido gama-aminobutírico (GABA) como, por exemplo, o α -(β -alanil)-L-histidina, conhecido como carnosina, e o α -(γ -aminobutiril)-L-histidina (GABA-L-histidina), conhecido como homocarnosina. A carnosina e a homocarnosina

possuem semelhanças estruturais com os dipeptídeos contendo hipusina e, regulam diversos mecanismos celulares, além de serem amplamente estudados.

A β -alanina e o GABA são aminoácidos não proteogênicos e, desta forma, dipeptídeos contendo estas moléculas não são produtos do catabolismo proteico. Estudos demonstram que todos os dipeptídeos contendo β -alanina e GABA são sintetizados por uma única enzima, a carnosina sintase, uma enzima da família das ligases, especificamente aquelas que formam ligações carbono-nitrogênio como ligases ácido-D-aminoácido (peptídeo sintases), presente no cérebro, músculo esquelético e cardíaco (BAUER, 2005; BAUER; SCHULZ, 1994; KALYANKAR; MEISTER, 1959; WINNICK; WINNICK, 1959). Posteriormente, estudos demonstraram que enzimas N-acetiltransferases e N-metiltransferases promovem modificações na molécula de carnosina e dão origem a outros dipeptídeos contendo β -alanina (KWIATKOWSKI; KIERSZTAN; DROZAK, 2018). Entretanto, todos os mecanismos envolvendo a biossíntese desses dipeptídeos ainda não foram completamente elucidados (KWIATKOWSKI; KIERSZTAN; DROZAK, 2018). Porém, com base nas evidências científicas existentes até o momento, acreditamos que os dipeptídeos contendo hipusina também possam ser sintetizados pela enzima carnosina sintase, assim como a maioria dos dipeptídeos contendo β -alanina e GABA.

Com relação à molécula GABA-hipusina é importante destacar que o GABA é o neurotransmissor inibitório mais representativo do sistema nervoso central (SNC), atuando em receptores ionotrópicos e metabotrópicos que levam a alteração do potencial de membrana neuronal (HÁJOS; PÁLHALMI; MANN; NÉMETH *et al.*, 2004; NGO; VO, 2019; POUILLE; SCANZIANI, 2001). Os neurotransmissores são classificados de acordo com a família química a qual pertencem. Atualmente, os neurotransmissores são divididos em seis grandes grupos: aminas biogênicas, aminoácidos, peptídeos, purinas, gases e substâncias de origem lipídica. Dentre os diferentes tipos de neurotransmissores, destacamos o grupo dos aminoácidos, do qual fazem parte os neurotransmissores GABA e o glutamato, neurotransmissor excitatório mais representativo do SNC (FONNUM, 1984; MCGRATH; BASKERVILLE; ROGERO; CASTELL, 2022; SCHOUSBOE, 1981). Neste contexto, existe a hipótese de que a hipusina possa atuar como um novo aminoácido neuromodulador do SNC, assim como vários outros aminoácidos livres presentes no encéfalo.

O dipeptídeo GABA-L-histidina (homocarnosina) tem sua localização restrita ao encéfalo, é amplamente estudado e desempenha ações regulatórias importantes no SNC (BAUER, 2005). Estudos mostram que a homocarnosina atua como antioxidante na captação de radicais livres, neurotransmissor, sistema tamponante e agente quelante de metais, especialmente de cobre e zinco (GRASSO; ARENA; BELLIA; RIZZARELLI *et al.*, 2014; PETROFF, 2002). A homocarnosina também possui propriedade anticonvulsivante e pode agir como um importante modulador da excitabilidade do córtex humano (PETROFF, 2002). Além disso, foi demonstrado que a homocarnosina é capaz de proteger encéfalos de ratos contra a lesão induzida por isquemia/reperfusão (HUANG; WANG; YU; FANG *et al.*, 2018). O fato das células desprenderem energia para realizar uma ligação covalente entre a hipusina e o GABA para formar o dipeptídeo GABA-hipusina, faz com que acreditemos que esta molécula, que possui semelhanças estruturais com a homocarnosina, também possa desempenhar ações regulatórias no SNC, assim como as citadas anteriormente para a homocarnosina.

Adicionalmente, existe ainda a possibilidade de que o GABA-hipusina possa se ligar aos receptores GABAérgicos, assim como diversas outras moléculas, sobre os quais poderia atuar como agonista, antagonista ou agonista reverso. Além disso, a hipusina poderia atuar “sequestrando” GABA e, conseqüentemente, afetando a atividade neuronal de forma indireta. Há também a possibilidade de a hipusina atuar em receptores órfãos no SNC, para os quais ainda não foram caracterizados seus ligantes e desempenhar ações neuromodulatórias ainda desconhecidas. Portanto, apesar de a hipusina em sua forma livre e como componente de dipeptídeos terem sido identificados a mais de cinco décadas, a caracterização de sua atuação em processos celulares e moleculares ainda permanece desconhecida. Desta forma, a presente tese teve como objetivo central contribuir para a elucidação do papel biológico da hipusina livre, de forma que seu uso exógeno possa ser empregado em um contexto terapeuticamente favorável.

1.2 O fator de início de tradução de eucariotos 5A (eIF5A), a reação de hipusinação e sua relevância biológica

O eIF5A, inicialmente chamado de eIF4D, foi isolado a partir de ribossomos presentes em lisados de reticulócitos de coelho (KEMPER; BERRY; MERRICK, 1976). O eIF5A é uma proteína de 17 kDa, altamente conservada em eucariotos e

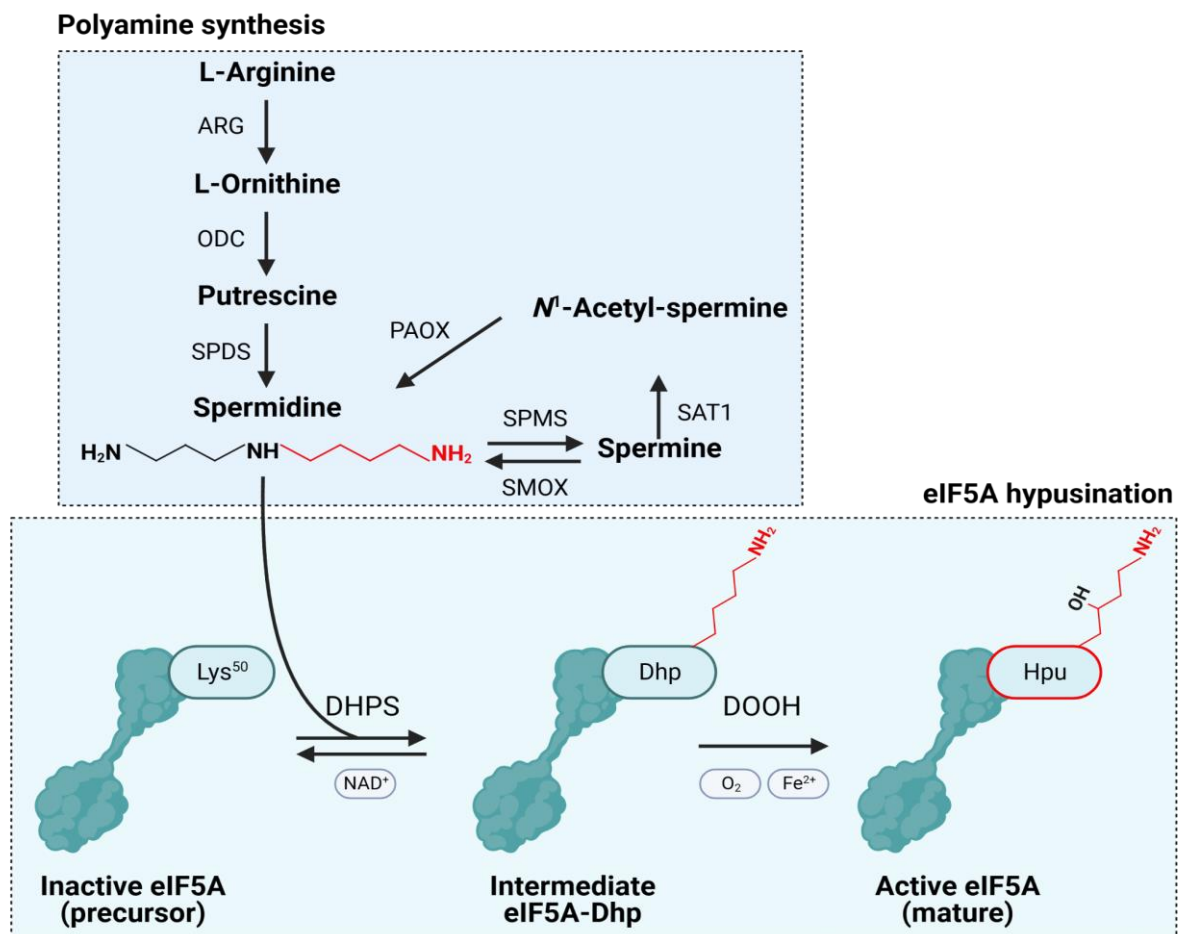
entre seus homólogos de *archaeas*, principalmente nas regiões flangeadoras ao resíduo do aminoácido hipusina (KLIER; CSONGA; JOÃO; ECKERSKORN *et al.*, 1995; KLIER; WOHL; ECKERSKORN; MAGDOLEN *et al.*, 1993; PARK; LEE; JOE, 1997; PARK; WOLFF; FOLK, 1993a). O padrão de conservação de eIF5A evidencia que seu gene sofre poucas alterações durante o processo evolutivo de todos os seres vivos e que essa proteína possui atividades biológicas essenciais para a sobrevivência celular. A comparação entre eIF5A de *Saccharomyces cerevisiae* e de humanos revelou uma identidade de aproximadamente 63%, sugerindo a importância desse fator em processos celulares comuns (SCHNIER; SCHWELBERGER; SMIT-MCBRIDE; KANG *et al.*, 1991). Além disso, a proteína eIF5A humana é capaz de substituir completamente a proteína de levedura, desempenhando as mesmas funções e garantindo o crescimento adequado destas células (SCHWELBERGER; KANG; HERSHEY, 1993).

A definição de eIF5A como sendo a única proteína conhecida a apresentar o resíduo de aminoácido hipusina em sua composição ocorreu após a realização de experimentos com poliaminas marcadas radioativamente ($[^3\text{H}]$ -putrescina ou $[^3\text{H}]$ -espermidina). Após diferentes células terem sido tratadas com as poliaminas radioativas, eIF5A foi a única proteína identificada que havia incorporado a marcação. Já a hipusina foi identificada como o único aminoácido marcado radioativamente, após a análise dos aminoácidos obtidos a partir da hidrólise ácida de eIF5A (CHEN, 1983; COOPER; PARK; FOLK, 1982; COOPER; PARK; FOLK; SAFER *et al.*, 1983; GERNER; MAMONT; BERNHARDT; SIAT, 1986; PARK; COOPER; FOLK, 1981; 1982; TORRELIO; PAZ; GALLOP, 1984). O aminoácido hipusina é essencial para a atividade de eIF5A e para a viabilidade celular, pois células nas quais a hipusinação foi inibida se tornaram inviáveis (PARK; LEE; JOE, 1997; SASAKI; ABID; MIYAZAKI, 1996; SCHNIER; SCHWELBERGER; SMIT-MCBRIDE; KANG *et al.*, 1991).

A hipusina é formada a partir de uma modificação pós-traducional na proteína eIF5A, que ocorre em duas etapas de reações enzimáticas e envolve a poliamina espermidina como substrato (BARBA-ALIAGA; ALEPUZ, 2022; PARK; WOLFF, 2018) (Figura 3). Na primeira etapa, a enzima deoxihipusina sintase (DHPS) catalisa a transferência do radical 4-aminobutil da espermidina para o grupo ϵ -amino de um resíduo de lisina específica da proteína eIF5A precursora (Lisina⁵⁰ em humanos e Lisina⁵¹ em leveduras), formando o intermediário deoxihipusina

(eIF5A-Dhp) (PARK, 2006; PARK; COOPER; FOLK, 1981; 1982; PARK; WOLFF, 2018). Na segunda etapa, a enzima deoxihipusina hidroxilase (DOHH) converte irreversivelmente a eIF5A-Dhp em eIF5A hipusinada (eIF5A-Hpu) (PARK, 2006; PARK; COOPER; FOLK, 1981; 1982; PARK; WOLFF, 2018). Até o presente momento, não são conhecidas vias de biossíntese de hipusina não associadas ao processo de hipusinação de eIF5A.

Figura 3 - Síntese de poliaminas e a hipusinação de eIF5A. A espermidina, substrato para a reação de hipusinação de eIF5A é obtida pela via de síntese de poliaminas. Primeiro, o aminoácido L-arginina é convertido em L-ornitina pela arginase (ARG). A L-ornitina é convertida na poliamina putrescina pela ornitina descarboxilase (ODC). Em seguida, a espermidina é sintetizada a partir da putrescina pela enzima espermidina sintase (SPDS). Alternativamente, a espermidina é convertida em espermina pela espermina sintase (SPMS). A espermina pode ser reversivelmente convertida em espermidina pela espermina oxidase (SMOX). A espermina também pode ser convertida em N1-acetil-espermina pela espermidina/espermina N1-acetiltransferase 1 (SAT1) e depois em espermidina novamente pela poliamina oxidase (PAOX). A síntese de hipusina no precursor inativo de eIF5A (eIF5A-Lys⁵⁰) ocorre em duas etapas enzimáticas. Primeiro, a desoxihipusina sintase (DHPS) transfere o grupo 4-aminobutil da espermidina para o grupo amino da lisina, gerando um substrato de reação intermediário (eIF5A-Dhp). Em seguida, a enzima desoxihipusina hidroxilase (DOHH) adiciona um grupo hidroxila e forma o resíduo de hipusina em eIF5A (eIF5A-Hpu), que confere atividade para a proteína.



Fonte: Elaborada pela autora.

O eIF5A está envolvido na etapa de iniciação da tradução (BENNE; HERSHEY, 1978; KEMPER; BERRY; MERRICK, 1976), como inicialmente descrito, e também nos processos de alongação e término da tradução (SAINI; EYLER; GREEN; DEVER, 2009; SCHULLER; WU; DEVER; BUSKIRK *et al.*, 2017). O eIF5A associa-se com ribossomos ativamente engajados na tradução, fortalecendo o envolvimento desta proteína na síntese proteica (JAO; CHEN, 2006; ZANELLI; MARAGNO; GREGIO; KOMILI *et al.*, 2006). A importância da hipusinação para a atividade de eIF5A no processo de tradução foi mostrada a partir da observação de que eIF5A humana não hipusinada foi incapaz de estimular a síntese *in vitro* de metionil-puromicina, ensaio utilizado para avaliar a formação da primeira ligação peptídica (SMIT-MCBRIDE; SCHNIER; KAUFMAN; HERSHEY, 1989). Por último, foi demonstrado também que o eIF5A atua na alongação da tradução de proteínas contendo regiões ricas em prolina (GUTIERREZ; SHIN; WOOLSTENHULME; KIM *et al.*, 2013; LI; BELDA-PALAZÓN; FERRANDO; ALEPUZ, 2014).

Além de seu papel fundamental no processo de tradução e síntese proteica, o eIF5A também atua em outros processos celulares, tais como: transcrição, trânsito de macromoléculas pelo complexo do poro nuclear (NPC) (HOFMANN; REICHART; EWALD; MULLER *et al.*, 2001; LIPOWSKY; BISCHOFF; SCHWARZMAIER; KRAFT *et al.*, 2000; ROSORIUS; REICHART; KRATZER; HEGER *et al.*, 1999; RUHL; HIMMELSPACH; BAHR; HAMMERSCHMID *et al.*, 1993; SCHATZ; OFT; DASCHER; SCHEBESTA *et al.*, 1998; SHI; YIN; AHERN; DAVIS *et al.*, 1996; SHI; YIN; WAXMAN, 1997), decaimento de mRNAs (HOQUE; PARK; CHANG; LUCHESSI *et al.*, 2017; ZUK; JACOBSON, 1998) e proliferação e diferenciação celular (KANG; HERSHEY, 1994; LUCHESSI; CAMBIAGHI; HIRABARA; LAMBERTUCCI *et al.*, 2009; PARK; LEE; JOE, 1997; PARREIRAS-E-SILVA; LUCHESSI; REIS; OLIVER *et al.*, 2010; WANG; JIANG; QIN; XIAO *et al.*, 2019).

O papel essencial que o eIF5A desempenha nos processos celulares citados implica na correlação desta proteína na patogênese de diversas doenças humanas. A proteína eIF5A vem sendo relacionada com processos inflamatórios (DE ALMEIDA; TOLEDO; ROSSI; ROSSETTO DDE *et al.*, 2014), progressão do diabetes (IMAM; MIRMIRA; JAUME, 2014; IMAM; PRATHIBHA; DAR; ALMOTAH *et al.*, 2019), tumorigênese e metástase (FUJIMURA; CHOI; WYSE; STRNADEL *et al.*, 2015; MATHEWS; HERSHEY, 2015; MEMIN; HOQUE; JAIN; HELLER *et al.*, 2014; RIGGER; NEUNER; SHIN; YUSUPOVA *et al.*; WANG; JIANG; QIN; XIAO *et al.*,

2019) e infecções virais, tais como as causadas por HIV-1 (ANDRUS; SZABO; GRADY; HANAUSKE *et al.*, 1998; RUHL; HIMMELSPACH; BAHR; HAMMERSCHMID *et al.*, 1993; SHI; YIN; WAXMAN, 1997) e EBOV (vírus causador da doença Ebola) (OLSEN; CRESSEY; MUHLBERGER; CONNOR, 2018; OLSEN; FILONE; ROZELLE; MIRE *et al.*, 2016). Por esse motivo, o eIF5A é considerado um promissor alvo terapêutico para essas doenças, por meio da utilização de drogas inibidoras de sua hipusinação (HANAUSKE-ABEL; SAXENA; PALUMBO; HANAUSKE *et al.*, 2013; HOQUE; HANAUSKE-ABEL; PALUMBO; SAXENA *et al.*, 2009; MOUNCE; OLSEN; VIGNUZZI, 2017; OLSEN; CONNOR, 2017).

A inibição das enzimas envolvidas no processo de hipusinação também representa uma estratégia para o estudo funcional de eIF5A. Desta forma, uma grande variedade de compostos estruturalmente relacionados à espermidina foram caracterizados como inibidores da DHPS. Dentre esses, o inibidor mais potente é o N1-guanil-1,7-diamino-heptano (GC7), o qual inibiu efetivamente a formação de hipusina em células CHO (PARK; WOLFF; FOLK, 1993a; SHI; YIN; AHERN; DAVIS *et al.*, 1996). Como consequência, o GC7 apresentou efeitos antiproliferativos nestas células e em várias outras, incluindo linhagens tumorais (JASIULIONIS; LUCHESSI; MOREIRA; SOUZA *et al.*, 2007; PARK; WOLFF; FOLK, 1993b; SHI; YIN; AHERN; DAVIS *et al.*, 1996). Uma vez que a hipusina apresenta relação estrutural parcial com espermidina e com GC7, hipotetizamos que esta molécula também possa atuar como um inibidor natural da hipusinação de eIF5A.

Em estudos anteriores, foi demonstrado que encéfalo de ratos neonatos apresenta maior conteúdo da proteína eIF5A quando comparado com encéfalo de ratos adultos. Posteriormente, foi verificado que o conteúdo da proteína eIF5A sofre uma redução expressiva no córtex e no cerebelo de ratos envelhecidos quando comparado com ratos adultos (LUCHESSI; CAMBIAGHI; ALVES; PARREIRAS-E-SILVA *et al.*, 2008). Deste modo, o menor conteúdo de eIF5A, em associação com o envelhecimento, poderia coexistir com uma redução na taxa basal de síntese e degradação de eIF5A (menor reciclagem). Em função das alterações observadas no conteúdo de eIF5A é plausível a hipótese de que o conteúdo de hipusina livre também possa ser reduzido ao longo do envelhecimento, o que poderia contribuir para alterações neurológicas e para o surgimento de doenças neurodegenerativas.

Por fim, a relevância biológica da proteína eIF5A, a importância do aminoácido hipusina para sua atividade e a ocorrência natural deste aminoácido em

sua forma livre em decorrência da degradação desta proteína, sugerem que este aminoácido possa vir a desempenhar ações no metabolismo e em processos celulares, além de ser apenas um componente essencial para a atividade da proteína eIF5A.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo rastrear os efeitos celulares e moleculares do aminoácido hipusina *in vitro*, por meio de sua utilização para o tratamento da linhagem de células C6, derivadas de glioma de rato (*Rattus norvegicus*), visando a identificação de potenciais propriedades terapêuticas.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar os efeitos da hipusina em cultura de células derivadas de glioma de rato (C6) por meio da avaliação da proliferação, viabilidade, ciclo celular e apoptose utilizando microscopia óptica, ensaios de MTT e citometria de fluxo.
- Avaliar a capacidade migratória das células C6 tratadas com hipusina, através de ensaios de cicatrização de feridas (*wound healing assay*) após a realização de um risco intencional (*scratch*) na monocamada de células.
- Avaliar a capacidade clonogênica das células C6 tratadas com hipusina, por meio de ensaios de formação de colônia.
- Analisar o conteúdo do transcrito *Eif5a* em células C6 tratadas com hipusina, por *RT-qPCR* em tempo real.
- Verificar se o tratamento com hipusina exerce algum efeito sobre a hipusinação de eIF5A, por *SDS-PAGE* seguido de *immunoblotting*.
- Avaliar o perfil global de síntese proteica em células C6 tratadas com hipusina, pelo ensaio de *SUnSET* utilizando *SDS-PAGE* seguido de *immunoblotting*.
- Investigar parâmetros metabólicos como, por exemplo, perfil de respiração celular, utilizando o equipamento Oroboros, determinação da produção de lactato e da densidade e potencial de membrana mitocondrial em células C6 após o tratamento com hipusina.
- Determinar possíveis efeitos do tratamento com hipusina combinada com o fármaco quimioterápico de escolha para o tratamento de gliomas humanos, a temozolomida (TMZ), através de ensaios de MTT.

3 METODOLOGIA

3.1 Materiais e reagentes

Células de glioma de rato (C6), ATCC: CCL-107, foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Fábio Rogério (FCM-UNICAMP). *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), L-Glutamina (200 mM), Penicilina/Estreptomicina (10 000 U/mL e 10 000 µg/mL, respectivamente), Soro Fetal Bovino (SFB) e 0,25% Tripsina/EDTA foram adquiridos da *Thermo Fischer Scientific* (Waltham, MA, EUA). Ácido acético glacial, *ACRYL/BIS™ 29:1 Solution*, ágar, agarose, azul de bromofenol, azul de tripan, β-mercaptoetanol, *Bradford Reagent*, cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), dietilpirocarbonato (DEPC), dimetil sulfoxido (DMSO), ditioneitol (DTT), dodecilo sulfato de sódio (SDS), EDTA dissódico dihidratado, etanol anidro, extrato de levedura, fosfato dissódico heptahidratado (Na₂HPO₄·7H₂O), fosfato monopotássico (KH₂PO₄), glicerol, glicina, hidróxido de sódio (NaOH), isopropanol anidro, metanol, tris, triptona, Triton X-100 e Tween 20 foram adquiridos da *Amresco* (Solon, OH, EUA). *Amersham ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent* e *Nitrocellulose Membrane Amersham Protan* foram adquiridos da *GE Healthcare* (Chicago, IL, EUA). Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), DNase I, *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*, iodeto de propídeo (IP), *MitoTracker™ Deep Red FM* (MTDR), puromicina, *SYBR™ Select Master Mix*, *Tetramethylrhodamine, Methyl Ester, Perchlorate* (TMRM) e o *TRIzol™* foram adquiridos da *Thermo Fisher Scientific Inc.* (Waltham, MA, EUA). Ampicilina, antimicina A, *carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone* (CCCP), *cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail*, *PhosSTOP™*, (2S) -Hypusine dihydrochloride, oligomicina A e o *Temozolomide* (TMZ) foram adquiridos da *Sigma-Aldrich* (St. Louis, MO, EUA). O reagente *Polyethylenimine Linear* foi adquirido da *Polysciences, Inc.* (Warrington, PA, EUA). O anticorpo monoclonal anti-α-tubulina foi adquirido da *Thermo Fischer Scientific* (Waltham, MA, EUA). O anticorpo monoclonal anti-eIF5A total e o anticorpo monoclonal anti-FLAG foram adquiridos da *Sigma-Aldrich* (St. Louis, MO, EUA). O anticorpo anti-hipusina (IU-88) foi cedido pelo Dr. Raghavendra G. Mirmira (NISHIKI; FARB; FRIEDRICH; BOKVIST *et al.*, 2013). Os anticorpos anti-Bcl-XL, anti-BAK, anti-Mcl-1 e anti-PARP1 foram adquiridos da *Cell Signaling Technology, Inc.* (Danvers, MA, EUA). O anticorpo monoclonal anti-puromicina foi adquirido da *Merck Millipore* (Darmstadt, HE, Alemanha). Os anticorpos secundários

HRP-goat anti-mouse e *HRP-goat anti-rabbit* foram adquiridos da *Thermo Fischer Scientific* (Waltham, MA, EUA). Todos os oligonucleotídeos utilizados nos ensaios de PCR e tempo real foram obtidos da Exxtend Biotecnologia Ltda. (Paulínia, SP, Brasil).

3.2 Descongelamento, cultivo, subcultivo e plaqueamento das linhagens celulares de glioma de rato (C6)

Tubos de criogenia armazenados em nitrogênio líquido contendo as diferentes linhagens celulares foram submetidos a um rápido descongelamento em banho-maria a 37 °C. Em seguida, o conteúdo de células de cada linhagem foi transferido para tubos cônicos contendo 10 mL de meio de cultura DMEM suplementado com 10% SFB, 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (DMEM completo). As suspensões celulares foram centrifugadas a 260 xg por 10 minutos a temperatura ambiente e os sobrenadantes foram descartados. Em seguida, foram adicionados 10 mL de meio de cultura DMEM completo para cada linhagem celular. As células foram homogeneizadas com esse meio de cultura e as suspensões celulares foram transferidas para placas de 100 mm (diâmetro). As linhagens celulares foram mantidas em uma estufa umidificada a 37 °C contendo 5% de CO₂. Os meios de cultura foram trocados até as culturas atingirem confluência em torno de 80-90%. Os subcultivos foram realizados após a remoção dos meios de cultura, lavagem com 3 mL de tampão fosfato salino (PBS 1X [137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄·7H₂O e 1,8 mM KH₂PO₄ diluídos em H₂O]), adição de 1 mL de 0,25% Tripsina/EDTA e incubação por 1 minuto a 37 °C. Em seguida, as células foram soltas das placas por meio de “batidas” e a neutralização da tripsina foi realizada com a adição de 1 mL de meio de cultura DMEM completo. Após as células terem sido soltas por tripsinização, o volume de meio de cultura foi ajustado para possibilitar a expansão das células para o número de placas necessárias. Os procedimentos de subcultivo ou de plaqueamento das células para a execução dos experimentos foram realizados toda vez que as células atingiam confluência em torno de 80-90%. Para todos os experimentos realizados, as células sempre foram plaqueadas no dia anterior aos tratamentos, aproximadamente 18 horas antes. O número de células plaqueadas foi definido de acordo com cada tipo de placa utilizada e de experimento a ser

realizado. Os números de células utilizados para cada linhagem celular, tipo de placa e experimento estão representados nos quadros a seguir.

Quadro 1 - Número de células de glioma de ratos (C6) plaqueadas de acordo com cada tipo de placa e experimento.

EXPERIMENTO	Nº DE CÉLULAS	PLACA
MTT	3×10^3 células/poço	96 poços
Microscopia óptica, contagem de células e citometria de fluxo	$1,75 \times 10^4$ células/poço	24 poços
Migração celular	$2,5 \times 10^5$ células/poço	24 poços
Formação de colônias	5×10^2 células/poço	6 poços
Extração de RNA total (TRIzol™)	$2,5 \times 10^5$ células/placa	Placas p60
Extração de RNA total (TRIzol™)	7×10^4 células/poço	6 poços
Preparação de extratos proteicos	7×10^4 células/poço	6 poços
Transfecção celular (pEIF5A-FLAG) utilizando PEI	5×10^5 células/poço	6 poços
Consumo de oxigênio (respiração celular) no equipamento Oroboros	4×10^5 células/poço	p100
Dosagem de lactato, sondas mitocondriais MTDR e TMRM	8×10^3 células/poço	48 poços

3.3 Tratamento das células com hipusina

Primeiramente, 25 mg do composto (2S)-Hypusine dihydrochloride (MW: 306,23 g/mol) foram diluídos em 2,040 mL de água ultrapura autoclavada gerando

uma solução estoque com concentração de 40 mM. Em seguida, a solução estoque de hipusina foi diluída no meio de cultura DMEM completo para obtenção das concentrações finais desejadas para os tratamentos. Para os ensaios de MTT, as concentrações de hipusina utilizadas foram: 0 μ M (tratamento controle - adição de água em substituição a hipusina), 125 μ M, 500 μ M e 2000 μ M. Para todos os outros ensaios foram utilizados somente a concentração 0 μ M (controle) e 2000 μ M. A diluição da solução estoque foi feita de acordo com o volume de tratamento utilizado em cada placa, por exemplo, para uma placa de 6 poços foi utilizado o volume final de 2 mL (200 μ L do estoque de hipusina a 40 mM + 1800 μ L de DMEM completo) para obter a concentração final de 2000 μ M (2 mM). Para o controle, foram utilizados os mesmos volumes de água calculados para a hipusina. Os tratamentos foram realizados por 24, 48 e 72 horas. Em seguida, foram realizados os experimentos descritos nos próximos itens de acordo com cada objetivo.

3.4 Tratamento das células com temozolomida

Primeiramente, 25 mg do composto *Temozolomide* - TMZ (MW: 194,15 g/mol) foram diluídos em 1,290 mL de DMSO gerando uma solução estoque com concentração de 100 mM. Em seguida, a solução estoque de TMZ foi diluída no meio de cultura DMEM completo para obtenção das concentrações finais desejadas para os tratamentos. Para os ensaios de MTT, as concentrações de TMZ utilizadas foram: 0 μ M (tratamento controle - adição de DMSO em substituição ao TMZ), 125 μ M, 250 μ M, 500 μ M e 1000 μ M. As diluições do TMZ foram feitas de acordo com o volume de tratamento utilizado. Por exemplo, para uma placa de 96 poços, foi utilizado o volume final de 100 μ L em cada poço. Deste modo, utilizamos um “mix” para tratar todos os poços das triplicatas de cada concentração de tratamento, a fim de evitar a pipetagem de um volume muito pequeno de TMZ em cada poço e reduzir significativamente possíveis erros de pipetagem. As diluições foram realizadas seguindo o exemplo a seguir: 50 μ L do estoque de TMZ a 100 mM + 4,95 mL de DMEM completo, para obter a concentração final de 1000 μ M de TMZ. Para as concentrações inferiores, foi adicionado o volume necessário da solução estoque de TMZ a 100 mM + o volume de DMSO na quantidade suficiente para completar 50 μ L (referente ao volume de TMZ adicionado na concentração de 1000 μ M neste exemplo) + 4,95 mL de DMEM completo, a fim de manter a concentração final de 1% de DMSO por poço em todas as concentrações de tratamento utilizadas, incluindo

no controle. Para o tratamento controle, foi adicionado o mesmo volume de DMSO utilizado para a diluição de 1000 μM de TMZ (50 μL neste exemplo) + 4,95 mL de DMEM completo. Os tratamentos foram realizados por 24, 48 e 72 horas. Em seguida, foi realizado o ensaio para avaliação da viabilidade celular por MTT. Após a avaliação dos tratamentos com hipusina e TMZ separadamente, também foram realizados tratamentos combinando as mesmas concentrações de TMZ (125 μM , 250 μM , 500 μM e 1000 μM) com 2000 μM de hipusina para avaliação da viabilidade celular por MTT.

3.5 Ensaio de MTT

Após os tratamentos com as diferentes concentrações de hipusina, TMZ e hipusina + TMZ por 24, 48 e 72 horas, a viabilidade/proliferação celular e a atividade mitocondrial foram avaliadas pelo ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT). Primeiramente, o meio de cultura foi removido e 10 μL de solução de MTT (5 mg/mL diluído em PBS 1X) + 90 μL de DMEM completo foram adicionados às células, totalizando 100 μL em cada poço. Em seguida, as células foram incubadas com a solução de MTT em uma estufa umidificada a 37 °C contendo 5% de CO_2 por 2 horas. Depois, a solução de MTT foi removida e foram adicionados 100 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) em cada poço para dissolver os cristais de formazan formados pela conversão do MTT. Após a adição de DMSO, a placa foi incubada em um *shaker* com agitação a 100 rpm a 37 °C por 15 minutos. Após a incubação, a absorbância foi determinada utilizando um espectrofotômetro e a leitura foi feita no comprimento de onda de 570 nm. Por fim, os dados foram tabulados em planilhas do Excel, foi feita a normalização dos tratamentos pelo controle (*fold change*) e foram determinados os percentuais de viabilidade celular.

3.6 Contagem do número de células

Após o tratamento com hipusina por 48 e 72 horas, as células foram coletadas das placas de cultura por tripsinização. Em seguida, 10 μL das amostras foram misturados com 10 μL de azul de tripan. Após a homogeneização, 10 μL da mistura de células com o azul de tripan foram pipetados na câmara de contagem de células (*Countess™ cell counting chamber slide*), provida pelo equipamento. Em seguida, a contagem foi realizada utilizando o contador automático *Countess™ II FL Automated Cell Counter* da *Thermo Fischer Scientific* (Waltham, MA, EUA) seguindo

as recomendações do fabricante. Por fim, os dados obtidos foram coletados para a elaboração dos gráficos de número de células.

3.7 Ensaio de migração celular (*wound healing assay*)

No dia anterior ao início do experimento, $2,5 \times 10^5$ células/poço foram plaqueadas em placas de 24 poços e, em seguida, foram incubadas até atingir a confluência total (100% de confluência). No dia seguinte, foi feito o “*scratch*” na monocamada de células na região central de todos os poços com a ponta de uma ponteira (p200) e o meio de cultura DMEM completo foi substituído por 1 mL de meio de cultura DMEM sem soro fetal bovino contendo os tratamentos. As células controle foram tratadas com 900 μ L de DMEM sem soro + 100 μ L de H₂O e as células tratadas com hipusina (2 mM) foram tratadas com 900 μ L de DMEM sem soro + 100 μ L de hipusina 40 mM. A área do “*scratch*” foi analisada sob microscópio óptico e as imagens foram capturadas no tempo 0, 24, 48 e 72 horas após os tratamentos. Durante o período de tratamento, as células foram incubadas em uma estufa umidificada a 37 °C contendo 5% de CO₂. Quando necessário, a área do “*scratch*” foi quantificada usando o software *ImageJ*.

3.8 Ensaio de formação de colônias

No dia anterior ao início do experimento, as células foram plaqueadas em baixa densidade (5×10^2 células/poço) em placas de 6 poços. No dia seguinte, o meio de cultura do plaqueamento foi removido e os tratamentos foram adicionados às células. Para as células controle, foi adicionado 1800 μ L de DMEM completo + 200 μ L de H₂O e, para as células tratadas com hipusina (2mM), foi adicionado 1800 μ L de DMEM completo + 200 μ L de hipusina 40 mM. Em seguida, as células foram incubadas em uma estufa umidificada a 37 °C contendo 5% de CO₂. No primeiro experimento, as células foram tratadas com hipusina por 3 dias e, em seguida, o tratamento foi substituído por um meio de cultura DMEM completo fresco. Após a troca do meio de cultura, as células foram novamente incubadas em uma estufa umidificada a 37 °C contendo 5% de CO₂ até o final do experimento (7 dias no total). No segundo experimento, as células foram tratadas com hipusina por 7 dias consecutivos, sem que houvesse troca de meio de cultura nesse período. Para a coloração e visualização das colônias formadas, os meios de cultura foram removidos e 1 mL da solução de coloração (0,5% de cristal violeta em 25% de

metanol) foi adicionado em cada poço. Em seguida, as células foram incubadas sob agitação em um agitador do tipo gangorra por 20 minutos. Depois, as placas foram lavadas com água ultrapura e ficaram secando a temperatura ambiente o tempo necessário. Após a secagem das placas, foram feitos os registros fotográficos das colônias formadas. Quando necessário, o número e o tamanho das colônias obtidas foram determinados utilizando o software *ImageJ*.

3.9 Avaliação do perfil de ciclo celular e fragmentação do DNA por citometria de fluxo

Após o tratamento com hipusina por 24, 48 e 72 horas, as células foram coletadas das placas de cultura por tripsinização, transferidas para microtubos e centrifugadas a 300 $\times$ g por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 1 mL de PBS 1X às células, que foram centrifugadas a 300 $\times$ g por 5 minutos a temperatura ambiente. Após a lavagem, as células foram fixadas com 500 μ L de etanol 70% gelado por 30 minutos em banho de gelo. Em seguida, as células foram novamente centrifugadas a 300 $\times$ g por 10 minutos a 4 °C e lavadas novamente com 1 mL de PBS 1X. Após a última lavagem, foram adicionados 250 μ L de uma solução para marcação do DNA, contendo 20 μ g/mL de iodeto de propídeo, 10 μ g/mL de RNase e 0,1 % de Triton X-100 diluído em PBS 1X. Em seguida, as células foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente no escuro. Após a incubação, as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo BD Accuri™ C6 (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) utilizando o filtro FL-2 para excitação do iodeto de propídeo. Para cada amostra analisada foram coletados 10 000 eventos. Por fim, as porcentagens de células nas diferentes fases do ciclo celular e de fragmentação do DNA foram determinadas a partir dos dados coletados utilizando o software BD Accuri™ C6 (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA).

3.10 Extração de RNA total utilizando TRIzol™

Após o tratamento com hipusina por 24, 48 e 72 horas, as células foram lavadas com 1 mL de PBS 1X e foi adicionado 1 mL do reagente TRIzol™ em cada poço/placa. Em seguida, as células foram homogeneizadas, transferidas para microtubos e incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos. Após a incubação, foram adicionados 200 μ L de clorofórmio e as células foram homogeneizadas novamente. Após homogeneização, as misturas foram submetidas à centrifugação a

12 000 $\times$ g por 15 minutos a 4 °C. Após a separação das fases, as fases aquosas de todas as amostras foram transferidas para novos microtubos. A seguir, foram adicionados 500 μ L de isopropanol gelado nos microtubos, os quais foram incubados por 10 minutos a temperatura ambiente e, em seguida, centrifugados a 12 000 $\times$ g por 10 minutos a 4 °C. Os precipitados de RNA formados foram lavados com 1 mL de etanol 75% e, em seguida, centrifugados a 12 000 $\times$ g por 5 minutos a 4 °C. A seguir, o etanol foi removido, os precipitados foram mantidos a temperatura ambiente para secagem por 5 minutos e, em seguida, foram diluídos em 20 μ L de água ultrapura tratada com DEPC. As amostras foram aquecidas em banho seco a 60 °C por 10 minutos e, por fim, armazenadas a – 80 °C. Uma alíquota de cada amostra foi quantificada pela leitura no espectrofotômetro a 260 nm (A_{260} nm = 1 corresponde a 40 μ g/mL) e o grau de pureza foi determinado pela razão 260/280 nm (razão entre 1,8 e 2 indica o grau aceitável de pureza).

3.11 Síntese de cDNA: Transcrição reversa

Para a obtenção do cDNA, primeiramente, 2500 ng (2,5 μ g) de RNA total foram tratados com a enzima DNase I para a remoção do DNA genômico das amostras de RNA. Os volumes apropriados de cada amostra de RNA foram calculados e, em seguida, foram adicionados em microtubos de 0,2 mL. Logo após, foram adicionados 2,5 μ L de 10X tampão de DNase I (100 mM Tris-HCl pH 7,5; 25 mM $MgCl_2$ e 1 mM $CaCl_2$), 2,5 μ L da enzima DNase I e o volume final foi ajustado para 25 μ L com água ultrapura tratada com DEPC. Em seguida, as amostras foram incubadas no termociclador a 37 °C por 30 minutos. A inibição da DNase I foi realizada pela adição de 2,5 μ L de EDTA (50 mM), seguida pela incubação no termociclador a 65 °C por 10 minutos. Em seguida, a síntese de cDNA foi realizada utilizando o *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* da *Thermo Fisher Scientific* (Waltham, MA, EUA) seguindo as recomendações do fabricante. Primeiramente, foram adicionados 5 μ L de 10X tampão da RT, 2 μ L de 100 mM *dNTPmix* (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 5 μ L de 10X *RT random primers*, 2 μ L de *MultiScribe™ Reverse Transcriptase (RT)* e 8,5 μ L de água ultrapura tratada com DEPC para ajustar o volume final da reação para 50 μ L. Por fim, as amostras foram incubadas no termociclador a 25 °C por 10 minutos, a 37 °C por 120 minutos e a 85 °C por 5 minutos. Os cDNAs obtidos foram armazenados a – 20 °C.

3.12 Reação em cadeia pela polimerase (PCR) em tempo real

As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando 100 ng de cDNA (2 µL da reação a 50 ng/µL), 0,15 µM de oligonucleotídeos *Forward* e *Reverse* (1 µL de cada oligonucleotídeo com concentração estoque de 3,75 µM), 1X SYBR *Select Master Mix* (12,5 µL do estoque 2X concentrado) e água ultrapura tratada com DEPC (8,5 µL) para completar o volume final da reação para 25 µL. Os parâmetros de ciclagem foram: 10 minutos a 95 °C, seguido por 40 ciclos de: 15 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C e 30 segundos a 72 °C. Os oligonucleotídeos foram desenhados com base no banco de dados *GenBank* utilizando a ferramenta de software *Primer-BLAST* desenvolvida pelo *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*, a qual gera pares de oligonucleotídeos específicos para os alvos de interesse. Cada conjunto de oligonucleotídeos foi projetado para reconhecer regiões únicas de cDNA de *Eif5a*, *Mcl-1* e $\beta 2M$ de ratos (*Rattus norvegicus*). O gene constitutivo $\beta 2M$ foi escolhido, pois não apresentava alterações significativas induzidas pelos tratamentos realizados. O conteúdo relativo dos mRNAs foi determinado após a normalização com o gene $\beta 2M$ utilizando o método comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (*cycle threshold*). Este método é apresentado como a alteração do gene alvo em relação ao gene endógeno. Os oligonucleotídeos utilizados nas reações estão descritos no Quadro 3.

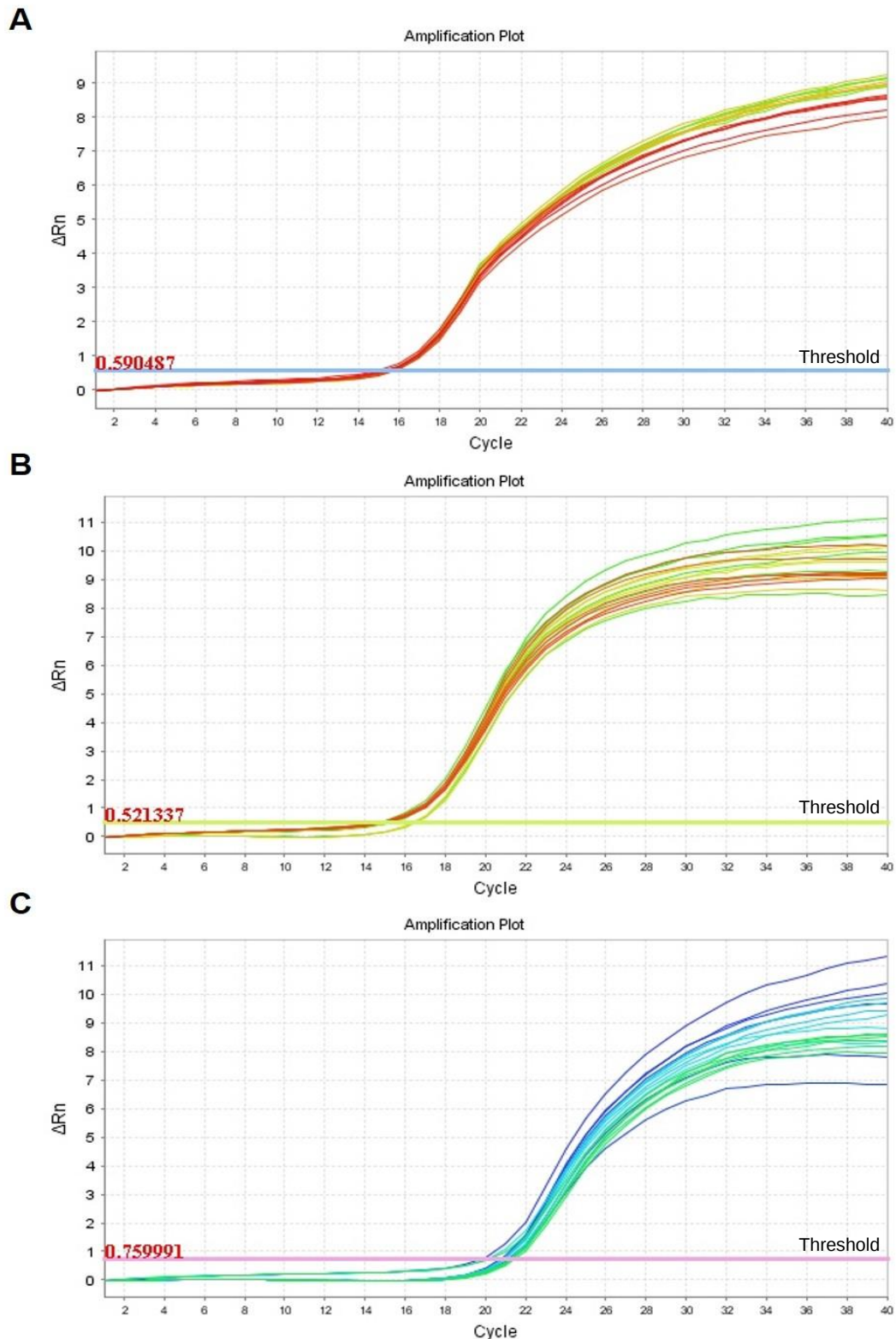
Quadro 2 - Oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos genes $\beta 2M$, *Eif5a* e *Mcl-1* por PCR em tempo real.

ALVO	SEQUÊNCIA	
$\beta 2M$	F R	5' TGAATTCACACCCACCGAGA 3' 5' TTACATGTCTCGGTCCCAGG 3'
<i>Eif5a</i>	F R	5' AATAACTGGCTTCCAGGGTGG 3' 5' TGGATAGGAGTCCAGCCAAG 3'
<i>Mcl-1</i>	F R	5' TGCTTCGGAACTGGACATTAAA 3' 5' ATGGGTCATCACTCGAGAAAAAG 3'

3.13 Otimização e validação dos oligonucleotídeos

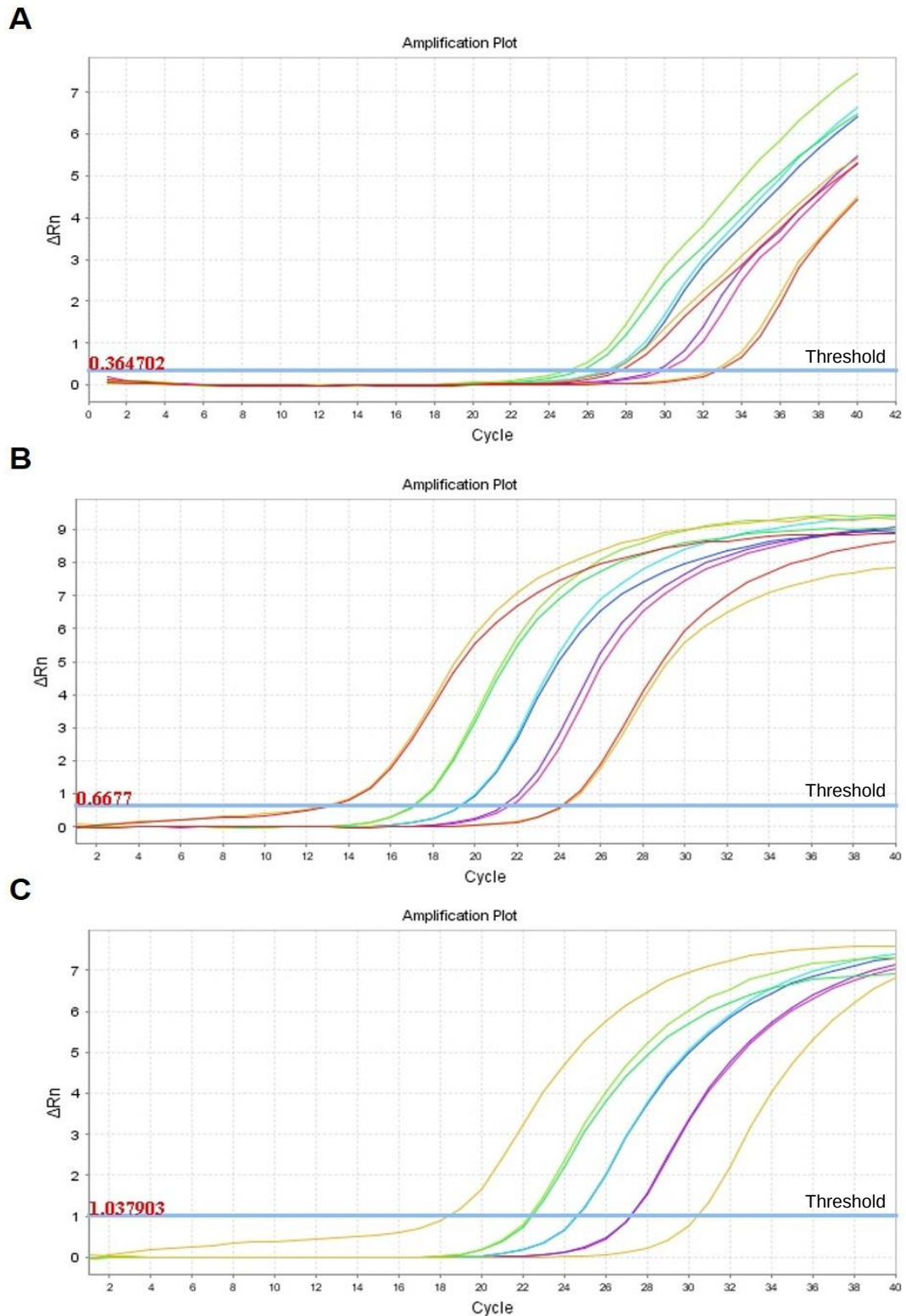
Antes de iniciarmos a quantificação dos genes nas amostras tratadas, foi feita a otimização dos oligonucleotídeos adquiridos, na qual testamos diferentes combinações de concentrações de cada iniciador (0,15, 0,3 e 0,6 μM) para determinar a concentração ideal de uso (Figura 4). Definida a concentração de uso, foi feita a validação dos oligonucleotídeos, na qual avaliamos diferentes diluições do cDNA controle (400, 80, 16, 3,2 e 0,64 ng) para determinar a eficiência de amplificação dos pares de oligonucleotídeos (Figura 5). Após a realização das padronizações e verificação de que nenhum par de oligonucleotídeos adquiridos se anelavam em alvos inespecíficos, foram realizadas as reações de PCR em tempo real.

Figura 4 - Otimização dos oligonucleotídeos para amplificação dos genes $\beta 2M$, *Eif5a* e *Mcl-1*. Diferentes concentrações (0,15; 0,3 e 0,6 μM) dos oligonucleotídeos *forward* e *reverse* específicos para amplificação de cada gene avaliado foram testadas utilizando a mesma concentração de cDNA controle (100 ng). (A) Curva de amplificação utilizando os iniciadores do gene $\beta 2M$. (B) Curva de amplificação utilizando os iniciadores do gene *Eif5a*. (C) Curva de amplificação utilizando os iniciadores do gene *Mcl-1*.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 5 - Validação dos oligonucleotídeos para amplificação dos genes $\beta 2M$, *Eif5a* e *Mcl-1*. Após a otimização dos oligonucleotídeos, foi definida a concentração de uso (0,15 μM) para todos os iniciadores, tanto forward quanto reverse, para os três genes avaliados. Para determinar a eficiência de amplificação dos iniciadores, foram testadas diferentes concentrações (400, 80, 16, 3,2 e 0,64 ng) do cDNA controle. (A) Curvas de amplificação do gene $\beta 2M$. (B) Curvas de amplificação do gene *Eif5a*. (C) Curvas de amplificação do gene *Mcl-1*.



Fonte: Elaborada pela autora.

3.14 Transfecção celular utilizando polietilenoimina (PEI)

No dia anterior ao início do experimento, 5×10^5 células/poço foram plaqueadas em placas de 6 poços. No dia seguinte, o meio de cultura do plaqueamento foi removido e foi adicionado 750 μ L de meio de cultura DMEM sem soro fetal bovino. Para a transfecção, foram preparados tubos contendo 91 μ L de cloreto de sódio (NaCl) 150 mM + 9 μ L de polietilenoimina linear (tubos PEI) e tubos contendo o volume adequado dos plasmídeos a serem transfectados (foi utilizado 3 μ g de DNA em cada poço) + o volume adequado de cloreto de sódio (NaCl) 150 mM para completar o volume no tubo para 100 μ L (tubos DNA). Os tubos contendo PEI (100 μ L) foram adicionados aos tubos contendo DNA (100 μ L), totalizando 200 μ L. Em seguida, a mistura de PEI + DNA foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente para a formação dos complexos. Os 200 μ L dos complexos PEI + DNA foram adicionados sobre as células nos poços contendo 750 μ L de meio de cultura DMEM sem soro fetal bovino. Após a adição da solução de transfecção, também foi adicionado 50 μ L de hipusina 40 mM (concentração final de 2 mM no poço), totalizando um volume final de 1 mL em cada poço. Em seguida, as células foram incubadas em uma estufa umidificada a 37 °C contendo 5% CO₂ por 4 horas. Após o período de incubação, o meio de cultura contendo a solução de transfecção foi removido e substituído por 950 μ L de meio de cultura DMEM completo + 50 μ L de hipusina 40 mM (concentração final de 2 mM no poço). As células foram novamente incubadas em uma estufa umidificada a 37 °C contendo 5% CO₂ até completar o tempo total de 24 horas de transfecção. Após 24 horas do início da transfecção, foi feito o preparo dos extratos proteicos para avaliação do conteúdo das proteínas produzidas a partir da transfecção por *SDS-PAGE* seguido de *immunoblotting*.

3.15 Tratamento com puromicina para avaliação do perfil global de síntese proteica pelo ensaio de *SUnSET* (*Surface Sensing of Translation*)

Após o tratamento com hipusina por 48 e 72 horas e antes da extração das proteínas, as células foram tratadas com 1 μ M de puromicina (*Thermo Fischer Scientific*) por 30 minutos. Após a incubação com puromicina, as células foram lavadas com PBS 1X e foi feita a extração de proteínas seguindo o protocolo descrito no item 3.16. A técnica de *SUnSET* permite avaliar a incorporação da puromicina à peptídeos recém-sintetizados (GOODMAN; HORNBERGER, 2013; GOODMAN; MABREY; FREY; MIU *et al.*, 2011). Após a separação das proteínas

por eletroforese em gel de poliacrilamida foi feita a detecção imunológica dos peptídeos marcados com puomicina utilizando um anticorpo específico anti-puomicina (*Merck Millipore*).

3.16 Preparo de extratos proteicos, quantificação de proteína total e preparo das amostras para eletroforese em gel de poliacrilamida

Após o tratamento com hipusina por 48 e 72 horas, as células foram lavadas com PBS 1X e, em seguida, foram coletadas utilizando um raspador de células. Para a coleta, foram adicionados 30 µL de tampão de lise para proteínas (100 mM Tris-HCl - pH 7,4; 10 mM EDTA - pH 8,0; 1 mM DTT; 1% Triton-X100, 1X coquetel de inibidores de protease (cOmplete™) e 1X coquetel inibidor de fosfatases (PhosSTOP™) diluídos em H₂O). Após a raspagem, as células foram transferidas para tubos de microcentrífuga e foram mantidas em banho de gelo por 25 minutos, com agitação no vortex a cada 5 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12 000 xg por 10 minutos a 4 °C, os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos de microcentrífuga e submetidos à quantificação proteica no espectrofotômetro (absorbância a 595 nm) utilizando o método de Bradford (BRADFORD, 1976; NOBLE; BAILEY, 2009). Após a quantificação proteica, foram utilizados 30 µg de proteína total de cada amostra para a detecção das proteínas de interesse. Em seguida, as amostras foram preparadas para aplicação no gel de poliacrilamida. Para o preparo, foi adicionado tampão de amostra 3X concentrado (188 mM Tris-HCl - pH 6,8; 3% SDS; 30% glicerol; 0,01% azul bromofenol e 15% β-mercaptoetanol diluídos em H₂O) em um volume suficiente para se obter a concentração final de 1X do tampão na amostra. Em seguida, as amostras foram fervidas a 95 °C por 5 minutos em banho seco e armazenadas no gelo até aplicação no gel.

3.17 SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) seguido de immunoblotting

Após o preparo, as amostras foram aplicadas em géis de poliacrilamida 12% e separadas por eletroforese. A eletroforese foi realizada em uma cuba específica com a adição de aproximadamente 1 L de tampão de corrida 1X (50 mM Tris; 0,38 M glicina; 1,8 mM EDTA e 0,1% SDS diluídos em H₂O) e aplicação de uma corrente elétrica a 100 V até a separação desejada das proteínas. Em seguida, as proteínas

foram transferidas para membranas de nitrocelulose em um sistema de transferência úmido, utilizando aproximadamente 1 L de tampão de transferência 1X (24,8 mM Tris; 192 mM glicina e 10% metanol diluídos em H₂O) sob diferença de potencial de 100 V por 1 hora. Após a transferência, as membranas de nitrocelulose foram bloqueadas para ligações não específicas dos anticorpos com 5% de leite desnatado diluído em tampão TBS-T (10 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl e 0,02% Tween-20 diluídos em H₂O) a temperatura ambiente por 40 minutos. Em seguida, as membranas foram incubadas *overnight* (aproximadamente 18 horas) com diluições adequadas de anticorpos primários diluídos em TBS-T contendo 5% de leite desnatado ou *bovine serum albumin* (BSA). Após esse período, as membranas foram lavadas com tampão TBS-T por 5 vezes de 5 minutos em cada lavagem. Em seguida, as membranas foram incubadas com os anticorpos secundários anti-IgG conjugados à peroxidase (HRP) diluídos em TBS-T contendo 5% de leite desnatado a temperatura ambiente por 1 hora. Cada anticorpo secundário utilizado era específico para o reconhecimento dos antígenos dos animais nos quais os anticorpos primários foram produzidos. Após 5 novas lavagens de 5 minutos cada, foi adicionado 1 mL do reagente quimioluminescentes *ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare) às membranas, as quais foram imediatamente reveladas em um equipamento fotodocumentador *G: BOX Chemi XRQ* da *Syngene* (Cambridge, Reino Unido) ou expostas a um filme autorradiográfico e reveladas utilizando as soluções reveladora e fixadora (Kodak). A captação das imagens foi realizada utilizando o software *GeneSys* fornecido pelo fabricante do equipamento (*Syngene*, Cambridge, Reino Unido) ou os filmes autorradiográficos foram digitalizados utilizando uma impressora. Quando necessário, as intensidades luminosas das bandas obtidas foram quantificadas por densitometria óptica, utilizando o software *ImageJ* (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

3.18 Taxa de consumo de oxigênio - *Oxygen Consumption Rate* (OCR)

Após o tratamento com hipusina por 72 horas, as células foram lavadas com PBS 1X e coletadas por tripsinização. Em seguida, as células foram transferidas para tubos de microcentrífuga e centrifugadas a 1000 $\times$ g a 25 °C por 5 minutos. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram descartados e as células foram homogeneizadas em 1 mL de meio HS 2% contendo 25 mM de glicose, pH 7,3. Em seguida, foi realizada a contagem das células seguindo o protocolo descrito no item

3.6. Após a contagem, foram utilizadas 2×10^6 células viáveis para a mensuração do consumo de oxigênio. A taxa de consumo de oxigênio (*oxygen consumption rate* - OCR) foi monitorada utilizando o equipamento Oroboros Oxygraph-2K. A aquisição (em intervalos de 2 segundos) e a análise dos dados foram realizadas utilizando o pacote de *software DatLab*, fornecido pelo próprio fabricante do equipamento (OROBOROS, Innsbruck, Áustria). A OCR foi avaliada utilizando $1 \mu\text{M}$ de oligomicina (Oligo) para inibir a ATP sintase, $2 \mu\text{M}$ do protonóforo carbonilcianeto m-clorofenil hidrazona (CCCP) para desacoplar a fosforilação oxidativa mitocondrial e $1 \mu\text{M}$ de rotenona/antimicina (Ant) para bloquear a respiração mitocondrial e determinar a OCR não mitocondrial. A OCR ligada ao ATP foi calculada subtraindo a desacoplada, após a adição de oligomicina, da OCR basal. A capacidade de reposição foi determinada pela subtração basal da OCR induzida por CCCP. Os valores da OCR não mitocondriais foram subtraídos de todos os dados antes de serem utilizados para essas análises. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pâncreas Endócrino e Metabolismo, situado no Centro de Pesquisa em Obesidade e Comorbidades no Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (OCRC - IB - UNICAMP) coordenado pelo Prof. Dr. Leonardo dos Reis Silveira.

3.19 Dosagem de lactato

Após o tratamento com hipusina por 72 horas, os meios de cultura contendo os tratamentos foram removidos e as células foram lavadas duas vezes com 1 mL de PBS 1X para remover o excesso de fenol. Para determinação da produção de lactato, as células foram incubadas com 1 mL de PBS 1X em uma estufa umidificada a 37°C contendo 5% de CO_2 por 3 horas. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e analisado. Para dosagem do lactato liberado no sobrenadante, foi utilizado $1 \mu\text{g}$ da enzima lactato desidrogenase (LDH) e 15 mM de NAD^+ . A reação foi tamponada com Tris-HCl hidrazina (0,1 M de hidrazina e 50 mM de Tris), pH 7,2. Após a reação enzimática, a fluorescência de NADH foi determinada utilizando um espectrofotômetro com laser de 360 nm para excitação e um filtro de emissão de 460 nm para detecção. Como controle positivo, foi utilizado $1 \mu\text{M}$ de rotenona para inibir a ATP sintase e, conseqüentemente, a produção de energia proveniente da via oxidativa. A concentração de lactato nas amostras foi determinada utilizando uma curva padrão com concentrações definidas e crescentes de lactato.

3.20 Sonda para avaliação da densidade mitocondrial: *MitoTracker™ Deep Red FM* (MTDR)

Após o tratamento com hipusina por 72 horas, os meios de cultura contendo os tratamentos foram removidos e as células foram lavadas com PBS 1X. A densidade mitocondrial foi avaliada utilizando o reagente *MitoTracker™ Deep Red FM* da *Thermo Fisher Scientific Inc.* (Waltham, MA, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Primeiramente, o pó liofilizado (50 µg) foi solubilizado em DMSO para se obter uma solução estoque a 1 mM. Em seguida, foi preparada uma nova solução estoque a 100 µM. Por fim, foi preparada a solução de marcação a 100 nM, adicionando 10 µL da solução estoque a 100 µM em 10 mL de meio de cultura. Após a lavagem, foram adicionados 250 µL da solução de marcação (100 nM) e, em seguida, as células foram incubadas em uma estufa umidificada a 37 °C contendo 5% de CO₂ por 45 minutos. Após o período de incubação, a fluorescência do MTDR foi determinada utilizando um espectrofotômetro com laser de 644 nm para excitação e um filtro de emissão de 665 nm para detecção. A normalização das amostras foi feita pelo conteúdo proteico determinado por Bradford.

3.21 Sonda para avaliação do potencial de membrana mitocondrial: *Tetramethylrhodamine, Methyl Ester, Perchlorate* (TMRM)

Após o tratamento com hipusina por 72 horas, os meios de cultura contendo os tratamentos foram removidos e as células foram lavadas com PBS 1X. O potencial de membrana mitocondrial foi avaliado utilizando o reagente *Tetramethylrhodamine, Methyl Ester, Perchlorate* da *Thermo Fisher Scientific Inc.* (Waltham, MA, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Primeiramente, o pó liofilizado (25 mg) foi solubilizado em DMSO para se obter uma solução estoque a 10 mM. Em seguida, foi preparada uma nova solução estoque a 100 µM (1000X concentrada). Por fim, foi preparada a solução de marcação a 100 nM (1X concentrada), adicionando 10 µL da solução estoque a 100 µM em 10 mL de meio de cultura. Após a lavagem, foram adicionados 250 µL da solução de marcação 1X concentrada e, em seguida, as células foram incubadas em uma estufa umidificada a 37 °C contendo 5% de CO₂ por 30 minutos. Após o período de incubação, a fluorescência do TMRM foi determinada utilizando um espectrofotômetro com laser de 488 nm para excitação e um filtro de emissão de 570 nm para detecção. A

normalização das amostras foi feita pelo conteúdo proteico determinado por Bradford.

3.22 Análises estatísticas

Todos os dados mostrados representam os resultados obtidos em no mínimo três experimentos independentes. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Os dados foram analisados pelo teste *One-way ANOVA* seguido pelo pós-teste de Bonferroni (dados paramétricos) ou pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn's (dados não paramétricos) ou ainda pelo teste *t* de *Student* (comparação entre dois grupos). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software SigmaStat* versão 3.5 para *Windows* (*Systat Software, Inc.*, San Jose, CA, EUA). Os gráficos foram elaborados utilizando o *software GraphPad Prism 7* (*GraphPad Software*, San Diego, CA, EUA). As diferenças entre os resultados obtidos foram consideradas estatisticamente significativas para o valor de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

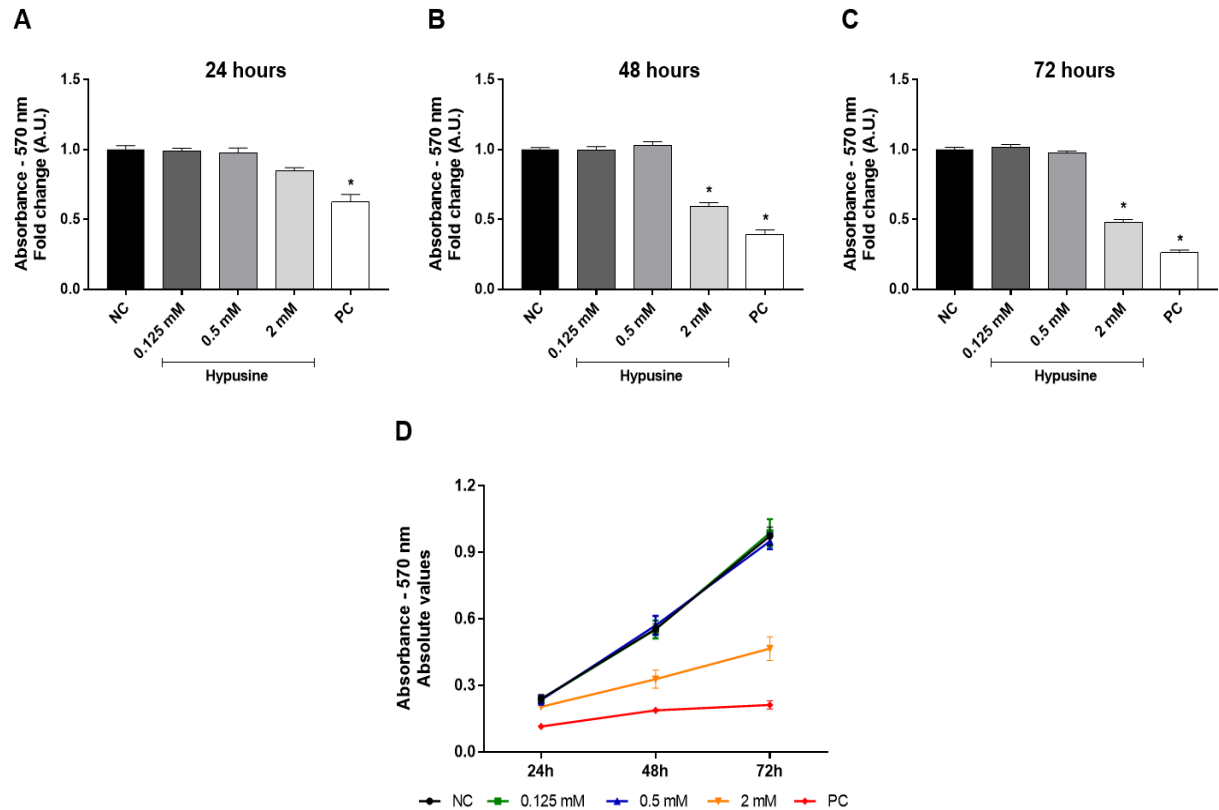
4.1 O tratamento com hipusina reduz significativamente a conversão de MTT em formazan em células de glioma de rato C6

O primeiro objetivo deste projeto consistia na determinação da concentração de uso da hipusina na linhagem de células derivadas de glioma de rato, denominada células C6. Essa linhagem foi escolhida devido à ocorrência natural do aminoácido hipusina em cérebro de mamíferos. Para isso, a viabilidade/proliferação celular foi avaliada por ensaios de MTT. O MTT (reagente de coloração amarela) é convertido pelas enzimas mitocondriais, nas células consideradas viáveis, em cristais de formazan (produto de coloração roxa) (MOSMANN, 1983). Este método colorimétrico avalia a intensidade da coloração das amostras após a diluição dos cristais de formazan, através da determinação das absorbâncias a 570 nm (MOSMANN, 1983). Deste modo, quanto maior ou menor for a conversão do MTT em formazan, maior ou menor será a intensidade da coloração roxa avaliada no final do processo, o que pode ser tanto um indicativo de proliferação tanto de viabilidade celular.

Para os ensaios, foram plaqueadas 3×10^3 células/poço em placas de 96 poços. No dia seguinte, as células foram tratadas com hipusina nas seguintes concentrações: 0,125 mM, 0,5 mM e 2 mM de *(2S)-Hypusine dihydrochloride*. As células do controle negativo (NC) foram tratadas com água ao invés de hipusina e as células do controle positivo (PC) com 10% de DMSO. Os tratamentos foram realizados por 24, 48 e 72 horas. Como resultado, foi observado que embora o tratamento com 2 mM de hipusina por 24 horas tenha apresentado uma redução na conversão de MTT em cristais de formazan de aproximadamente 15%, essa redução não foi estatisticamente significativa (Figura 6 - A). Entretanto, os tratamentos com 2 mM de hipusina por 48 e 72 horas apresentaram diminuições significativas na conversão do reagente MTT. As reduções foram de aproximadamente 40% em 48 horas e 55% em 72 horas (Figura 6 - B e C). A inclinação da curva no gráfico dos valores absolutos de absorbância indica que o tempo de tratamento intensifica o efeito da hipusina (Figura 6 - D).

Figura 6 - Ensaios de MTT após o tratamento com diferentes concentrações de hipusina evidenciam uma redução da conversão do MTT em formazan em células de glioma de rato C6.

As células foram tratadas com: água no mesmo volume utilizado para hipusina (NC - controle negativo), 0,125 mM, 0,5 mM, 2 mM de hipusina e 10% de DMSO (PC - controle positivo) por (A) 24 horas, (B) 48 horas e (C) 72 horas. Os resultados foram analisados por *One-Way ANOVA*, seguido pelo pós-teste de Bonferroni, e apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) obtida a partir de três experimentos independentes. * indica diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). (D) Valores absolutos de absorbância a 570 nm obtidos após os tratamentos com hipusina em diferentes concentrações e tempos de tratamento.



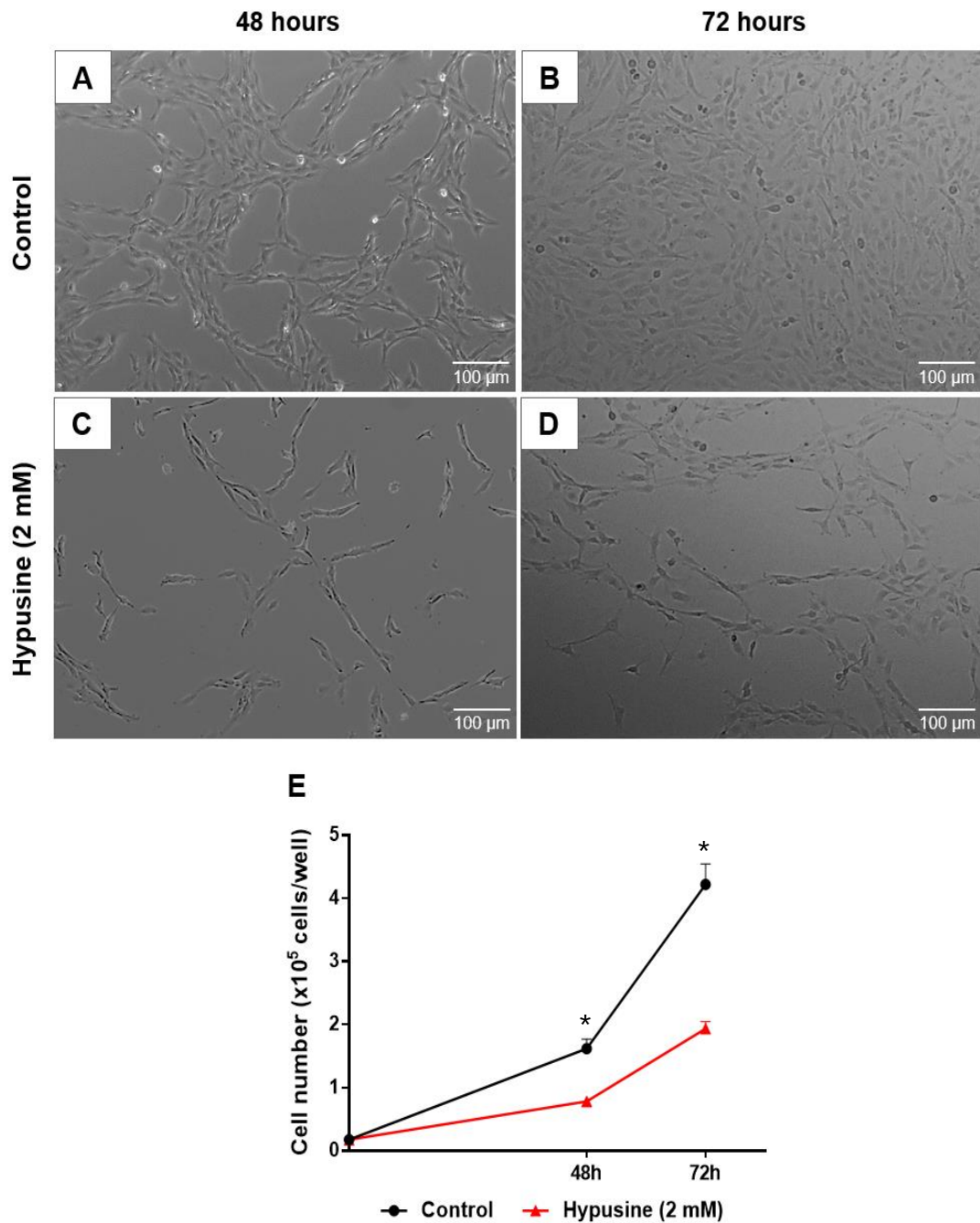
Fonte: Elaborada pela autora.

4.2 O tratamento com hipusina reduz significativamente a proliferação celular em células C6, reduzindo o número de células totais e, conseqüentemente, o conteúdo de proteínas e RNAs totais

Como não observamos alterações visuais nas células, tampouco nos ensaios de MTT nos tratamentos com as concentrações menores de hipusina, decidimos utilizar para os próximos experimentos apenas a concentração de 2 mM de hipusina. Para visualização, registro das imagens das células sob microscopia óptica e contagem do número de células, foram plaqueadas $1,75 \times 10^4$ células/poço em placas de 24 poços. No dia seguinte, as células foram tratadas com os tratamentos controle (água) e 2 mM de hipusina. Após os períodos de tratamento (48 e 72 horas) e antes da tripsinização, as células foram observadas em um microscópio óptico e as fotos foram registradas nos diferentes tempos de tratamento. Como resultado, observamos que o tratamento com hipusina não causou alterações morfológicas significativas que indicassem perda da integridade e morte celular (Figura 7 - A a D). Entretanto, observa-se um maior alongamento das células tratadas com hipusina quando comparadas às células do tratamento controle (Figura 7 - A a D).

Em seguida, foi feita a tripsinização e a contagem das células utilizando um contador automático, na qual foi possível observar uma diminuição substancial no número de células de aproximadamente 50% em 48 e 72 horas nas células tratadas com 2 mM de hipusina quando comparadas às células do tratamento controle (Figura 7 - E). A diminuição foi de $1,6 \times 10^5$ para $0,8 \times 10^5$ células/poço em 48 horas e de $4,2 \times 10^5$ para $1,9 \times 10^5$ células/poço em 72 horas (Figura 7 - E). Apesar disso, é possível notar que as células tratadas com hipusina continuaram proliferando entre os tempos de 48 e 72 horas, porém mais lentamente quando comparado às células controle. Em conjunto, estes dados apontam que os efeitos observados após 48 e 72 horas podem ser decorrentes de alguma alteração abrupta que ocorre no início do tratamento com hipusina.

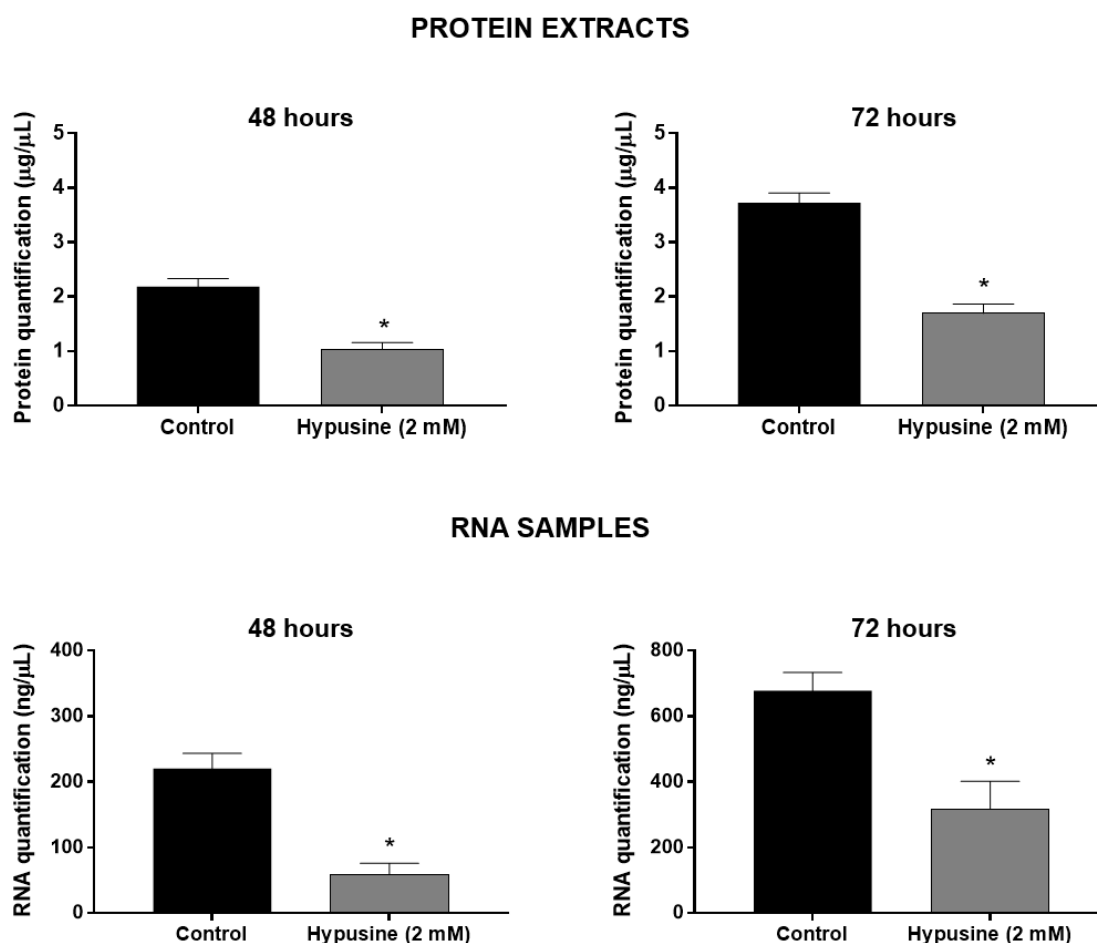
Figura 7 - O tratamento com 2 mM de hipusina reduz significativa o crescimento das células C6, o que foi registrado por imagens de microscopia óptica e contagem do número de células. Imagens de microscopia óptica do tratamento controle (A) em 48 horas e (B) em 72 horas. Imagens de microscopia óptica do tratamento com 2 mM de hipusina (C) em 48 horas e (D) em 72 horas. (E) Curva de crescimento celular construída utilizando o número absoluto de células nos poços após os tratamentos. A contagem de células foi realizada no equipamento *Countess II FL Automated Cell Counter* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) utilizando a coloração com azul de tripan. Os resultados estão apresentados com base na média $\pm$ erro padrão da média (EPM) obtida a partir de três experimentos independentes. * Indica diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).



Fonte: Elaborada pela autora.

Após a contagem, as células também foram utilizadas para a obtenção de extratos de proteínas e de RNAs totais. Com isso, foi possível observar que as quantificações dos extratos proteicos e de RNAs totais foram sempre significativamente menores nas amostras tratadas com hipusina quando comparadas às amostras do tratamento controle (Figura 8). Estes resultados, em conjunto com os dados dos ensaios de MTT, confirmam a atuação da hipusina na redução da proliferação celular em células C6, o que resulta em um menor número de células e, conseqüentemente, em uma menor conversão do reagente MTT em formazan e da quantificação dos extratos de proteínas e RNAs totais.

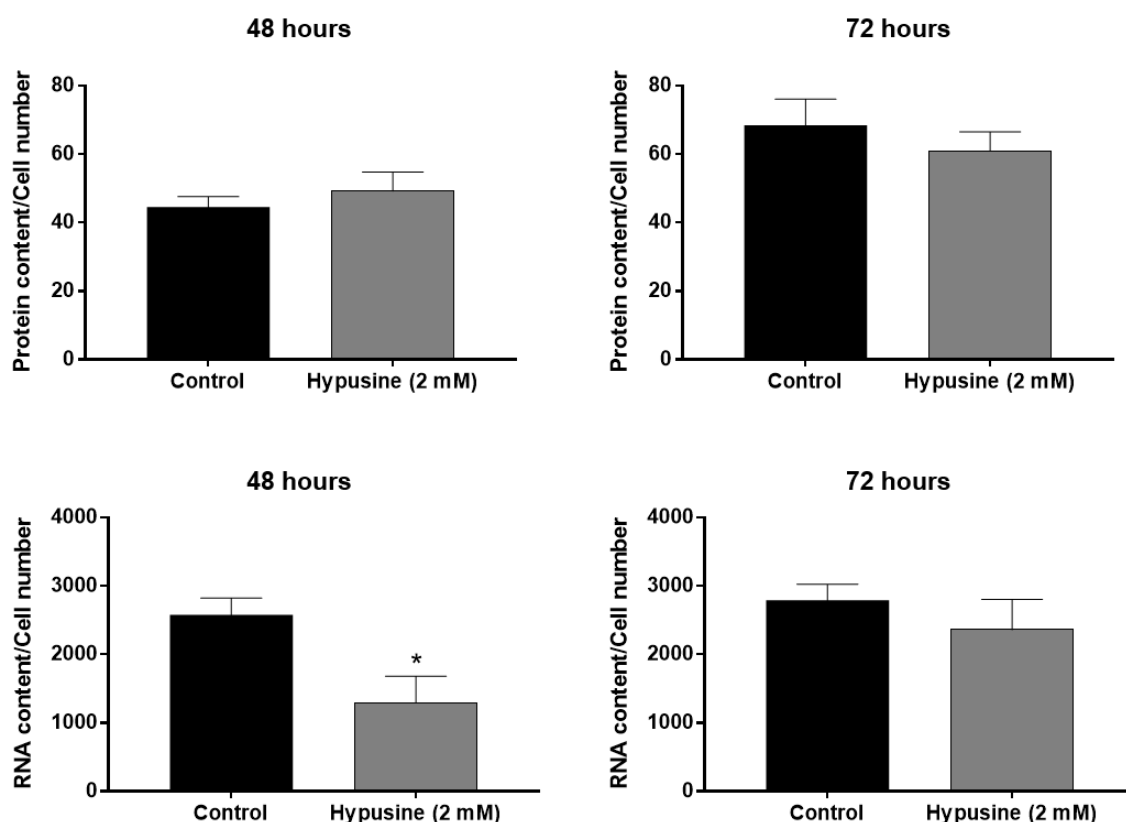
Figura 8 - A quantificação de proteínas e RNAs totais é significativamente menor em células C6 tratadas com 2 mM de hipusina comparadas às células com o tratamento controle. Painéis superiores: Gráficos ilustrando a quantificação de proteínas determinada utilizando o método de Bradford (BRADFORD, 1976) após 48 e 72 horas de tratamento. Painéis inferiores: Gráficos ilustrando a quantificação de RNA determinada por espectrofotometria utilizando o equipamento *Epoch Microplate Reader* configurado para leitura da absorbância a 260 nm, após 48 e 72 horas de tratamento. Os resultados estão apresentados com base na média $\pm$ erro padrão da média (EPM) obtida a partir de três experimentos independentes. * Indica diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).



Fonte: Elaborada pela autora.

Após normalização do conteúdo proteico e dos RNAs totais pelo número de células, foi possível observar que o tratamento com 2 mM de hipusina não altera significativamente o conteúdo de proteínas por célula, apesar de observarmos uma tendência de diminuição em 72 horas (Figura 9). Entretanto, observa-se uma diminuição significativa no conteúdo de RNAs totais por células após 48 horas de tratamento com 2 mM de hipusina e uma tendência de diminuição em 72 horas (Figura 9). Estes resultados demonstram, que o tratamento com hipusina pode também estar afetando os processos de transcrição e/ou tradução/síntese proteica de uma maneira geral.

Figura 9 - O conteúdo proteico por célula não é significativamente alterado pelo tratamento com 2 mM de hipusina, mas o conteúdo de RNAs totais é significativamente menor após 48 horas de tratamento. Painéis superiores: Gráficos ilustrando a normalização do conteúdo de proteínas totais pelo número de células após 48 e 72 horas de tratamento. Painéis inferiores: Gráficos ilustrando a normalização do conteúdo de RNAs totais pelo número de células após 48 e 72 horas de tratamento. Os resultados estão apresentados com base na média $\pm$ erro padrão da média (EPM) obtida a partir de três experimentos independentes. * Indica diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).



Fonte: Elaborada pela autora.

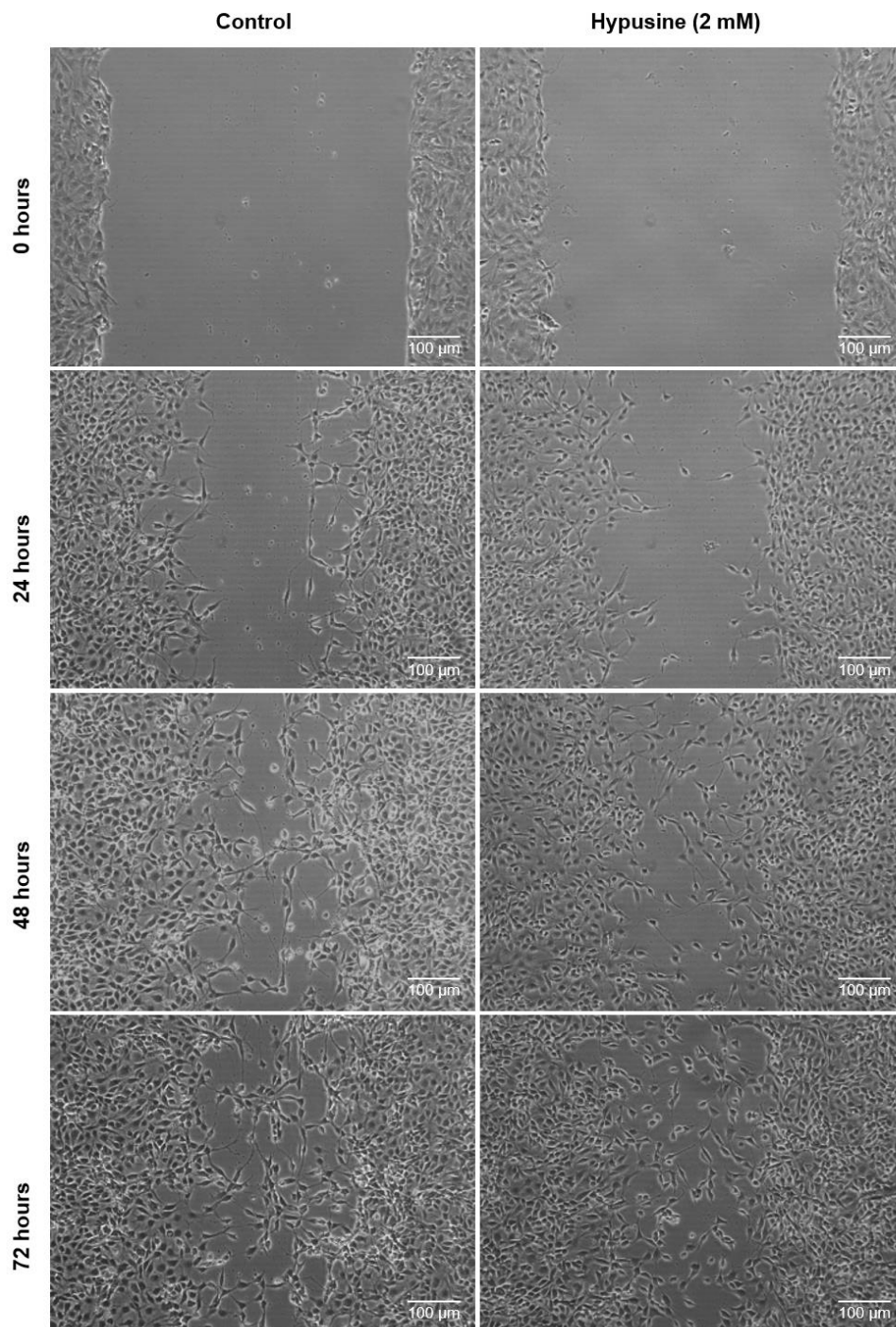
4.3 O processo de migração celular não é afetado pelo tratamento com hipusina em células C6

Devido aos efeitos observados em células C6 tratadas com 2 mM de hipusina, seguimos para os próximos experimentos utilizando apenas essa concentração, a fim de caracterizar as ações da hipusina em outros parâmetros celulares. Deste modo, o processo de migração celular foi avaliado utilizando o ensaio de cicatrização de feridas, que consiste na realização de um *scratch*, ou seja, um risco na monocamada de cultura de células, seguido da observação do tempo de fechamento desta “ferida”. A migração celular está envolvida em diversos processos fisiológicos como, por exemplo, na reepitelização e cicatrização de feridas, nas respostas imunes e nas metástases de cânceres. Este ensaio tem sido bastante utilizado para estudar e entender o processo de migração celular, pois acredita-se que os sinais e os mecanismos celulares para tentar fechar uma ferida, sejam semelhantes aos mecanismos subjacentes envolvidos nas metástases. Sendo assim, este ensaio tem sido utilizado principalmente para realização de testes de compostos que possam reduzir a taxa de migração celular, podendo assim atuarem como possíveis agentes quimioterápicos que impeçam a atividade metastática de tumores. Visto que a hipusina foi capaz de reduzir significativamente a proliferação celular em células C6, também testamos se hipusina teria algum efeito sobre este processo.

Para os ensaios, foram plaqueadas $2,5 \times 10^5$ células/poço em placas de 24 poços e, no dia seguinte, quando as células atingiram a confluência total, foram realizados os *scratches* nos poços com o auxílio de uma ponteira (p200). Neste mesmo dia, foram feitos os registros das áreas dos *scratches* no tempo 0 horas e também foi adicionado o tratamento com 2 mM de hipusina diluída em meio de cultura sem soro fetal bovino. O meio de cultura sem soro fetal bovino foi utilizado para que não ocorresse o fechamento dos *scratches* por meio da proliferação celular. Em seguida, as áreas dos *scratches* foram acompanhadas e registradas através de fotografias utilizando um microscópio óptico nos tempos de 24, 48 e 72 horas após o tratamento. Como resultado, observamos que o tratamento com 2 mM de hipusina não alterou as áreas de fechamento dos *scratches* quando comparada às áreas das células com o tratamento controle. Deste modo, sob estas condições de tratamento, a hipusina não favoreceu e nem retardou o processo de

migração celular para o fechamento das áreas dos *scratches* nestas células (Figura 10).

Figura 10 - Os ensaios de cicatrização de feridas mostram que o tratamento com hipusina em células C6 não é capaz de afetar o processo de migração celular. As células foram tratadas com água (controle) e 2 mM de hipusina utilizando meio de cultura sem soro fetal bovino. As áreas de fechamento dos *scratches* foram acompanhadas e registradas nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas utilizando um microscópio óptico com uma câmera acoplada. As imagens são representativas de três experimentos independentes.



Fonte: Elaborada pela autora.

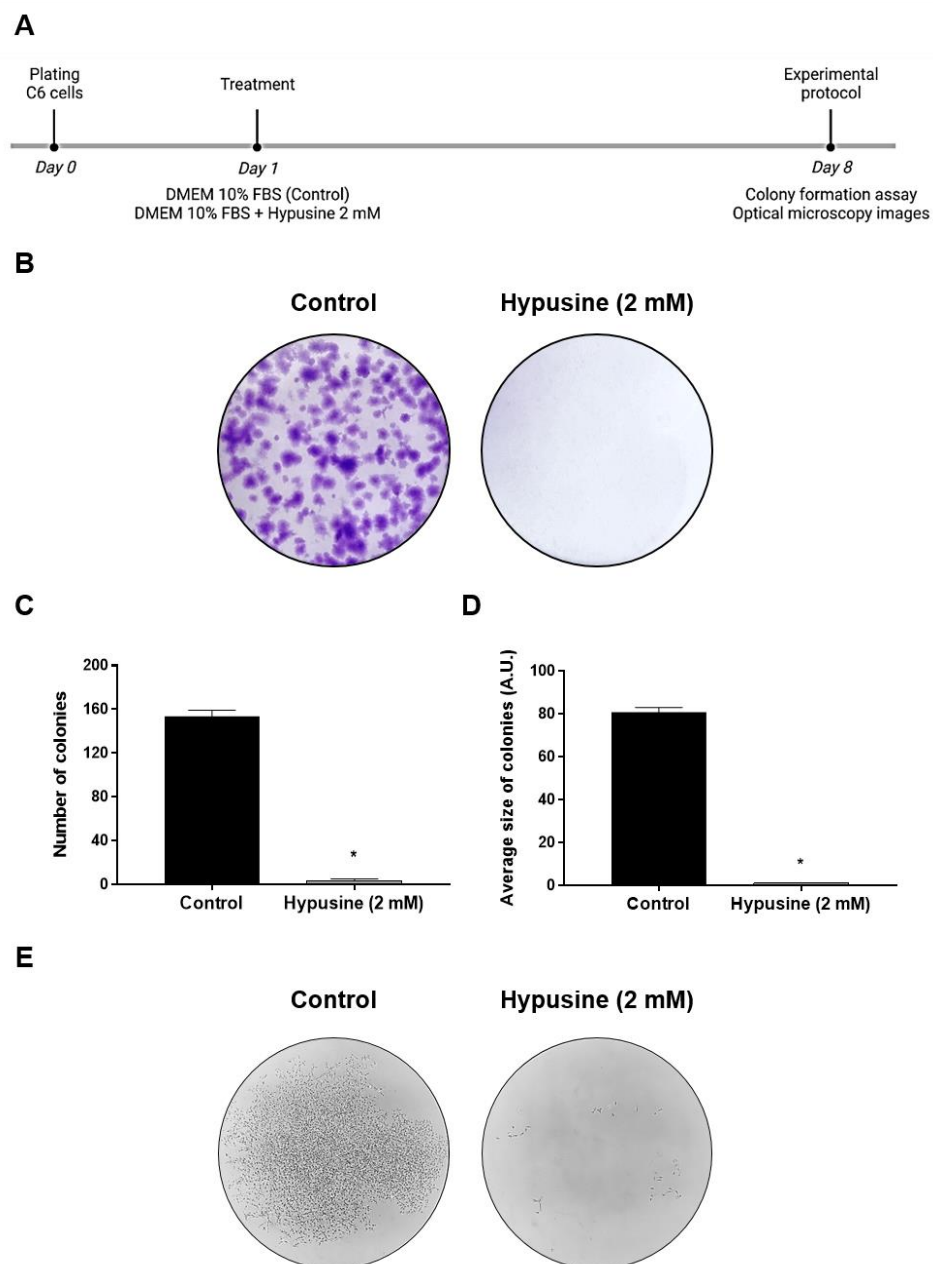
4.4 A hipusina tem um potente efeito na redução do potencial clonogênico em células C6

A capacidade de as células proliferarem em ensaios de formação de colônias é utilizada para verificar se um tratamento pode reduzir a capacidade clonogênica de células tumorais. Para estes ensaios, foram plaqueadas 500 células/poço em placas de 6 poços e, no dia seguinte, foi realizado o tratamento com água (controle) e 2 mM de hipusina. Primeiramente, as células foram tratadas com 2 mM de hipusina ou com o tratamento controle por 7 dias (Figura 11 - A). Como resultado, observamos a supressão total da capacidade de formação de colônias das células C6 tratadas com hipusina (Figura 11 - B, C e D). Olhando para essas células através de um microscópio óptico é possível observar células isoladas ou pequenas colônias que não puderam ser coradas utilizando este método (Figura 11 - E). Isso indica que as células plaqueadas no início não morreram durante o tratamento, mas sim que a hipusina impactou significativamente no crescimento dessas colônias.

Em seguida, testamos a capacidade dessas células em restaurar a formação de colônias após a remoção do tratamento. Os meios de cultura contendo os tratamentos foram substituídos após 3 dias por um novo meio de cultura regular e sem hipusina (Figura 12 - A). Como resultado, pudemos observar que a formação de colônias foi reestabelecida após a remoção da hipusina, o que indica novamente que o tratamento com 2 mM de hipusina não causa a morte dessas células (Figura 12 - B). No entanto, o número final de colônias e o tamanho das colônias formadas ainda foram significativamente menores nas células tratadas com hipusina quando comparadas às células com o tratamento controle (Figura 12 - C, D e E).

Por fim, para demonstrarmos um efeito intermediário, as células C6 também foram tratadas com 1 mM de hipusina por 3 e 7 dias. Com isso, foi observado reduções significativas tanto no número total de colônias quanto no tamanho médio das colônias formadas nas células tratadas com hipusina quando comparadas às células do tratamento controle (Figura 13 - A, B e C). Em geral, todos estes resultados revelam que o tratamento com hipusina prejudica significativamente a capacidade clonogênica das células C6.

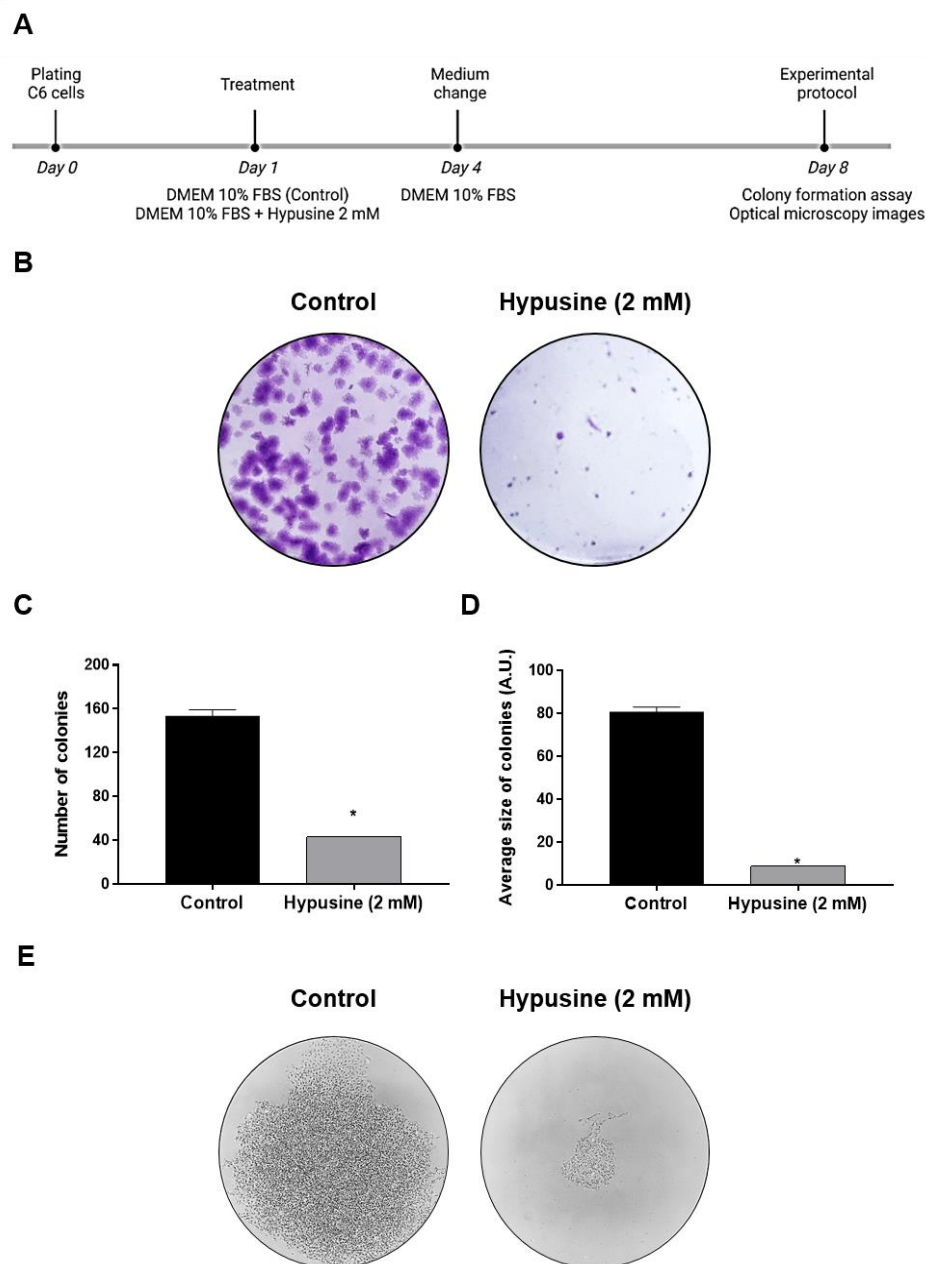
Figura 11 - Células de glioma de rato C6 perderam completamente a capacidade clonogênica após o tratamento com 2 mM de hipusina. (A) Desenho experimental. Células C6 foram plaqueadas em baixa densidade (5×10^2 células/poço) em placas de 6 poços. Em seguida, foram tratadas com água no mesmo volume de hipusina (controle) e 2 mM de hipusina por 7 dias e o protocolo experimental foi realizado ao final dos tratamentos. (B) Ensaio de formação de colônias realizado após o tratamento com hipusina. Uma solução de 0,5% de cristal violeta em 25% de metanol foi utilizada para a coloração das colônias. (C) O gráfico mostra o número de colônias formadas após os tratamentos. (D) O gráfico mostra o tamanho médio das colônias formadas após os tratamentos. O número e o tamanho das colônias formadas foram mensurados utilizando o software ImageJ. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) de três experimentos independentes. *indica diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). (E) Imagens de microscopia óptica representando o tamanho médio das colônias ao final dos tratamentos controle e com 2 mM de hipusina.



Fonte: Elaborada pela autora.

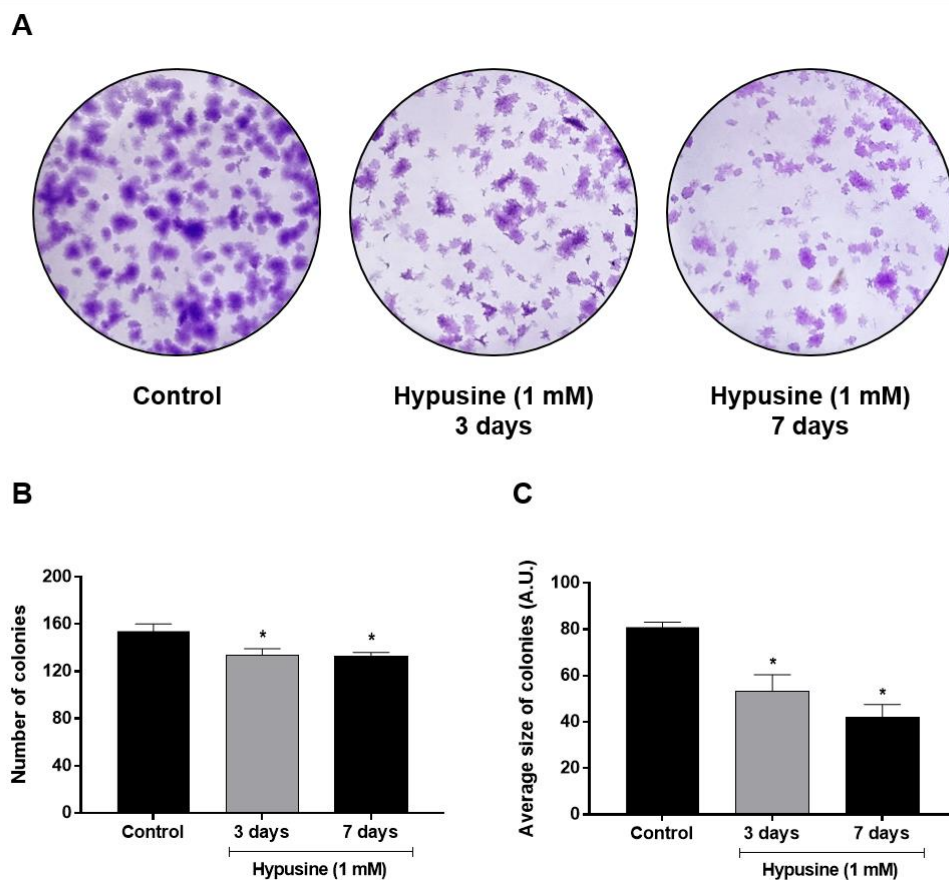
Figura 12 - A remoção do tratamento após 72 horas reestabelece a formação de colônias, mas a capacidade clonogênica nas células tratadas com hipusina ainda é significativamente menor.

(A) Desenho experimental. Células C6 foram plaqueadas em baixa densidade (5×10^2 células/poço) em placas de 6 poços. Em seguida, foram tratadas com água no mesmo volume de hipusina (controle) e 2 mM de hipusina por 3 dias, o meio de cultura foi substituído por um meio de cultura sem hipusina e o protocolo experimental foi realizado no 7º dia após o início do tratamento. (B) Ensaio de formação de colônias realizado após o tratamento com hipusina. Uma solução de 0,5% de cristal violeta em 25% de metanol foi utilizada para a coloração das colônias. (C) O gráfico mostra o número de colônias formadas após os tratamentos. (D) O gráfico mostra o tamanho médio das colônias formadas após os tratamentos. O número e o tamanho das colônias formadas foram mensurados utilizando o software ImageJ. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) de três experimentos independentes. *indica diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). (E) Imagens de microscopia óptica representando o tamanho médio das colônias ao final dos tratamentos controle e com 2 mM de hipusina.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 13 - O tratamento com uma dose intermediária de hipusina (1 mM) reduz significativamente o número e o tamanho médio das colônias formadas. (A) Ensaios de formação de colônias realizados após o tratamento com hipusina. Células C6 foram plaqueadas em baixa densidade (5×10^2 células/poço) em placas de 6 poços. Em seguida, foram tratadas com água no mesmo volume de hipusina (controle) e 1 mM de hipusina por 3 e 7 dias e o protocolo experimental foi realizado no 7º dia após o início do tratamento. Uma solução de 0,5% de cristal violeta em 25% de metanol foi utilizada para a coloração das colônias. (B) O gráfico mostra o número de colônias formadas após os tratamentos. (C) O gráfico mostra o tamanho médio das colônias formadas após os tratamentos. O número e o tamanho das colônias formadas foram mensurados utilizando o software ImageJ. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) de três experimentos independentes. *indica diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).



Fonte: Elaborada pela autora.

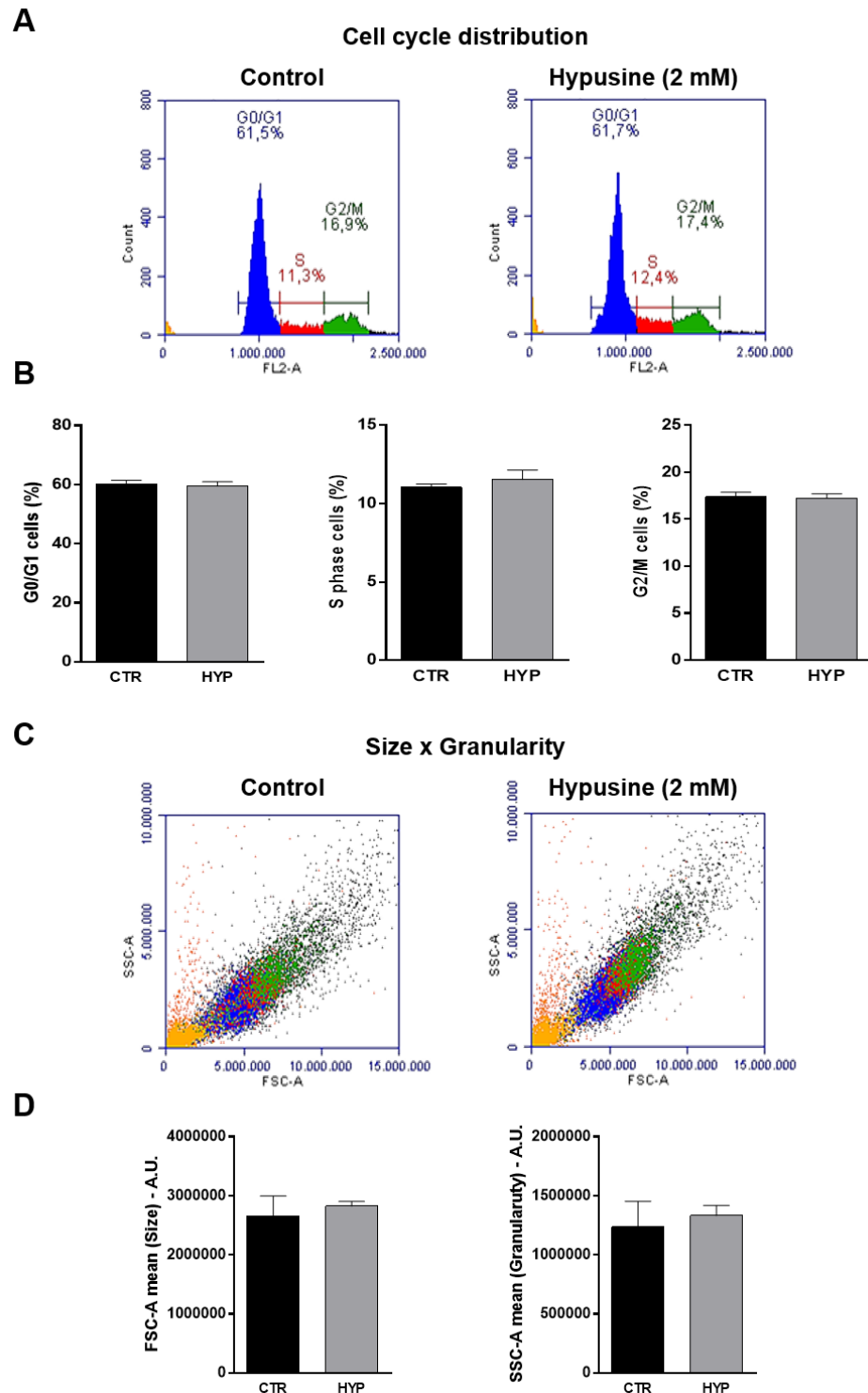
4.5 O tratamento com hipusina em células C6 não altera o ciclo celular, não leva as células a apoptose, mas aumenta o conteúdo da proteína antiapoptótica Mcl-1

A fim de verificar se a hipusina apresentava algum efeito sobre o ciclo celular e a apoptose, estes parâmetros foram avaliados por citometria de fluxo após marcação com iodeto de propídeo e pela avaliação do conteúdo proteico de algumas proteínas reguladoras da via de apoptose.

Para a citometria de fluxo, foram plaqueadas $1,75 \times 10^4$ células/poço em placas de 24 poços, as células foram tratadas com 2 mM de hipusina por 72 horas e, em seguida, foi realizado o protocolo para marcação com iodeto de propídeo. O iodeto de propídeo é um intercalante de DNA, deste modo, é possível determinar a porcentagem de células em cada fase do ciclo celular no momento em que elas foram coletadas e fixadas através da fluorescência emitida após sua excitação. O conteúdo de DNA difere de acordo com cada fase do ciclo celular, ou seja, quanto maior a fluorescência emitida por uma célula que está sendo analisada no citômetro de fluxo, maior o conteúdo de DNA desta célula. Como resultado, foi possível observar que o perfil do ciclo celular das células tratadas com 2 mM de hipusina por 72 horas foi muito semelhante ao perfil de ciclo celular das células com o tratamento controle, não apresentando nenhuma diferença significativa ou acúmulo de células em nenhuma fase do ciclo celular (Figura 14 - A e B). O perfil do ciclo celular também foi avaliado em outros tempos de tratamento (24 e 48 horas). No entanto, também não observamos diferenças significativas nas células tratadas com hipusina após 24 e 48 horas de tratamento (dados não mostrados).

Além disso, o tamanho e a granulosidade dessas células também foram avaliados após 72 horas de tratamento. Entretanto, não foram observadas alterações significativas nestes parâmetros nas células tratadas com hipusina quando comparadas às células do tratamento controle (Figura 14 - C e D). Mais uma vez, estes dados evidenciam que os efeitos observados na redução da proliferação celular após 72 horas de tratamento com hipusina, podem ser em decorrência de alterações que ocorreram logo no início do tratamento. Deste modo, após algum tempo, as células são capazes de reestabelecer a proliferação, porém, mesmo assim, ainda apresentam um número de células significativamente reduzido ao final do tratamento.

Figura 14 - O tratamento com 2 mM de hipusina por 72 horas não causa alterações significativas na distribuição do ciclo celular e nem no tamanho/granulosidade das células. Após os tratamentos, as células C6 foram marcadas com iodeto de propídeo e analisadas por citometria de fluxo. (A) Histogramas representativos mostrando as distribuições do ciclo celular. (B) Gráficos mostrando a porcentagem de células em cada fase do ciclo celular. (C) Gráficos de diagrama de pontos representativos mostrando o tamanho (FSC-A) versus a granulosidade (SSC-A). (D) Gráficos mostrando a média do tamanho (FSC-A) e a média da granulosidade (SSC-A). Os dados apresentados representam a média de três experimentos independentes realizados em triplicata.

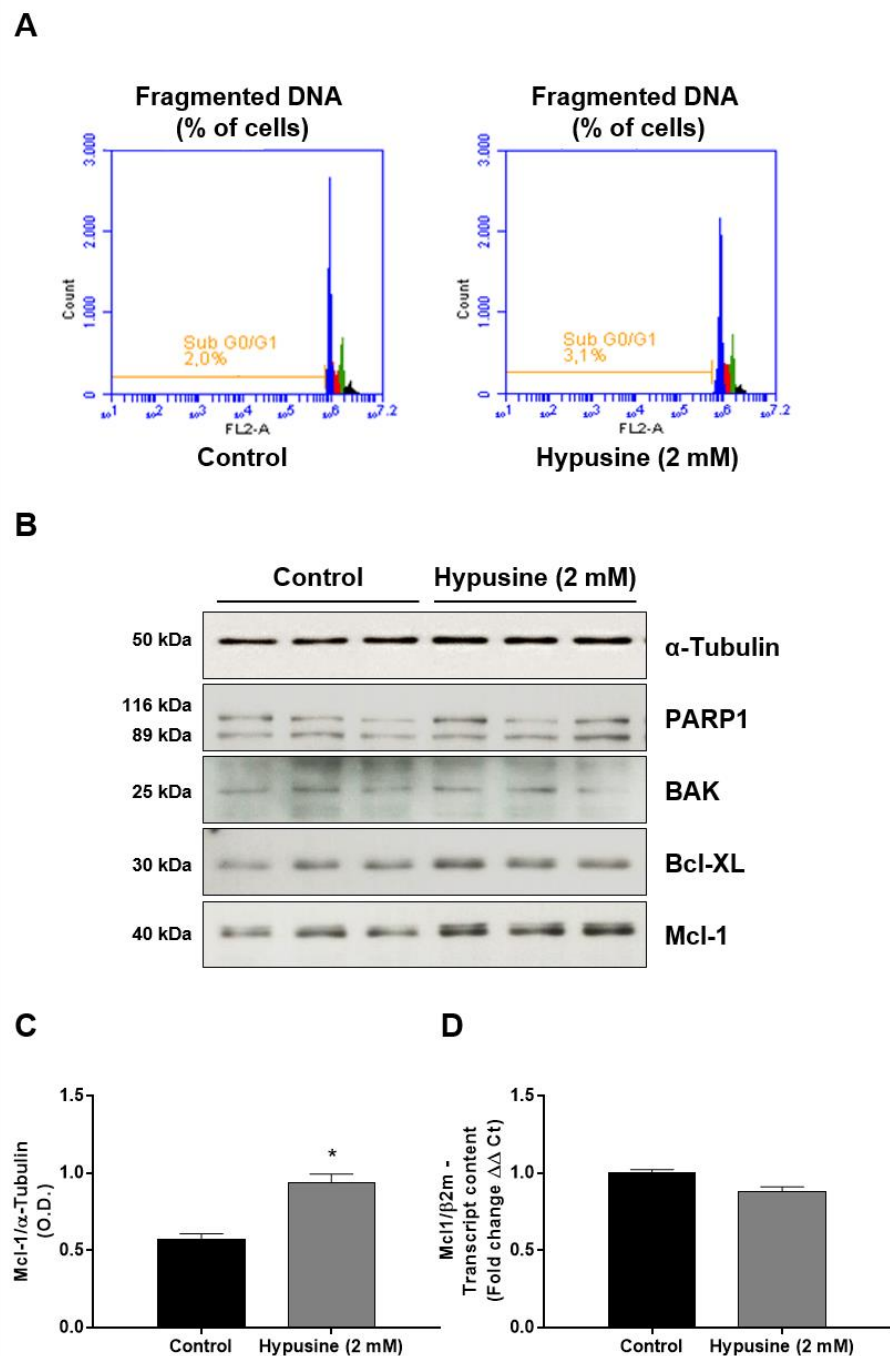


Fonte: Elaborada pela autora.

Ainda com os resultados obtidos pela citometria de fluxo, também foi avaliada a porcentagem de células com fragmentação do DNA, o que pode ser um indicativo de morte celular. Como resultado, não foi observado um aumento significativo da porcentagem de células com o DNA fragmentado nas células tratadas com 2 mM de hipusina por 72 horas quando comparadas às células do tratamento controle (Figura 15 - A).

Para verificar se o tratamento com hipusina realmente não induzia a morte celular em células C6, o conteúdo de proteínas reguladoras da via de apoptose foi avaliado. Para isso, foram plaqueadas 7×10^4 células/poço em placas de 6 poços e, após o tratamento com 2 mM de hipusina por 72 horas, as células foram coletadas e o extrato proteico foi obtido. Em seguida, 30 µg de proteína total foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida, transferidas para uma membrana de nitrocelulose, as quais foram tratadas com anticorpos específicos para a detecção e determinação do conteúdo proteico das proteínas de interesse. Como resultado, não foi observado alterações no conteúdo proteico da proteína pró-apoptótica BAK e nem na clivagem de PARP1, proteína envolvida na identificação de danos no DNA e direcionamento e/ou atuação direta no reparo (Figura 15 - B). Em relação às proteínas antiapoptóticas, não foi observado alterações no conteúdo da proteína Bcl-XL (Figura 15 - B), mas foi observado um aumento significativo no conteúdo da proteína Mcl-1 nas células tratadas com 2 mM de hipusina por 72 horas (Figura 15 - B e C). O conteúdo do transcrito *Mcl-1* também foi avaliado por RT - qPCR em tempo real, entretanto, não foram observadas alterações significativas em seu conteúdo (Figura 15 - D). Em resumo, esses resultados mostram que mesmo o tratamento com hipusina na maior concentração e tempo de tratamento testados não leva as células à apoptose, mas aumenta o conteúdo da proteína anti-apoptótica Mcl-1.

Figura 15 - O tratamento com hipusina não induz as células à apoptose e aumenta o conteúdo da proteína antiapoptótica Mcl-1 em células C6. As células foram tratadas com água no mesmo volume de hipusina (controle) e 2 mM de hipusina por 72 horas. (A) Histogramas representativos da análise por citometria de fluxo para avaliar a porcentagem de células com o DNA fragmentado (hipodiploide - Sub G0/G1) após marcação com iodeto de propídeo. (B) Ensaios de *immunoblotting* utilizando 30 µg de extratos de proteínas totais obtidos dos tratamentos. Os anticorpos utilizados foram: α -tubulina (50 kDa), PARP1 completo (116 kDa) e PARP1 clivado (89 kDa), BAK (25 kDa), Bcl-XL (30 kDa) e Mcl-1 (40 kDa). (C) Densitometria óptica de Mcl-1/ α -Tubulina utilizando o software ImageJ v1.53. (D) Conteúdo relativo do transcrito *Mcl-1* após normalização com β 2M (controle endógeno) utilizando o método comparativo $\Delta\Delta$ Ct. Os resultados foram analisados pelo teste *t-Student* e apresentados como média $\pm$ EPM. * indica diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Todos os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes.



Fonte: Elaborada pela autora.

4.6 O conteúdo do transcrito *Eif5a* e o perfil global de síntese proteica são significativamente reduzidos pelo tratamento com hipusina em células C6

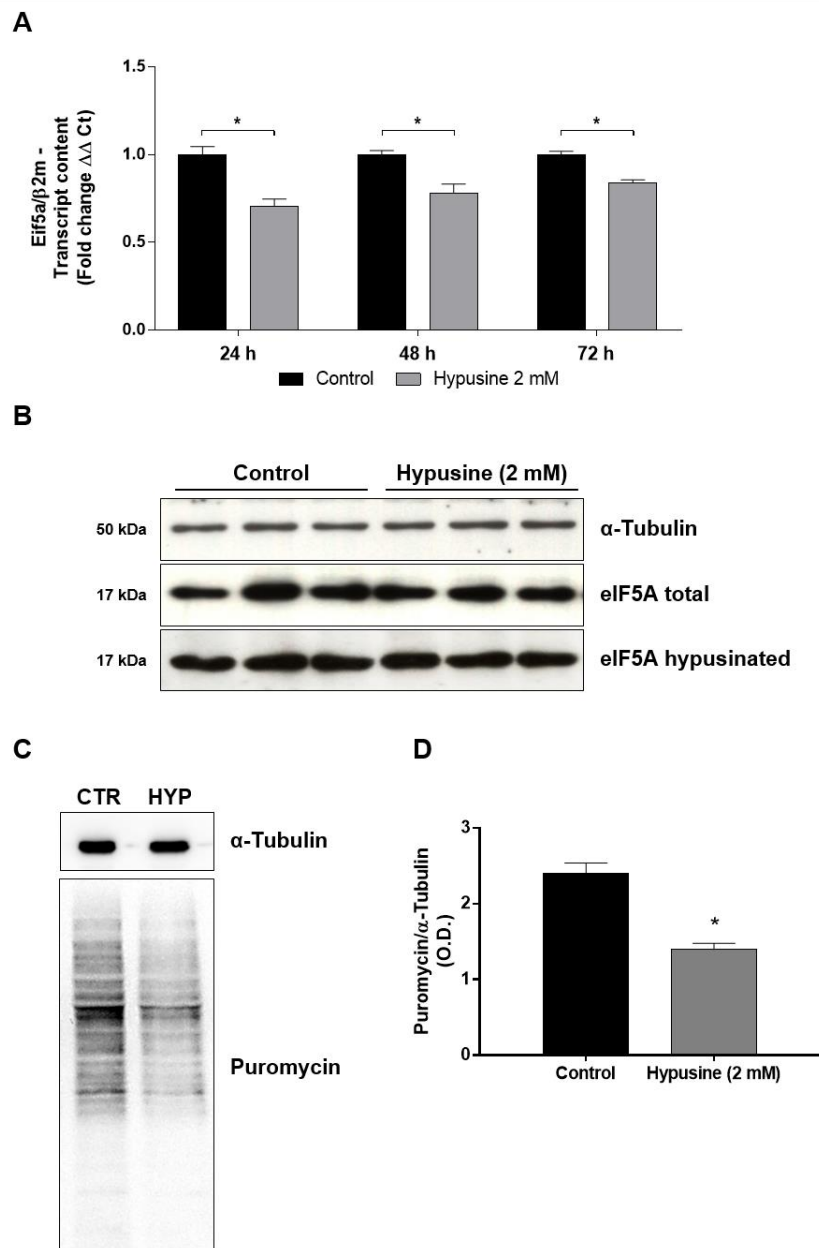
Tendo em vista que o tratamento com hipusina foi capaz de reduzir drasticamente a proliferação e a capacidade clonogênica em células C6 sem causar alterações significativas no perfil de ciclo celular, começamos a investigar mecanismos e processos celulares que poderiam estar envolvidos com os efeitos observados. A hipusina, em sua forma livre, origina-se da degradação de eIF5A, uma proteína chave na regulação do processo de tradução, síntese proteica e crescimento celular. Portanto, primeiramente decidimos avaliar se o tratamento com hipusina poderia regular a expressão do gene e do conteúdo proteico de eIF5A. Além disso, decidimos também avaliar o perfil global de síntese proteica e o metabolismo energético dessas células, os quais poderiam estar sendo prejudicados pelo tratamento com hipusina.

Para determinação do conteúdo do transcrito *Eif5a*, $2,5 \times 10^5$ células foram plaqueadas em placas de 60 mm de diâmetro e tratadas com 2 mM de hipusina por 24, 48 e 72 horas. Após os tratamentos, o RNA total foi extraído com TRIzol™, o cDNA foi preparado por transcrição reversa e, em seguida, analisado por PCR quantitativa em tempo real. Como resultado, observa-se que o conteúdo do transcrito *Eif5a* foi significativamente reduzido nas células C6 tratadas com hipusina quando comparadas às células do tratamento controle (Figura 16 - A). As diminuições observadas foram cerca de 30% em 24 horas, 22% em 48 horas e 16% em 72 horas (Figura 16 - A). Apesar da diminuição no conteúdo do transcrito *Eif5a*, não foram observadas diferenças significativas no conteúdo da proteína eIF5A total ou hipusinada após 72 horas de tratamento com 2 mM de hipusina (Figura 16 - B). Para essa avaliação do conteúdo proteico de eIF5A foram utilizados extratos proteicos obtidos após 72 horas de tratamento com hipusina do mesmo modo descrito no resultado anterior e utilizando anticorpos específicos para detecção de eIF5A total e hipusinada.

Para avaliação do perfil global de síntese proteica foi utilizada a técnica de *SUnSET*, com base na incorporação de puromicina em peptídeos recém-sintetizados. Para estes ensaios, foram plaqueadas 7×10^4 células/poço em placas de 6 poços e, após o tratamento com 2 mM de hipusina por 72 horas, as células foram tratadas com 1 μ M de puromicina por 30 minutos, coletadas e o extrato

proteico foi obtido. Em seguida, 30 µg de proteínas totais foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida, transferidas para uma membrana de nitrocelulose, a qual foi incubada com anticorpo anti-puromicina para a observação da formação dos novos peptídeos com puromicina incorporada. Como resultado, foi observado que o tratamento com 2 mM de hipusina por 72 horas diminuiu o perfil global de síntese proteica em aproximadamente 40% nessas células (Figura 16 - C e D).

Figura 16 - O tratamento com hipusina diminui o conteúdo do transcrito *Eif5a* e o perfil global de síntese proteica. (A) As células foram tratadas com água no mesmo volume de hipusina (controle) e 2 mM de hipusina por 24, 48 e 72 horas para avaliar o conteúdo do transcrito *Eif5a* por RT-qPCR. O gráfico mostra o conteúdo relativo do transcrito *Eif5a* após normalização com $\beta 2M$ (controle endógeno) utilizando o método comparativo $\Delta\Delta Ct$. (B) Ensaio de *immunoblotting* utilizando 30 μg de extratos de proteínas totais obtidos após 72 horas de tratamento com hipusina. Os anticorpos utilizados foram: α -tubulina (50 kDa), eIF5A total (17 kDa) e eIF5A hipusina (17 kDa). (C) Ensaio de *immunoblotting* utilizando 30 μg de extratos de proteínas totais previamente tratados com hipusina e 1 μM de puromicina. O anticorpo anti-puromicina foi utilizado para a detecção dos peptídeos recém-sintetizados com puromicina incorporada e o α -tubulina (50 kDa) como controle endógeno de carregamento. (D) Densitometria óptica de Puromicina/ α -Tubulina utilizando o software ImageJ v1.53. Os resultados foram analisados pelo teste *t-Student* e apresentados como média $\pm$ EPM. * indica diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Todos os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes.



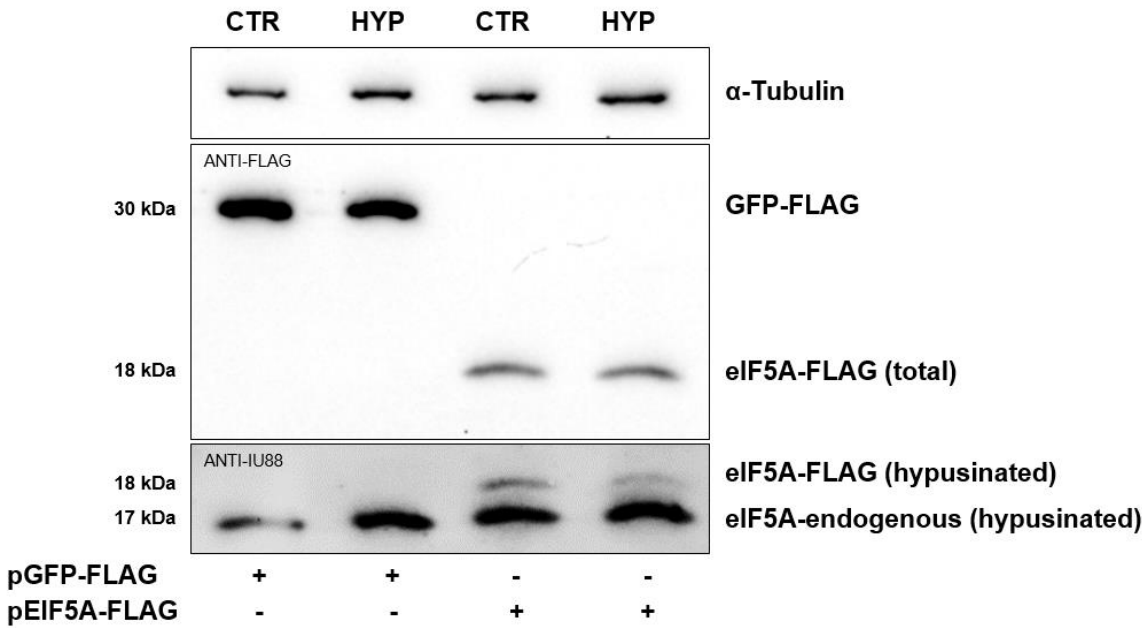
Fonte: Elaborada pela autora.

4.7 O tratamento com hipusina talvez seja capaz de regular a síntese e hipusinação de novas proteínas eIF5A em células C6 por meio de um *feedback* negativo, mas os dados ainda são inconclusivos

Apesar de não termos observado alterações nos conteúdos proteicos de eIF5A total e eIF5A hipusinada em suas formas endógenas, a diminuição no conteúdo do transcrito *Eif5a* em todos os tempos de tratamento indica que a hipusina possa estar atuando no controle da síntese de novas proteínas eIF5A ou na reação de hipusinação desta proteína. Sabemos que a proteína eIF5A é altamente estável e possui uma meia vida longa, deste modo, pequenas alterações nos conteúdos proteicos de eIF5A total e hipusinada recém-sintetizados não seriam facilmente detectadas pela técnica utilizada. Deste modo, resolvemos utilizar a estratégia de transfecção celular utilizando polietilenoimina (PEI) para produzirmos a proteína eIF5A de forma exógena e assim avaliarmos os efeitos do tratamento com hipusina na síntese e hipusinação das novas proteínas produzidas durante o tratamento.

Para isso, 5×10^5 células/poço foram plaqueadas em placas de 6 poços para a transfecção de um plasmídeo controle (pGFP-FLAG), que produz a proteína GFP (*green fluorescent protein*) em fusão com o peptídeo sinalizador FLAG e do plasmídeo pEIF5A-FLAG, que produz a proteína eIF5A em fusão com FLAG (PEREIRA; TAMBORLIN; MENEGUELLO; DE PROENCA *et al.*, 2016), para detecção de ambas proteínas utilizando um anticorpo anti-FLAG. O tratamento com 2 mM de hipusina foi realizado durante o período de transfecção com PEI por 4 horas e, também, após troca do meio de cultura da transfecção por mais 20 horas. O conteúdo proteico das proteínas produzidas foi avaliado após 24 horas do início da transfecção. Como resultado, foi observado que apesar de o tratamento com hipusina apresentar uma tendência em reduzir o conteúdo proteico de eIF5A-FLAG hipusinada (Figura 17), produzida de forma exógena, ainda não foi possível chegar a um resultado totalmente conclusivo.

Figura 17 - Avaliação da síntese e hipusinação da proteína eIF5A-FLAG, produzida de forma exógena em células C6 através de transfecção com PEI, após o tratamento com 2 mM de hipusina por 24 horas. As células foram transfectadas com os plasmídeos pGFP-FLAG, que produz a proteína GFP (*green fluorescent protein*) fusionada ao peptídeo sinalizador FLAG ou com o plasmídeo pEIF5A-FLAG, que produz a proteína eIF5A fusionada ao peptídeo FLAG, utilizando o reagente de transfecção polietilenoimina (PEI). Além da transfecção, as células também foram tratadas com o tratamento controle (água) e com 2 mM de hipusina por 24 horas. Para o *immunoblotting* foram utilizados 30 µg de proteínas totais. Os anticorpos utilizados foram: α-tubulina, anti-FLAG e anti-IU88 (eIF5A hipusinado).



Fonte: Elaborada pela autora.

4.8 O tratamento com hipusina interfere no metabolismo energético das células C6, reduzindo a capacidade oxidativa dessas células e favorecendo a via anaeróbica para produção de energia

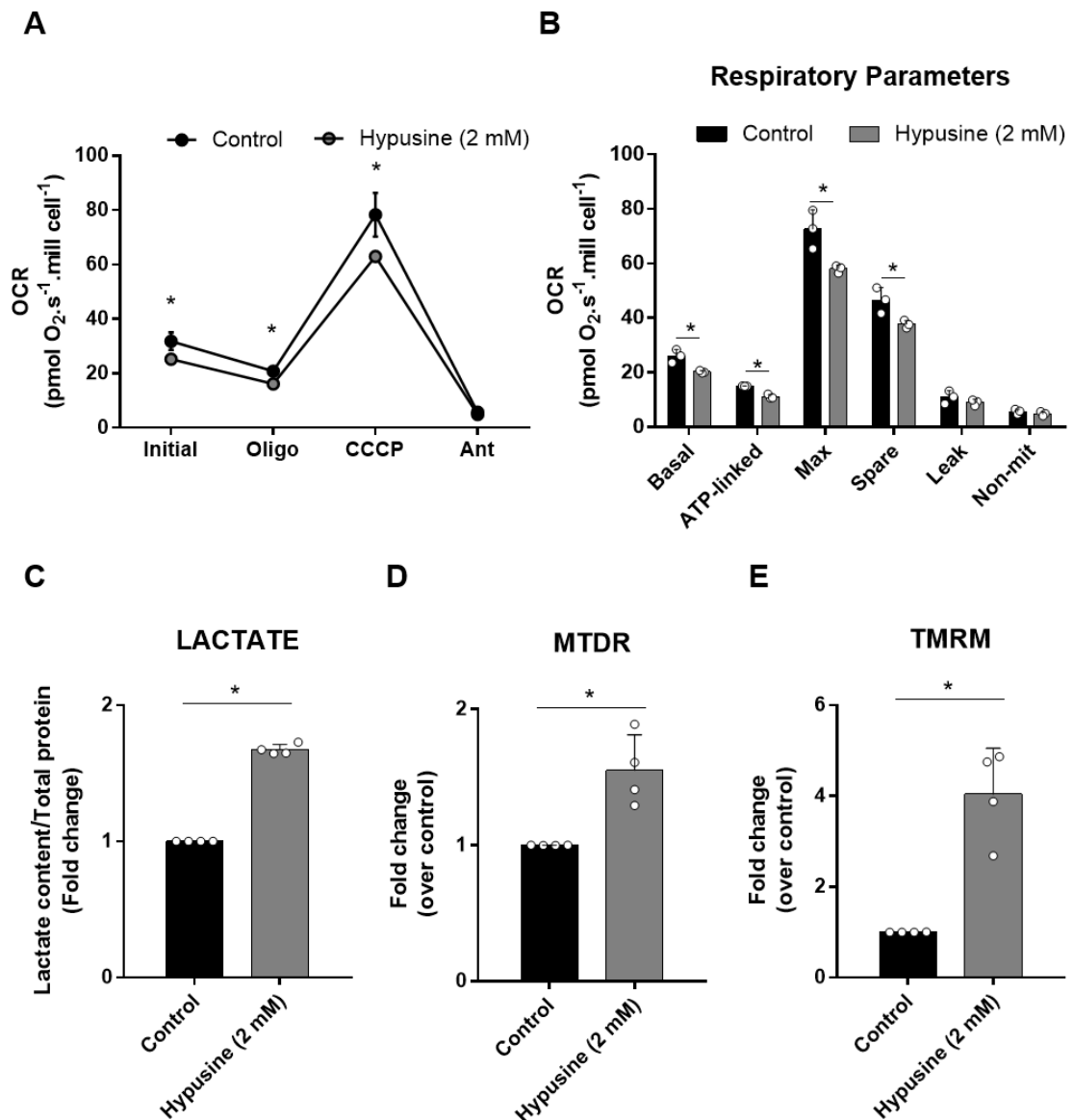
Para avaliarmos o metabolismo energético das células C6 após o tratamento com hipusina, 4×10^5 células foram plaqueadas em placas de 100 mm de diâmetro e tratadas com 2 mM de hipusina por 72 horas. Em seguida, a respiração celular foi avaliada através da mensuração da taxa de consumo de oxigênio (*oxygen consumption rate* - OCR) em tempo real, utilizando o equipamento Oroboros O2k-FluoRespirometer. Para as análises no equipamento, foram utilizados o mesmo número de células tratadas e não tratadas com hipusina (2×10^6 células), as quais foram analisadas sob condições basais e após a adição sequencial de inibidores da cadeia transportadora de elétrons como oligomicina (Oligo), *carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone* (CCCP) e rotenona/antimicina (Ant). Como resultado, foi observada uma diminuição significativa na respiração celular acoplada à fosforilação oxidativa nas células tratadas com hipusina quando comparadas às células do tratamento controle (Figura 18 - A). Essa redução da capacidade oxidativa foi evidente em todos os parâmetros respiratórios avaliados, desde a respiração em estado basal até a respiração máxima (Figura 18 - B).

Uma vez que a diminuição do consumo de oxigênio indica ineficiência no metabolismo oxidativo, também foi avaliado o requerimento da via anaeróbia para produção de energia por meio da dosagem de lactato liberado pelas células, o qual é o produto final do metabolismo energético na ausência de oxigênio. Para isso, 8×10^3 células/poço foram plaqueadas em placas de 48 poços e tratadas com 2 mM de hipusina por 72 horas. Em seguida, as células foram incubadas por 3 horas em PBS e o sobrenadante foi analisado utilizando a enzima lactato desidrogenase e uma curva padrão de lactato. Como resultado, foi observado que o conteúdo de lactato liberado pelas células foi significativamente maior nas células tratadas com hipusina quando comparadas às células do tratamento controle (Figura 18 - C).

Além disso, avaliamos também a densidade e o potencial de membrana mitocondrial, por meio da marcação com as sondas *MitoTracker™ Deep Red FM* (MTDR) e *Tetramethylrhodamine, Methyl Ester, Perchlorate* (TMRM), respectivamente. Para isso, 8×10^3 células/poço foram plaqueadas em placas de 48 poços e tratadas com 2 mM de hipusina por 72 horas. Em seguida, as células foram

marcadas com as respectivas sondas e analisadas por espectrofotometria. Como resultado, observa-se que apesar da taxa de consumo de oxigênio ter diminuído no tratamento com hipusina, a densidade mitocondrial (MTDR) e o potencial de membrana (TMRM) aumentaram significativamente nestas células (Figura 18 - D e E). Dessa forma, esse aumento no conteúdo mitocondrial não indica uma melhora na eficiência energética da via oxidativa, como mostram os dados da respiração celular. Isso pode ocorrer devido a uma disfunção mitocondrial induzida pelo tratamento com hipusina, que talvez possa levar a um aumento no número de mitocôndrias, a fim de compensar a ineficiência do metabolismo oxidativo.

Figura 18 - A hipusina é capaz de modular o requerimento das vias metabólicas para a produção de energia nas células C6, diminuindo a taxa de consumo de oxigênio e aumentando a produção de lactato. As células foram tratadas com água no mesmo volume de hipusina (controle) e 2 mM de hipusina por 72 horas. (A) Taxa de consumo de oxigênio (OCR) mensurada utilizando o equipamento Oroboros Oxygraph-2K. A OCR foi avaliada após a injeção de 1 μ M de oligomicina (inibidor da ATP sintase), 2 μ M de CCCP (desacoplador mitocondrial) e 1 μ M de rotenona (inibidor do complexo I)/1 μ M de antimicina A (inibidor do complexo III). (B) Parâmetros respiratórios calculados após a determinação da OCR. Os parâmetros determinados foram: respiração basal, respiração acoplada ao ATP e respiração máxima, capacidade de reserva respiratória (*spare*), respiração com vazamento de prótons (*leak*) e respiração não mitocondrial (*non-mit*). (C) Conteúdo de lactato liberado após incubação por 3 horas em meio PBS contendo 25 mM de glicose. (D) Densidade mitocondrial após marcação com a sonda *MitoTracker™ Deep Red FM* (MTDR). (E) Potencial de membrana mitocondrial após marcação com *Tetramethylrhodamine, Methyl Ester, Perchlorate* (TMRM). Todos os valores de fluorescência foram normalizados pela quantificação de proteínas. Os resultados foram analisados pelo teste *t-Student* e apresentados como média $\pm$ EPM. * indica diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Todos os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes.



Fonte: Elaborada pela autora.

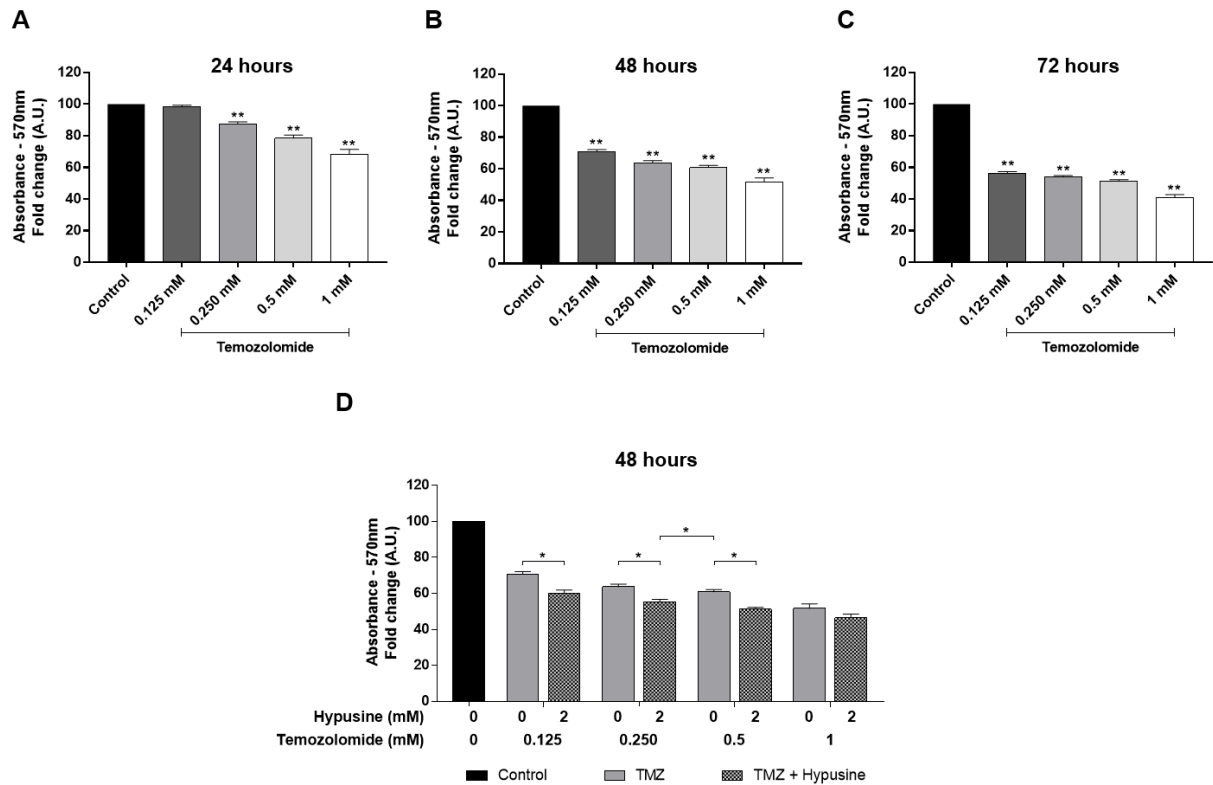
4.9 A hipusina apresenta ação sinérgica quando combinada com a temozolomida, o quimioterápico de escolha para o tratamento de gliomas

Devido aos efeitos antiproliferativos observados nos tratamentos com hipusina em células C6, decidimos testar a combinação de hipusina com a temozolomida (TMZ), a droga quimioterápica de escolha utilizada para o tratamento de glioblastomas humanos, utilizando os ensaios de MTT para avaliação da proliferação celular.

Para os ensaios, foram plaqueadas 3×10^3 células/poço em placas de 96 poços. No dia seguinte, as células foram tratadas primeiramente somente com TMZ nas seguintes concentrações: 0,125 mM, 0,250 mM, 0,5 mM e 1 mM por 24, 48 e 72 horas. Como resultado, após 24 horas de tratamento, foi observada uma diminuição significativa na conversão de MTT em formazan nas concentrações de 0,250 mM, 0,5 mM e 1 mM (Figura 19 - A). Após 48 e 72 horas de tratamento, todas as concentrações de TMZ testadas apresentaram reduções estatisticamente significativas na conversão do MTT em formazan (Figura 19 - B e C).

Após a realização da curva dose-resposta do TMZ, escolhemos o tempo de tratamento intermediário (48 horas) para avaliar todas as concentrações de TMZ em combinação com 2 mM de hipusina. Como resultado, observa-se que a adição de hipusina ao tratamento intensificou a ação da temozolomida em todas as concentrações testadas (Figura 19 - D). Por exemplo, nas células tratadas com 0,5 mM de TMZ houve uma redução de aproximadamente 40% na conversão do MTT em formazan, enquanto que nas células tratadas com a mesma concentração de TMZ concomitantemente com 2 mM de hipusina houve uma redução de aproximadamente 50%, ou seja, a mesma redução observada quando se utilizou a concentração de 1 mM de TMZ isoladamente (Figura 19 - D). Deste modo, conclui-se que a combinação desses dois compostos permite reduzir pela metade a dose de temozolomida utilizada, mantendo o mesmo efeito observado com o dobro da concentração de TMZ sozinho (Figura 19 - D).

Figura 19 - A hipusina atua sinergicamente com a temozolomida na redução da proliferação celular em células C6. Os ensaios de MTT foram realizados em células C6 tratadas com 1% de DMSO (solvente utilizado como controle), 0,125 mM, 0,250 mM, 0,5 mM e 1 mM de temozolomida por (A) 24 horas, (B) 48 horas e (C) 72 horas. (D) Os ensaios de MTT foram realizados após 48 horas de tratamento combinando as diferentes concentrações de temozolomida com 2 mM de hipusina. Os resultados foram analisados por *One-Way ANOVA*, seguido do pós-teste de Bonferroni, e apresentados como média $\pm$ EPM de três experimentos independentes. * indica diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). ** indica diferenças estatisticamente significativas $p < 0,01$.



Fonte: Elaborada pela autora.

5 DISCUSSÃO

Todos os estudos publicados e encontrados utilizando o termo de busca “hipusina”, até a data de finalização da escrita deste trabalho (março de 2023), descrevem a importância deste aminoácido como um componente essencial para a atividade da proteína eIF5A. Nos últimos cinco anos, cerca de uma centena de artigos científicos foram publicados na base de dados *PubMed*, todos abordando sobre a importância da hipusina para a atividade de eIF5A em diversos processos moleculares, celulares, fisiológicos e patológicos. O eIF5A e sua hipusinação foram relacionados a diversas condições patológicas humanas, incluindo inflamação (DE ALMEIDA; TOLEDO; ROSSI; ROSSETTO DDE *et al.*, 2014), diabetes (IMAM; MIRMIRA; JAUME, 2014; KULKARNI; ANDERSON; MIRMIRA, 2022), câncer (NAKANISHI; CLEVELAND, 2016), infecções retrovirais (HANAUKE-ABEL; SAXENA; PALUMBO; HANAUKE *et al.*, 2013; OLSEN; FILONE; ROZELLE; MIRE *et al.*, 2016) e, recentemente, em distúrbios do neurodesenvolvimento (FAUNDES; JENNINGS, 2021; ZIEGLER; STEINDL; HANNER; KUMAR KAR *et al.*, 2022). A hipusina também tem sido utilizada como um biomarcador de eIF5A hipusinada para diagnóstico de algumas doenças (BASKAL; KAISER; MELS; KRUGER *et al.*, 2022; KAISER; KHOMUTOV; SIMONIAN; AGOSTINELLI, 2012) e como um alvo terapêutico viável em terapias medicinais avançadas, especialmente em tumores resistentes (KAISER; AGOSTINELLI, 2022). Entretanto, até a presente data, não há estudos na literatura que investiguem o potencial de atuação da hipusina como um aminoácido livre, desde que este foi isolado pela primeira vez há cinco décadas atrás (SHIBA; MIZOTE; KANEKO; NAKAJIMA *et al.*, 1971). Desta forma, a presente tese demonstra, pela primeira vez, evidência de atividade biológica para a hipusina livre. Para o desenvolvimento deste estudo, hipusina sintética foi utilizada para o tratamento de uma linhagem de células derivadas de glioma de rato, denominada células C6, e posterior avaliação de eventuais efeitos *in vitro*.

Essa linhagem celular foi escolhida devido à ocorrência natural do aminoácido hipusina em sua forma livre em cérebros de mamíferos (NAKAJIMA; MATSUBAYASHI; KAKIMOTO; SANO, 1971; SHIBA; MIZOTE; KANEKO; NAKAJIMA *et al.*, 1971). Além disso, as células C6 são uma linhagem de células padrão ouro, amplamente utilizada em pesquisas na área de neurociências, e as

quais apresentam algumas características que proporcionam uma boa simulação de glioblastoma multiforme (GIAKOUMETTIS; KRITIS; FOROGLOU, 2018).

Iniciamos o nosso estudo testando diferentes concentrações de hipusina e tempos de tratamento por meio de ensaios de MTT, que permitem a avaliação de parâmetros como citotoxicidade, proliferação celular e atividade metabólica. Com isso, foi possível observar uma redução significativa na conversão de MTT em formazan apenas no tratamento com 2 mM de hipusina por 48 e 72 horas. Utilizando essas mesmas condições de tratamento, também foi observada uma diminuição substancial no número de células, sem que houvesse alterações morfológicas significativas que indicassem a perda da integridade celular. Entretanto, observou-se um alongamento das células tratadas com hipusina em comparação com as células do tratamento controle. Dessa forma, a diminuição no número de células levou a uma menor conversão de MTT em formazan, o que mostra que o tratamento com hipusina é capaz de reduzir a proliferação celular em células de glioma de rato C6. Além disso, o ensaio de MTT está diretamente relacionado à atividade mitocondrial, portanto não exclui a possibilidade de interferência da hipusina no metabolismo energético, hipótese que foi avaliada mais adiante no trabalho.

O potencial de células isoladas formarem colônias é utilizada para avaliar a capacidade clonogênica de células tumorais (FRANKEN; RODERMOND; STAP; HAVEMAN *et al.*, 2006). Estudos recentes têm utilizado o ensaio de formação de colônias para avaliar o potencial de drogas anticancerígenas contra células de glioblastoma (CHERNOV; FILATENKOVA; GLUSHAKOV; BUNTOVSKAYA *et al.*, 2022; SOWIŃSKA; SZELIGA, 2022). No nosso estudo, foi observado que a hipusina tem um potente efeito na redução da capacidade clonogênica em células C6. No tratamento com 2 mM de hipusina por sete dias, as células perderam completamente a capacidade de formar colônias. Embora isso também possa sugerir que ocorreu morte celular, quando visualizamos essas células sob microscopia óptica, observamos a presença de pequenas colônias ou células isoladas nos poços tratados com hipusina. O método de coloração com cristal violeta permite uma boa visualização de colônias com pelo menos 50 ou mais células (CROWLEY; CHRISTENSEN; WATERHOUSE, 2016), sendo assim, não seria possível visualizar células isoladas ou pequenas colônias após a coloração por este método. Também foi testada a capacidade dessas células em restaurar a formação de colônias após a remoção do tratamento com hipusina. Para isso, o meio de

cultura contendo hipusina foi substituído por um meio de cultura regular após três dias de tratamento, e observou-se que a formação de colônias foi restabelecida. No entanto, o número e o tamanho médio das colônias formadas ainda eram significativamente menores do que as do tratamento controle. Sendo assim, alterações bruscas ocorridas no início do tratamento provavelmente são responsáveis pelos efeitos observados ao final do protocolo experimental.

Por outro lado, conseguimos confirmar que o tratamento com hipusina não leva às células a apoptose. Após o tratamento com a maior concentração de hipusina e tempo de tratamento utilizados, não foi observado um aumento significativo na porcentagem de células com o DNA fragmentado e nem no conteúdo de proteínas pró-apoptóticas nestas células. Contudo, ainda se observou um aumento no conteúdo da proteína anti-apoptótica Mcl-1. Este aumento ocorreu sem que houvesse alterações no conteúdo do transcrito do gene *Mcl-1*, o que sugere que a hipusina pode causar alterações em mecanismos regulatórios traducionais ou pós-traducionais que controlam a expressão dessa proteína. O aumento no conteúdo proteico de Mcl-1 é relatado na literatura como um mecanismo pelo qual células tumorais se utilizam para sobreviver e conferir resistência a drogas quimioterápicas (PLACZEK; WEI; KITADA; ZHAI *et al.*, 2010; QUINN; DASH; AZAB; SARKAR *et al.*, 2011; WHITAKER; PLACZEK, 2020). Assim, nossos resultados mostram que, embora o tratamento com hipusina possa reduzir significativamente a proliferação de uma linhagem celular extremamente agressiva, o tratamento não resulta em morte celular.

Como a hipusina em sua forma livre se origina da degradação de eIF5A, avaliamos se o tratamento com hipusina poderia regular sua expressão gênica, conteúdo proteico e hipusinação, considerando a possibilidade da existência de vias auto regulatórias. A expressão do gene eIF5A e sua forma hipusinada podem ser controladas por diversos compostos, incluindo hormônios como a insulina (DE PROENCA; PEREIRA; MENEGUELLO; TAMBORLIN *et al.*, 2019) e triiodotironina (T3) (GOULART-SILVA; TEIXEIRA; LUCHESSI; DOS SANTOS *et al.*, 2012), e compostos que inibem diretamente o processo de hipusinação como o GC7 (N1-guanil-1,7-diamonheptano), ciclopirox, deferiprona e mimosina (BARBA-ALIAGA; ALEPUZ, 2022; PARK; KAR; BANKA; ZIEGLER *et al.*, 2022). Em nosso trabalho, foi observado que o conteúdo do transcrito *Eif5a* foi significativamente reduzido em células de glioma de rato C6 após o tratamento com 2 mM de hipusina por 24, 48 e

72 horas. Isso sugere que a hipusina exógena poderia sinalizar para as células que há um excesso de eIF5A e, conseqüentemente, que esta proteína estaria sendo muito degradada, devido ao seu *turnover* natural, o que é percebido devido à alta concentração de hipusina nas células. Portanto, a alta disponibilidade de hipusina nas células, simulada pelo tratamento, poderia reduzir a expressão do gene *Eif5a* por meio de um *feedback* negativo. Apesar disso, não foram observadas diferenças significativas no conteúdo da proteína eIF5A total ou hipusinada. Isso pode ter ocorrido, pois sabe-se que o eIF5A é uma proteína extremamente abundante nas células e com meia-vida longa (GERNER; MAMONT; BERNHARDT; SIAT, 1986; LEE; PARK; FOLK; DECK *et al.*, 2011) e, além disso, que a presença de insulina e fatores de crescimento no soro fetal bovino do meio de cultura também dificultam a avaliação de diferenças nos conteúdos proteicos de eIF5A total e hipusinada, como já relatado em outros estudos (DE PROENÇA; PEREIRA; MENEGUELLO; TAMBORLIN *et al.*, 2019). Sendo assim, mesmo com pequenas alterações em seu conteúdo, o ensaio de *immunoblotting* não os detectaria.

Tendo em vista que o conteúdo do transcrito do gene *Eif5a* foi reduzido após o tratamento com hipusina, isso poderia estar afetando o conteúdo de eIF5As recém-sintetizadas. Existe a hipótese de que essas novas proteínas eIF5As poderiam desempenhar um papel de maior relevância nas células, diferente das já existentes. Estudos demonstram que a redução da atividade das novas eIF5As, utilizando moléculas inibidoras de sua hipusinação, leva à supressão do processo de tradução e síntese proteica (DE PROENÇA; PEREIRA; MENEGUELLO; TAMBORLIN *et al.*, 2019; MARTELLA; CATALANOTTO; TALORA; LA TEANA *et al.*, 2020; PARK; WOLFF, 2018), mostrando que as eIF5As recém-sintetizadas são essenciais nesse processo. Dessa forma, no presente estudo, foi avaliado o perfil global de síntese proteica após o tratamento com hipusina pelo método de *SUnSET*, baseado na incorporação de puromicina em peptídeos recém-sintetizados (SCHMIDT; CLAVARINO; CEPPI; PIERRE, 2009). Com isso, foi possível observar que o perfil global de síntese proteica foi significativamente reduzido nas células tratadas com hipusina. Assim, sugerimos que uma redução no conteúdo de eIF5As recém-sintetizadas, possivelmente não detectável por *immunoblotting*, poderia estar afetando o processo de tradução e/ou, até mesmo a alta concentração de hipusina nas células, poderia interferir na reação de hipusinação de eIF5A.

Além das moléculas inibidoras da hipusinação, que inibem a tradução por meio da redução da atividade de eIF5A, há moléculas, como a cicloheximida (CHX), que age diretamente como um potente inibidor da tradução, ação que afeta a proliferação e leva à morte celular (SCHMIDT; CLAVARINO; CEPPI; PIERRE, 2009; SCHNEIDER-POETSCH; JU; EYLER; DANG *et al.*, 2010). O tratamento com baixas concentrações de CHX em células C6 foi capaz de induzir a parada do ciclo celular e prejudicar a proliferação destas células (LIU; YANG; ZHANG; LIU *et al.*, 2010). Em nosso estudo, embora tenhamos observado uma redução no perfil global de síntese proteica após o tratamento com hipusina, não foi possível observar alterações significativas na distribuição do ciclo celular nestas células, que indiquem um bloqueio do ciclo celular. Deste modo, a redução no perfil global de síntese proteica por si só pode ser um dos fatores responsáveis pela redução do crescimento celular observado nessas células, comprometendo de uma forma geral a proliferação sem causar danos na replicação do DNA durante a mitose.

A síntese de proteínas consome a maior parte dos recursos e da energia das células, especialmente em células cancerígenas de crescimento rápido (LINDQVIST; TANDOC; TOPISIROVIC; FURIC, 2018), como é o caso das células C6 utilizadas nesse estudo. Sendo assim, devido à diminuição no perfil global de síntese proteica observada após o tratamento com hipusina, decidimos avaliar alguns parâmetros do metabolismo energético nestas células. Em nosso estudo, foi observado que o tratamento com 2 mM de hipusina por 72 horas diminuiu significativamente a respiração celular acoplada à fosforilação oxidativa em todos os parâmetros avaliados. Além disso, as células tratadas com hipusina aumentaram a produção de lactato, indicando uma intensificação da via anaeróbica para produção de energia. Um estudo recente, que utilizou tratamentos com ácido metilmalônico (MMA), um produto do catabolismo de aminoácidos e ácidos graxos, demonstrou efeitos semelhantes no comprometimento da respiração celular em cultura de células C6 (COSTA; SANTOS; ALBERTO-SILVA; CARRETTIERO *et al.*, 2022). Os autores ainda observaram um aumento na captação de glicose, o qual foi considerado um indicador de aumento da glicólise anaeróbia (COSTA; SANTOS; ALBERTO-SILVA; CARRETTIERO *et al.*, 2022). Portanto, podemos sugerir que, em ambos os estudos, os tratamentos são capazes de modular o metabolismo energético dessas células, alternando as vias para produção de energia, a fim de manter o balanço energético e garantir a sobrevivência celular.

Vários processos podem induzir reduções no metabolismo celular, incluindo disfunção mitocondrial e apoptose (AKBAR; ESSA; DARADKEH; ABDELMEGEED *et al.*, 2016). Deste modo, como foi demonstrado pelo nosso estudo que a hipusina não é capaz de induzir a apoptose de maneira significativa, existe a possibilidade de que o tratamento com hipusina possa estar causando um comprometimento da função mitocondrial. Essa hipótese é sustentada pelo fato de termos observado uma redução no consumo de oxigênio associado à síntese de ATP (*ATP-linked*) nas células tratadas com hipusina, o que pode indicar uma menor eficiência mitocondrial (BRAND; NICHOLLS, 2011). Além disso, também foi observada uma redução da atividade metabólica, evidenciada pela diminuição da conversão do MTT pelas enzimas mitocondriais e pela diminuição da taxa de consumo de oxigênio, além do favorecimento da glicólise anaeróbica, demonstrada pelo aumento da produção de lactato. Todos esses dados em conjunto fortalecem a hipótese de um comprometimento da função mitocondrial após o tratamento com hipusina. Apesar disso, foi observado um aumento significativo na densidade mitocondrial (MTDR) e no potencial de membrana (TMRM) nas células tratadas com hipusina, o que sugere que a disfunção mitocondrial induzida pelo tratamento com hipusina resulta em um aumento da densidade mitocondrial (biogênese) para compensar a ineficiência oxidativa observada nestas células. Dessa forma, o aumento no potencial de membrana mitocondrial observado estaria associado ao aumento do número de mitocôndrias e não a uma maior capacidade oxidativa das células.

Por fim, os efeitos antiproliferativos observados após o tratamento com hipusina em células C6 nos levaram a testar seus efeitos em combinação com uma droga quimioterápica de escolha para o tratamento de gliomas. A temozolomida é o medicamento quimioterápico mais utilizado para o tratamento do glioblastoma multiforme (GBM), o tumor cerebral primário mais comum em humanos e com prognóstico ruim da doença (HERBENER; BURSTER, 2020). Os mecanismos de resistência à temozolomida limitam sua aplicação e, desta forma, muitos esforços têm sido implicados nas buscas para redução de sua resistência (ORTIZ; PERAZZOLI; CABEZA; JIMÉNEZ-LUNA *et al.*, 2021). Em nosso estudo, primeiramente testamos diferentes concentrações de temozolomida pelo ensaio MTT. Como resultado, foram observadas reduções significativas na proliferação celular em todas as concentrações e tempos de tratamento testados, conforme também já descrito anteriormente por outros estudos (J; VANISREE, 2020; LI;

LIANG; WANG; MAO *et al.*, 2017; ZHANG; NI; WANG; FAN *et al.*, 2018). Em seguida, avaliamos se a hipusina seria capaz de sensibilizar as células C6 ao tratamento com temozolomida. Assim, foi observado que a combinação de diferentes concentrações de temozolomida com 2 mM de hipusina foi capaz de reduzir ainda mais a conversão de MTT em formazan, comparada à utilização da mesma dose de temozolomida isoladamente. Além disso, utilizando metade de uma dose de temozolomida concomitantemente com hipusina, observou-se uma redução na conversão do MTT nos mesmos níveis observados utilizando a dose inteira de temozolomida isolado. Vários outros estudos descrevem a ação sinérgica de outros compostos como, por exemplo, naringenina, formononetina e *Buparlisib (BKM120)* em combinação com temozolomida em células C6 (J; VANISREE, 2020; LI; LIANG; WANG; MAO *et al.*, 2017; ZHANG; NI; WANG; FAN *et al.*, 2018), mas nenhum outro estudo demonstra a combinação de hipusina com temozolomida e também com nenhuma outra molécula. Desta forma, nossos dados seguem na mesma direção de outros estudos na busca pelo desenvolvimento de novas estratégias para reduzir a resistência à temozolomida em células tumorais e, também, trazem novas perspectivas em relação à possibilidade de aplicação da hipusina em abordagens terapêuticas.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, mostramos pela primeira vez, por meio de ensaios *in vitro* conduzidos em células derivadas de glioma de rato (C6), que a hipusina livre apresenta atividade biológica. O tratamento com hipusina é capaz de reduzir significativamente a proliferação celular e a capacidade clonogênica dessa linhagem celular tumoral extremamente agressiva, sem levar essas células à apoptose. Apesar da redução na proliferação, o tratamento com hipusina não causa alterações significativas no ciclo celular e não afeta o processo de migração dessas células. A expressão do gene *Eif5a* é significativamente reduzida após o tratamento com hipusina, possivelmente por meio de um *feedback* negativo, podendo assim reduzir a atividade das proteínas eIF5A recém-sintetizadas, o que poderia impactar no processo de tradução e síntese proteica. De fato, também se observa uma diminuição significativa no perfil global de síntese proteica nas células tratadas com hipusina. Além disso, vimos que o tratamento com hipusina também é capaz de modular o metabolismo energético, reduzindo a capacidade oxidativa dessas células e favorecendo a via anaeróbica para produção de energia. O comprometimento da via oxidativa pode se dar em decorrência de uma disfuncionalidade mitocondrial induzida pelo tratamento com hipusina.

Concluimos também que a hipusina em combinação com a temozolomida, quimioterápico de escolha para o tratamento de glioblastoma humano, apresenta um efeito antiproliferativo sinérgico nessas células. Além disso, foi visto que é possível a utilização de metade da concentração de temozolomida, quando utilizada em combinação com a hipusina, para se obter o mesmo efeito da dose inteira de temozolomida sozinho.

Por fim, este é o primeiro trabalho na literatura que demonstra evidência de atividade biológica para a hipusina como um aminoácido livre e não como um componente essencial para a atividade da proteína eIF5A e, também, a sugerir um potencial uso deste aminoácido em aplicações terapêuticas. Os mecanismos moleculares que resultam nos efeitos observados ainda não estão completamente elucidados. Portanto, descobrir os alvos moleculares da hipusina são os próximos passos para caracterizar completamente sua atividade biológica como aminoácido livre.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKBAR, M.; ESSA, M. M.; DARADKEH, G.; ABDELMEGEED, M. A. *et al.* Mitochondrial dysfunction and cell death in neurodegenerative diseases through nitroxidative stress. **Brain Res**, 1637, p. 34-55, Apr 15 2016.
- ANDRUS, L.; SZABO, P.; GRADY, R. W.; HANAUSKE, A. R. *et al.* Antiretroviral effects of deoxyhypusyl hydroxylase inhibitors: a hypusine-dependent host cell mechanism for replication of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). **Biochem Pharmacol**, 55, n. 11, p. 1807-1818, Jun 1 1998.
- BARBA-ALIAGA, M.; ALEPUZ, P. Role of eIF5A in Mitochondrial Function. **Int J Mol Sci**, 23, n. 3, Jan 24 2022.
- BASKAL, S.; KAISER, A.; MELS, C.; KRUGER, R. *et al.* Specific and sensitive GC-MS analysis of hypusine, Nε-(4-amino-2-hydroxybutyl)lysine, a biomarker of hypusinated eukaryotic initiation factor eIF5A, and its application to the bi-ethnic ASOS study. **Amino Acids**, 54, n. 7, p. 1083-1099, 2022/07/01 2022.
- BAUER, K. Carnosine and homocarnosine, the forgotten, enigmatic peptides of the brain. **Neurochem Res**, 30, n. 10, p. 1339-1345, Oct 2005.
- BAUER, K.; SCHULZ, M. Biosynthesis of carnosine and related peptides by skeletal muscle cells in primary culture. **Eur J Biochem**, 219, n. 1-2, p. 43-47, Jan 1994.
- BENNE, R.; HERSHEY, J. W. The mechanism of action of protein synthesis initiation factors from rabbit reticulocytes. **J Biol Chem**, 253, n. 9, p. 3078-3087, May 10 1978.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, 72, p. 248-254, May 7 1976.
- BRAND, Martin D.; NICHOLLS, David G. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. **Biochemical Journal**, 435, n. 2, p. 297-312, 2011.
- CHEN, K. Y. An 18000-dalton protein metabolically labeled by polyamines in various mammalian cell lines. **Biochim Biophys Acta**, 756, n. 3, p. 395-402, Apr 1983.
- CHERNOV, A. N.; FILATENKOVA, T. A.; GLUSHAKOV, R. I.; BUNTOVSKAYA, A. S. *et al.* Anticancer Effect of Cathelicidin LL-37, Protegrin PG-1, Nerve Growth Factor NGF, and Temozolomide: Impact on the Mitochondrial Metabolism, Clonogenic Potential, and Migration of Human U251 Glioma Cells. 27, n. 15, Aug 5 2022.
- COOPER, H. L.; PARK, M. H.; FOLK, J. E. Posttranslational formation of hypusine in a single major protein occurs generally in growing cells and is associated with activation of lymphocyte growth. **Cell**, 29, n. 3, p. 791-797, Jul 1982.
- COOPER, H. L.; PARK, M. H.; FOLK, J. E.; SAFER, B. *et al.* Identification of the hypusine-containing protein hy⁺ as translation initiation factor eIF-4D. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 80, n. 7, p. 1854-1857, Apr 1983.

COSTA, R. T.; SANTOS, M. B.; ALBERTO-SILVA, C.; CARRETTIERO, D. C. *et al.* Methylmalonic Acid Impairs Cell Respiration and Glutamate Uptake in C6 Rat Glioma Cells: Implications for Methylmalonic Acidemia. **Cellular and Molecular Neurobiology**, 2022/06/08 2022.

CROWLEY, L. C.; CHRISTENSEN, M. E.; WATERHOUSE, N. J. Measuring Survival of Adherent Cells with the Colony-Forming Assay. **Cold Spring Harb Protoc**, 2016, n. 8, Aug 1 2016.

DE ALMEIDA, O. P., Jr.; TOLEDO, T. R.; ROSSI, D.; ROSSETTO DDE, B. *et al.* Hypusine modification of the ribosome-binding protein eIF5A, a target for new anti-inflammatory drugs: understanding the action of the inhibitor GC7 on a murine macrophage cell line. **Curr Pharm Des**, 20, n. 2, p. 284-292, 2014.

DE PROENCA, A. R. G.; PEREIRA, K. D.; MENEGUELLO, L.; TAMBORLIN, L. *et al.* Insulin action on protein synthesis and its association with eIF5A expression and hypusination. 46, n. 1, p. 587-596, Feb 2019.

FAUNDES, V.; JENNINGS, M. D. Impaired eIF5A function causes a Mendelian disorder that is partially rescued in model systems by spermidine. 12, n. 1, p. 833, Feb 5 2021.

FONNUM, F. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. **J Neurochem**, 42, n. 1, p. 1-11, Jan 1984.

FRANKEN, N. A.; RODERMOND, H. M.; STAP, J.; HAVEMAN, J. *et al.* Clonogenic assay of cells in vitro. **Nat Protoc**, 1, n. 5, p. 2315-2319, 2006.

FUJIMURA, K.; CHOI, S.; WYSE, M.; STRNADEL, J. *et al.* Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A (EIF5A) Regulates Pancreatic Cancer Metastasis by Modulating RhoA and Rho-associated Kinase (ROCK) Protein Expression Levels. **J Biol Chem**, 290, n. 50, p. 29907-29919, Dec 11 2015.

GERNER, E. W.; MAMONT, P. S.; BERNHARDT, A.; SIAT, M. Post-translational modification of the protein-synthesis initiation factor eIF-4D by spermidine in rat hepatoma cells. **Biochem J**, 239, n. 2, p. 379-386, Oct 1986.

GIAKOUMETTIS, D.; KRITIS, A.; FOROGLOU, N. C6 cell line: the gold standard in glioma research. **Hippokratia**, 22, n. 3, p. 105-112, Jul-Sep 2018.

GOODMAN, C. A.; HORNBERGER, T. A. Measuring protein synthesis with SUnSET: a valid alternative to traditional techniques? **Exerc Sport Sci Rev**, 41, n. 2, p. 107-115, Apr 2013.

GOODMAN, C. A.; MABREY, D. M.; FREY, J. W.; MIU, M. H. *et al.* Novel insights into the regulation of skeletal muscle protein synthesis as revealed by a new nonradioactive in vivo technique. **Faseb j**, 25, n. 3, p. 1028-1039, Mar 2011.

GOULART-SILVA, F.; TEIXEIRA, S. d. S.; LUCHESSI, A. D.; DOS SANTOS, L. R. B. *et al.* Potential Contribution of Translational Factors to Triiodo-L-Thyronine-Induced

Insulin Synthesis by Pancreatic Beta Cells. **Thyroid**, 22, n. 6, p. 637-642, 2012/06/01 2012.

GRASSO, G. I.; ARENA, G.; BELLIA, F.; RIZZARELLI, E. *et al.* Copper(II)-chelating homocarnosine glycoconjugate as a new multifunctional compound. **J Inorg Biochem**, 131, p. 56-63, Feb 2014.

GUTIERREZ, E.; SHIN, B. S.; WOOLSTENHULME, C. J.; KIM, J. R. *et al.* eIF5A promotes translation of polyproline motifs. **Mol Cell**, 51, n. 1, p. 35-45, Jul 11 2013.

HÁJOS, N.; PÁLHALMI, J.; MANN, E. O.; NÉMETH, B. *et al.* Spike timing of distinct types of GABAergic interneuron during hippocampal gamma oscillations in vitro. **J Neurosci**, 24, n. 41, p. 9127-9137, Oct 2004.

HANAUSKE-ABEL, H. M.; SAXENA, D.; PALUMBO, P. E.; HANAUSKE, A. R. *et al.* Drug-induced reactivation of apoptosis abrogates HIV-1 infection. **PLoS One**, 8, n. 9, p. e74414, 2013.

HERBENER, V. J.; BURSTER, T. Considering the Experimental use of Temozolomide in Glioblastoma Research. 8, n. 6, Jun 4 2020.

HOFMANN, W.; REICHART, B.; EWALD, A.; MULLER, E. *et al.* Cofactor requirements for nuclear export of Rev response element (RRE)- and constitutive transport element (CTE)-containing retroviral RNAs. An unexpected role for actin. **J Cell Biol**, 152, n. 5, p. 895-910, Mar 5 2001.

HOQUE, M.; HANAUSKE-ABEL, H. M.; PALUMBO, P.; SAXENA, D. *et al.* Inhibition of HIV-1 gene expression by Ciclopirox and Deferiprone, drugs that prevent hypusination of eukaryotic initiation factor 5A. **Retrovirology**, 6, p. 90, 2009.

HOQUE, M.; PARK, J. Y.; CHANG, Y. J.; LUCHESSI, A. D. *et al.* Regulation of gene expression by translation factor eIF5A: Hypusine-modified eIF5A enhances nonsense-mediated mRNA decay in human cells. **Translation (Austin)**, 5, n. 2, p. e1366294, 2017.

HUANG, J.; WANG, T.; YU, D.; FANG, X. *et al.* l-Homocarnosine attenuates inflammation in cerebral ischemia-reperfusion injury through inhibition of nod-like receptor protein 3 inflammasome. **Int J Biol Macromol**, 118, n. Pt A, p. 357-364, Oct 15 2018.

IMAM, S.; MIRMIRA, R. G.; JAUME, J. C. Eukaryotic translation initiation factor 5A inhibition alters physiopathology and immune responses in a "humanized" transgenic mouse model of type 1 diabetes. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 306, n. 7, p. E791-798, Apr 2014.

IMAM, S.; PRATHIBHA, R.; DAR, P.; ALMOTAH, K. *et al.* eIF5A inhibition influences T cell dynamics in the pancreatic microenvironment of the humanized mouse model of Type 1 Diabetes. 9, n. 1, p. 1533, Feb 7 2019.

IMAOKA, N.; NAKAJIMA, T. Hypusine, N6-(4-amino-2-hydroxybutyl)-2,6-diaminohexanoic acid, in tissue proteins of mammals. **Biochim Biophys Acta**, 320, n. 1, p. 97-103, Aug 17 1973.

J, J.; VANISREE, A. J. Naringenin Sensitizes Resistant C6 Glioma Cells with a Repressive Impact on the Migrating Ability. **Ann Neurosci**, 27, n. 3-4, p. 114-123, Jul 2020.

JAO, D. L.; CHEN, K. Y. Tandem affinity purification revealed the hypusine-dependent binding of eukaryotic initiation factor 5A to the translating 80S ribosomal complex. **J Cell Biochem**, 97, n. 3, p. 583-598, Feb 15 2006.

JASIULIONIS, M. G.; LUCHESSI, A. D.; MOREIRA, A. G.; SOUZA, P. P. *et al.* Inhibition of eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) hypusination impairs melanoma growth. **Cell Biochem Funct**, 25, n. 1, p. 109-114, Jan-Feb 2007.

KAISER, A.; AGOSTINELLI, E. Hypusinated EIF5A as a feasible drug target for Advanced Medicinal Therapies in the treatment of pathogenic parasites and therapy-resistant tumors. **Amino Acids**, 54, n. 4, p. 501-511, 2022/04/01 2022.

KAISER, A.; KHOMUTOV, A. R.; SIMONIAN, A.; AGOSTINELLI, E. A rapid and robust assay for the determination of the amino acid hypusine as a possible biomarker for a high-throughput screening of antimalarials and for the diagnosis and therapy of different diseases. **Amino Acids**, 42, n. 5, p. 1651-1659, May 2012.

KALYANKAR, G. D.; MEISTER, A. Enzymatic synthesis of carnosine and related beta-alanyl and gamma-aminobutyryl peptides. **J Biol Chem**, 234, p. 3210-3218, Dec 1959.

KANG, H. A.; HERSHEY, J. W. Effect of initiation factor eIF-5A depletion on protein synthesis and proliferation of *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem**, 269, n. 6, p. 3934-3940, Feb 11 1994.

KEMPER, W. M.; BERRY, K. W.; MERRICK, W. C. Purification and properties of rabbit reticulocyte protein synthesis initiation factors M2Balpha and M2Bbeta. **J Biol Chem**, 251, n. 18, p. 5551-5557, Sep 25 1976.

KLIER, H.; CSONGA, R.; JOÃO, H. C.; ECKERSKORN, C. *et al.* Isolation and structural characterization of different isoforms of the hypusine-containing protein eIF-5A from HeLa cells. **Biochemistry**, 34, n. 45, p. 14693-14702, Nov 1995.

KLIER, H.; WOHL, T.; ECKERSKORN, C.; MAGDOLEN, V. *et al.* Determination and mutational analysis of the phosphorylation site in the hypusine-containing protein Hyp2p. **FEBS Lett**, 334, n. 3, p. 360-364, Nov 22 1993.

KULKARNI, A.; ANDERSON, C. M.; MIRMIRA, R. G. Role of Polyamines and Hypusine in β Cells and Diabetes Pathogenesis. 12, n. 4, Apr 12 2022.

KWIATKOWSKI, S.; KIERSZTAN, A.; DROZAK, J. Biosynthesis of Carnosine and Related Dipeptides in Vertebrates. **Curr Protein Pept Sci**, 19, n. 8, p. 771-789, 2018.

LEE, S. B.; PARK, J. H.; FOLK, J. E.; DECK, J. A. *et al.* Inactivation of eukaryotic initiation factor 5A (eIF5A) by specific acetylation of its hypusine residue by spermidine/spermine acetyltransferase 1 (SSAT1). **Biochem J**, 433, n. 1, p. 205-213, Jan 1 2011.

LI, M.; LIANG, R. F.; WANG, X.; MAO, Q. *et al.* BKM120 sensitizes C6 glioma cells to temozolomide via suppression of the PI3K/Akt/NF-kappaB/MGMT signaling pathway. **Oncol Lett**, 14, n. 6, p. 6597-6603, Dec 2017.

LI, T.; BELDA-PALAZÓN, B.; FERRANDO, A.; ALEPUZ, P. Fertility and Polarized Cell Growth Depends on eIF5A for Translation of Polyproline-Rich Formins in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, Jun 2014.

LINDQVIST, L. M.; TANDOC, K.; TOPISIROVIC, I.; FURIC, L. Cross-talk between protein synthesis, energy metabolism and autophagy in cancer. **Curr Opin Genet Dev**, 48, p. 104-111, Feb 2018.

LIPOWSKY, G.; BISCHOFF, F. R.; SCHWARZMAIER, P.; KRAFT, R. *et al.* Exportin 4: a mediator of a novel nuclear export pathway in higher eukaryotes. **EMBO J**, 19, n. 16, p. 4362-4371, Aug 15 2000.

LIU, X.; YANG, J.-M.; ZHANG, S. S.; LIU, X.-Y. *et al.* Induction of cell cycle arrest at G1 and S phases and cAMP-dependent differentiation in C6 glioma by low concentration of cycloheximide. **BMC Cancer**, 10, n. 1, p. 684, 2010/12/15 2010.

LUCHESSI, A. D.; CAMBIAGHI, T. D.; ALVES, A. S.; PARREIRAS-E-SILVA, L. T. *et al.* Insights on eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) in the brain and aging. **Brain Res**, 1228, p. 6-13, Sep 2008.

LUCHESSI, A. D.; CAMBIAGHI, T. D.; HIRABARA, S. M.; LAMBERTUCCI, R. H. *et al.* Involvement of eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) in skeletal muscle stem cell differentiation. **J Cell Physiol**, 218, n. 3, p. 480-489, Mar 2009.

MARTELLA, M.; CATALANOTTO, C.; TALORA, C.; LA TEANA, A. *et al.* Inhibition of Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A (eIF5A) Hypusination Suppress p53 Translation and Alters the Association of eIF5A to the Ribosomes. 21, n. 13, Jun 27 2020.

MATHEWS, M. B.; HERSHEY, J. W. The translation factor eIF5A and human cancer. **Biochim Biophys Acta**, 1849, n. 7, p. 836-844, Jul 2015.

MCGRATH, T.; BASKERVILLE, R.; ROGERO, M.; CASTELL, L. Emerging Evidence for the Widespread Role of Glutamatergic Dysfunction in Neuropsychiatric Diseases. **Nutrients**, 14, n. 5, Feb 22 2022.

MEMIN, E.; HOQUE, M.; JAIN, M. R.; HELLER, D. S. *et al.* Blocking eIF5A modification in cervical cancer cells alters the expression of cancer-related genes and suppresses cell proliferation. **Cancer Res**, 74, n. 2, p. 552-562, Jan 15 2014.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec 16 1983.

MOUNCE, B. C.; OLSEN, M. E.; VIGNUZZI, M. Polyamines and Their Role in Virus Infection. 81, n. 4, Dec 2017.

NAKAJIMA, T.; MATSUBAYASHI, T.; KAKIMOTO, Y.; SANO, I. Distribution of hypusine, N 6 -(4-amino-2-hydroxybutyl)-2,6-diaminohexanoic acid, in mammalian organs. **Biochim Biophys Acta**, 252, n. 1, p. 92-97, Oct 1971.

NAKANISHI, S.; CLEVELAND, J. L. Targeting the polyamine-hypusine circuit for the prevention and treatment of cancer. **Amino Acids**, 48, n. 10, p. 2353-2362, Oct 2016.

NGO, D. H.; VO, T. S. An Updated Review on Pharmaceutical Properties of Gamma-Aminobutyric Acid. **Molecules**, 24, n. 15, Jul 24 2019.

NISHIKI, Y.; FARB, T. B.; FRIEDRICH, J.; BOKVIST, K. *et al.* Characterization of a novel polyclonal anti-hypusine antibody. **Springerplus**, 2, p. 421, 2013.

NOBLE, J. E.; BAILEY, M. J. Quantitation of protein. **Methods Enzymol**, 463, p. 73-95, 2009.

OLSEN, M. E.; CONNOR, J. H. Hypusination of eIF5A as a Target for Antiviral Therapy. **DNA Cell Biol**, 36, n. 3, p. 198-201, Mar 2017.

OLSEN, M. E.; CRESSEY, T. N.; MUHLBERGER, E.; CONNOR, J. H. Differential Mechanisms for the Involvement of Polyamines and Hypusinated eIF5A in Ebola Virus Gene Expression. 92, n. 20, Oct 15 2018.

OLSEN, M. E.; FILONE, C. M.; ROZELLE, D.; MIRE, C. E. *et al.* Polyamines and Hypusination Are Required for Ebolavirus Gene Expression and Replication. **MBio**, 7, n. 4, 2016.

ORTIZ, R.; PERAZZOLI, G.; CABEZA, L.; JIMÉNEZ-LUNA, C. *et al.* Temozolomide: An Updated Overview of Resistance Mechanisms, Nanotechnology Advances and Clinical Applications. **Curr Neuropharmacol**, 19, n. 4, p. 513-537, 2021.

PARK, M. H. The post-translational synthesis of a polyamine-derived amino acid, hypusine, in the eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A). **J Biochem**, 139, n. 2, p. 161-169, Feb 2006.

PARK, M. H.; COOPER, H. L.; FOLK, J. E. Identification of hypusine, an unusual amino acid, in a protein from human lymphocytes and of spermidine as its biosynthetic precursor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 78, n. 5, p. 2869-2873, May 1981.

PARK, M. H.; COOPER, H. L.; FOLK, J. E. The biosynthesis of protein-bound hypusine (N epsilon -(4-amino-2-hydroxybutyl)lysine). Lysine as the amino acid precursor and the intermediate role of deoxyhypusine (N epsilon -(4-aminobutyl)lysine). **J Biol Chem**, 257, n. 12, p. 7217-7222, Jun 1982.

PARK, M. H.; KAR, R. K.; BANKA, S.; ZIEGLER, A. *et al.* Post-translational formation of hypusine in eIF5A: implications in human neurodevelopment. **Amino Acids**, 54, n. 4, p. 485-499, 2022/04/01 2022.

PARK, M. H.; LEE, Y. B.; JOE, Y. A. Hypusine is essential for eukaryotic cell proliferation. **Biol Signals**, 6, n. 3, p. 115-123, May-Jun 1997.

PARK, M. H.; WOLFF, E. C. Hypusine, a polyamine-derived amino acid critical for eukaryotic translation. **J Biol Chem**, 293, n. 48, p. 18710-18718, Nov 30 2018.

PARK, M. H.; WOLFF, E. C.; FOLK, J. E. Hypusine: its post-translational formation in eukaryotic initiation factor 5A and its potential role in cellular regulation. **Biofactors**, 4, n. 2, p. 95-104, May 1993a.

PARK, M. H.; WOLFF, E. C.; FOLK, J. E. Is hypusine essential for eukaryotic cell proliferation? **Trends Biochem Sci**, 18, n. 12, p. 475-479, Dec 1993b.

PARREIRAS-E-SILVA, L. T.; LUCHESSI, A. D.; REIS, R. I.; OLIVER, C. *et al.* Evidences of a role for eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) in mouse embryogenesis and cell differentiation. **J Cell Physiol**, 225, n. 2, p. 500-505, Nov 2010.

PEREIRA, K. D.; TAMBORLIN, L.; MENEGUELLO, L.; DE PROENCA, A. R. *et al.* Alternative Start Codon Connects eIF5A to Mitochondria. **J Cell Physiol**, 231, n. 12, p. 2682-2689, Dec 2016.

PETROFF, O. A. GABA and glutamate in the human brain. **Neuroscientist**, 8, n. 6, p. 562-573, Dec 2002.

PLACZEK, W. J.; WEI, J.; KITADA, S.; ZHAI, D. *et al.* A survey of the anti-apoptotic Bcl-2 subfamily expression in cancer types provides a platform to predict the efficacy of Bcl-2 antagonists in cancer therapy. **Cell Death Dis**, 1, p. e40, May 6 2010.

POUILLE, F.; SCANZIANI, M. Enforcement of temporal fidelity in pyramidal cells by somatic feed-forward inhibition. **Science**, 293, n. 5532, p. 1159-1163, Aug 2001.

QUINN, B. A.; DASH, R.; AZAB, B.; SARKAR, S. *et al.* Targeting Mcl-1 for the therapy of cancer. **Expert Opin Investig Drugs**, 20, n. 10, p. 1397-1411, Oct 2011.

RIGGER, L.; NEUNER, S.; SHIN, B. S.; YUSUPOVA, G. *et al.* **EMBO Rep**.

ROSORIOUS, O.; REICHART, B.; KRATZER, F.; HEGER, P. *et al.* Nuclear pore localization and nucleocytoplasmic transport of eIF-5A: evidence for direct interaction with the export receptor CRM1. **J Cell Sci**, 112 (Pt 14), p. 2369-2380, Jul 1999.

RUHL, M.; HIMMELSPACH, M.; BAHR, G. M.; HAMMERSCHMID, F. *et al.* Eukaryotic initiation factor 5A is a cellular target of the human immunodeficiency virus type 1 Rev activation domain mediating trans-activation. **J Cell Biol**, 123, n. 6 Pt 1, p. 1309-1320, Dec 1993.

SAINI, P.; EYLER, D. E.; GREEN, R.; DEVER, T. E. Hypusine-containing protein eIF5A promotes translation elongation. **Nature**, 459, n. 7243, p. 118-121, May 7 2009.

SANO, A.; KOTANI, K.; KAKIMOTO, Y. Isolation and identification of alpha-(gamma-aminobutyl)-hypusine. **J Neurochem**, 46, n. 4, p. 1046-1049, Apr 1986.

SANO, A.; MIYAKE, M.; KAKIMOTO, Y. A rapid and sensitive method for the determination of hypusine in proteins and its distribution and developmental changes. **Biochim Biophys Acta**, 800, n. 2, p. 135-139, Jul 30 1984.

SASAKI, K.; ABID, M. R.; MIYAZAKI, M. Deoxyhypusine synthase gene is essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Lett**, 384, n. 2, p. 151-154, Apr 1996.

SCHATZ, O.; OFT, M.; DASCHER, C.; SCHEBESTA, M. *et al.* Interaction of the HIV-1 rev cofactor eukaryotic initiation factor 5A with ribosomal protein L5. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 95, n. 4, p. 1607-1612, Feb 17 1998.

SCHMIDT, E.; CLAVARINO, G.; CEPPI, M.; PIERRE, P. SUnSET, a nonradioactive method to monitor protein synthesis. **Nature methods**, 6, p. 275-277, 05/01 2009.

SCHNEIDER-POETSCH, T.; JU, J.; EYLER, D. E.; DANG, Y. *et al.* Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. **Nat Chem Biol**, 6, n. 3, p. 209-217, Mar 2010.

SCHNIER, J.; SCHWELBERGER, H. G.; SMIT-MCBRIDE, Z.; KANG, H. A. *et al.* Translation initiation factor 5A and its hypusine modification are essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Cell Biol**, 11, n. 6, p. 3105-3114, Jun 1991.

SCHOUSBOE, A. Transport and metabolism of glutamate and GABA in neurons are glial cells. **Int Rev Neurobiol**, 22, p. 1-45, 1981.

SCHULLER, A. P.; WU, C. C.; DEVER, T. E.; BUSKIRK, A. R. *et al.* eIF5A Functions Globally in Translation Elongation and Termination. **Mol Cell**, 66, n. 2, p. 194-205.e195, Apr 20 2017.

SCHWELBERGER, H. G.; KANG, H. A.; HERSHEY, J. W. Translation initiation factor eIF-5A expressed from either of two yeast genes or from human cDNA. Functional identity under aerobic and anaerobic conditions. **J Biol Chem**, 268, n. 19, p. 14018-14025, Jul 1993.

SHI, X. P.; YIN, K. C.; AHERN, J.; DAVIS, L. J. *et al.* Effects of N1-guanyl-1,7-diaminoheptane, an inhibitor of deoxyhypusine synthase, on the growth of

tumorigenic cell lines in culture. **Biochim Biophys Acta**, 1310, n. 1, p. 119-126, Jan 1996.

SHI, X. P.; YIN, K. C.; WAXMAN, L. Effects of inhibitors of RNA and protein synthesis on the subcellular distribution of the eukaryotic translation initiation factor, eIF-5A, and the HIV-1 Rev protein. **Biol Signals**, 6, n. 3, p. 143-149, May-Jun 1997.

SHIBA, T.; MIZOTE, H.; KANEKO, T.; NAKAJIMA, T. *et al.* Hypusine, a new amino acid occurring in bovine brain. Isolation and structural determination. **Biochim Biophys Acta**, 244, n. 3, p. 523-531, Sep 21 1971.

SMIT-MCBRIDE, Z.; SCHNIER, J.; KAUFMAN, R. J.; HERSHEY, J. W. Protein synthesis initiation factor eIF-4D. Functional comparison of native and unhypusinated forms of the protein. **J Biol Chem**, 264, n. 31, p. 18527-18530, Nov 5 1989.

SOWIŃSKA, M.; SZELIGA, M. Design, Synthesis and Activity of New N(1)-Alkyl Tryptophan Functionalized Dendrimeric Peptides against Glioblastoma. 12, n. 8, Aug 13 2022.

TAUC, M.; COUGNON, M.; CARCY, R.; MELIS, N. *et al.* The eukaryotic initiation factor 5A (eIF5A1), the molecule, mechanisms and recent insights into the pathophysiological roles. **Cell Biosci**, 11, n. 1, p. 219, Dec 24 2021.

TORRELIO, B. M.; PAZ, M. A.; GALLOP, P. M. Cellular proliferation and hypusine synthesis. **Exp Cell Res**, 154, n. 2, p. 454-463, Oct 1984.

UENO, S.; KOTANI, K.; SANO, A.; KAKIMOTO, Y. Isolation and identification of alpha-(beta-alanyl)hypusine from bovine brain. **Biochim Biophys Acta**, 1073, n. 1, p. 233-235, Jan 1991.

WANG, Z.; JIANG, J.; QIN, T.; XIAO, Y. *et al.* EIF5A regulates proliferation and chemoresistance in pancreatic cancer through the SHH signalling pathway. 23, n. 4, p. 2678-2688, Apr 2019.

WHITAKER, R. H.; PLACZEK, W. J. MCL1 binding to the reverse BH3 motif of P18INK4C couples cell survival to cell proliferation. **Cell Death Dis**, 11, n. 2, p. 156, Feb 28 2020.

WINNICK, R. E.; WINNICK, T. Carnosine:anserine synthetase of muscle. I. Preparation and properties of soluble enzyme from chick muscle. **Biochim Biophys Acta**, 31, n. 1, p. 47-55, Jan 1959.

WOODY, N. C.; PUPENE, M. B. Excretion of hypusine by children and by patients with familial hyperlysinemia. **Pediatr Res**, 7, n. 12, p. 994-995, Dec 1973.

ZANELLI, C. F.; MARAGNO, A. L.; GREGIO, A. P.; KOMILI, S. *et al.* eIF5A binds to translational machinery components and affects translation in yeast. **Biochem Biophys Res Commun**, 348, n. 4, p. 1358-1366, Oct 6 2006.

ZHANG, X.; NI, Q.; WANG, Y.; FAN, H. *et al.* Synergistic Anticancer Effects of Formononetin and Temozolomide on Glioma C6 Cells. **Biol Pharm Bull**, 41, n. 8, p. 1194-1202, Aug 1 2018.

ZIEGLER, A.; STEINDL, K.; HANNER, A. S.; KUMAR KAR, R. *et al.* Bi-allelic variants in DOHH, catalyzing the last step of hypusine biosynthesis, are associated with a neurodevelopmental disorder. **Am J Hum Genet**, 109, n. 8, p. 1549-1558, Aug 4 2022.

ZUK, D.; JACOBSON, A. A single amino acid substitution in yeast eIF-5A results in mRNA stabilization. **EMBO J**, 17, n. 10, p. 2914-2925, May 15 1998.

ANEXO I - LISTA DE PRODUÇÕES BIBLIOGRÁFICAS

Artigos científicos publicados:

BARBOSA, K. A.; RODRIGUES, I. C. P.; **TAMBORLIN, L.**; LUCHESSI, A. D.; LOPES, E.S.N.; GABRIEL, L.P. Rotary jet-spun curcumin-loaded poly L-lactic acid membranes for wound-healing applications. *Journal of Materials Research and Technology*, Apr 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2022.03.136>

TAIPINA, M. O.; DE MELLO, M. G.; **TAMBORLIN, L.**; PEREIRA, K. D.; LUCHESSI, A.D.; CREMASCO, A.; CARAM, R. A. A novel Ag doping Ti alloys route: Formation and antibacterial effect of the TiO₂ nanotubes. *Materials Chemistry and Physics*, 261, p. 124192, Mar 2021. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2020.124192>

PEREIRA, K.D.; **TAMBORLIN, L.**; LIMA, T.I.; CONSONNI, S.R.; SILVEIRA, L.R.; LUCHESSI, A.D. Alternative human eIF5A protein isoform plays a critical role in mitochondria. *J Cell Biochem*, 122, n. 5, p. 549-561, May 2021. <https://doi.org/10.1002/jcb.29884>

ESTECA, M.V.; SEVERINO, M.B.; SILVESTRE, J.G.; SANTOS, G.P.; **TAMBORLIN, L.**; LUCHESSI, A.D.; MORISCOT, A.S.; GUSTAFSSON, A.B.; BAPTISTA, I.L. Loss of Parkin results in altered muscle stem cell differentiation during regeneration. *Int J Mol Sci*, 21, n. 21, p. 8007, Oct 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21218007>

TAMBORLIN, L.; SUMERE, B.R.; SOUZA, M.C.; PESTANA, N.F.; AGUIAR, A. C.; EBERLIN, M.N.; SIMABUCO, F.M.; ROSTAGNO, M.A.; LUCHESSI, A.D. Characterization of pomegranate peel extracts obtained using different solvents and their effects on cell cycle and apoptosis in leukemia cells. *Food Sci Nutr*, 8, n. 10, p. 5483-5496, Oct 2020. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1831>

RODRIGUES, I.C.P.; **TAMBORLIN, L.**; RODRIGUES, A.A.; JARDINI, A.L.; LUCHESSI, A.D.; FILHO, R.M.; LOPES, E.S.N.; GABRIEL, L.P. Polyurethane fibrous membranes tailored by rotary jet spinning for tissue engineering applications. *Journal of Applied Polymer Science*, 137, n. 11, p. 48455, Mar 2020. <https://doi.org/10.1002/app.48455>

MENEGUELLO, L.; BARBOSA, N. M.; PEREIRA, K. D.; PROENÇA, A. R. G.; **TAMBORLIN, L.**; SIMABUCO, F. M.; IWAI, L. K.; ZANELLI, C. F.; VALENTINI, S. R.; LUCHESSI, A. D. The polyproline-motif of S6K2: eIF5A translational dependence and importance for protein-protein interactions. *J Cell Biochem*, 120, n. 4, p. 6015-6025, Apr 2019. <https://doi.org/10.1002/jcb.27888>

PROENCA, A. R. G.; PEREIRA, K. D.; MENEGUELLO, L.; **TAMBORLIN, L.**; LUCHESSI, A. D. Insulin action on protein synthesis and its association with eIF5A expression and hypusination. *Mol Biol Rep*, 46, n. 1, p. 587-596, Feb 2019. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4512-1>

Artigos científicos submetidos:

TAMBORLIN, L.; PEREIRA, K.D.; GUIMARÃES, D.S.P.S.F.; SILVEIRA, L.R.; LUCHESSI, A.D. The first evidence of biological activity for free Hypusine, an enigmatic amino acid discovered in the '70s. *Amino Acids*, Sep 2022.

SEVERINO, M.B.; ESTECA, M.V.; DIVINO, I.A.; SILVESTRE, J.G.; **TAMBORLIN, L.**; BRAGA R.R.; ROPELLE E.R.; SIMABUCO F.M.; LUCHESSI, A.D.; GUSTAFSSON, A.B.; MORISCOT, A.S.; BAPTISTA, I.L. Parkin overexpression enhances c2c12 myoblast differentiation throughout myogenetic program stimulation. *FEBS Letters*, Nov 2022. FEBSL-22-0928.

ANEXO II - OUTRAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

Apresentação de trabalhos em congresso:

GOMES, G. H.; SANTOS, G. P.; ESTECA, M. V.; **TAMBORLIN, L.**; LUCHESSI, A. D.; BAPTISTA, I. L. Parkin plasmid electroporation in skeletal muscle tissue. Em: XXXIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE. Campos do Jordão, SP, Brasil. 2019.

SEVERINO, M. B.; ESTECA, M. V.; **TAMBORLIN, L.**; LUCHESSI, A. D.; BAPTISTA, I. L. Parkin is key factor for myogenesis and differentiation process in C2C12 cells. XXXIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE. Campos do Jordão, SP, Brasil. 2019.

GOMES, G. H.; SANTOS, G. P.; ESTECA, M. V.; **TAMBORLIN, L.**; LUCHESSI, A. D.; BAPTISTA, I. L. Padronização do protocolo de eletroporação in vivo no músculo esquelético de camundongos. Em: XIV Congresso Aberto aos Estudantes de Biologia – XIV CAEB. Campinas, SP, Brasil. 2019.

SEVERINO, M. B.; ESTECA, M. V.; **TAMBORLIN, L.**; LUCHESSI, A. D.; BAPTISTA, I. L. Effects of CPX on transfection efficiency and over differentiation in C2C12. Em: XXVI Congresso de Iniciação Científica da Unicamp. Campinas, SP, Brasil, 2018.

SEVERINO, M. B.; ESTECA, M. V.; **TAMBORLIN, L.**; LUCHESSI, A. D.; BAPTISTA, I. L. Effects of CPX on transfection efficiency and over differentiation in C2C12. Em: XXXIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE. Campos do Jordão, SP, Brasil. 2018.

SOUZA, M. C.; **TAMBORLIN, L.**; SANTOS, M. P.; SUMERE, B. R.; SILVA, L. C.; FERNANDES, D. M.; LUCHESSI, A. D.; ROSTAGNO, M. A. Isolation of flavonoids from black tea (*Camellia sinensis*) by the on-line coupling of pressurized liquid extraction and solid phase extraction and its application in cancer cells. Em: 2º Workshop de Compostos Bioativos & Qualidade de Alimentos. Santa Maria, RS, Brasil. 2018.

Participação em cursos, eventos, projetos de extensão, bancas examinadoras, etc.:

Atuação no Projeto de Extensão: “BIOTECaço: destinação sustentável para livros” realizado pelo Laboratório de Biotecnologia da Faculdade de Ciências Aplicadas - UNICAMP com o apoio da Câmara Municipal de Limeira no período de 20/07/2019 a 11/10/2019 com carga horária de 32 horas.

Curso: “Legislação e procedimentos para utilização de animais de laboratório” oferecido pelo Instituto de Biologia da Unicamp e pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Laboratório - CEUA/UNICAMP. Campinas, 27 de maio de 2019.

Treinamento teórico/prático de Bioanalyzer e TapeStation. (Carga horária: 14h). Realizado no Laboratório de Genômica no Centro de Excelência Agilent Technologies nos dias 21 e 22 de agosto de 2019.

Treinamento teórico/prático de preparo de bibliotecas para NGS: RNAseq. (Carga horária: 16h). Promovido pela Agilent Technologies Brasil e realizado no IBTec da UNESP de Botucatu nos dias 23 e 24 de julho de 2019.

Workshop Desafio Unicamp 2019 - Treinamento de Canvas. Realizado no Expo D. Pedro em Campinas - SP no dia 18 de maio de 2019.

Participação no 6º Workshop Teórico-Prático do INFABiC Explorando a Microscopia Confocal e a Óptica não Linear na Análise de Materiais Biológicos. Realizado no período de 22 a 26 de outubro de 2018.

Participação no II Encontro dos Programas de Pós-graduação da Faculdade de Ciências Aplicadas - UNICAMP. Realizado no dia 13 de setembro de 2018.

Curso de Extensão universitária em Microscopia eletrônica e ultraestrutura celular. (Carga horária: 60h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil. Realizado no período de 12 a 21 de março de 2018.

Programa Estágio Docente (PED) na disciplina de "Biologia Celular e Molecular" para os cursos de graduação em Nutrição e em Ciências do Esporte da Faculdade de Ciências Aplicadas - FCA - UNICAMP no primeiro semestre de 2018. Carga horária: 6 horas/semana.

Participação na avaliação dos trabalhos finais de conclusão da disciplina Tópicos Avançados em Biologia Celular e Molecular (EN025) do Programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição, do Esporte e Metabolismo (CNEM) da Faculdade de Ciências Aplicadas - FCA - UNICAMP no primeiro semestre de 2018.