Universidade Estadual Paulista – UNESP
"Júlio de Mesquita Filho"
Programa de Pós Graduação em Biotecnologia
Instituto de Química de Araraquara

Potencial anti-inflamatório e antiproliferativo de compostos inibidores da enzima desoxi-hipusina sintase

Oedem Paulo de Almeida Junior

Tese de doutorado

Araraquara-SP

2015

Oedem Paulo de Almeida Junior

Potencial anti-inflamatório e antiproliferativo de compostos inibidores da enzima desoxi-hipusina sintase

Tese apresentada ao Instituto de Química – UNESP, Araraquara, como parte dos requisitos para obtenção do titulo de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli

Co-orientador: Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini

Araraquara-SP

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Almeida Junior, Oedem Paulo de
A447p Potencial anti-inflamatório e antiproliferativo de compostos inibidores da enzima desoxi-hipusina sintase / Oedem Paulo de Almeida Junior – Araraquara : [s.n], 2015
92 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Cleslei Fernando Zanelli
Coorientador: Sandro Roberto Valentini

1. Inflamação-mediadores. 2. Ribossomos. 3. Proteínas-síntese. 4. Inibidores enzimáticos. 5. Ciclo celular. I. Título.

Elaboração: Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

Dedicatória

Dedico este trabalho a todos os amigos e familiares, cuja criação, ensinamentos e convivência tornaram o presente possível. Entretanto, como qualquer trabalho científico, deve também ser dedicado a todos que, por ventura, venham utilizá-lo como fonte para seus estudos.

Agradecimentos

Especialmente aos meus pais, Sônia e Oedem, por me proporcionarem a melhor educação possível, pois me ensinaram a amar e respeitar.

Ao meu irmão Rafael, cuja convivência me proporcionou uma excelente infância que muito contribuiu para o meu desenvolvimento social.

Um agradecimento especial ao Prof. Cleslei F. Zanelli, quem me orientou, pelos inúmeros momentos de discussão que proporcionou meu amadurecimento científico, o que fez possível este trabalho.

Ao co-orientador deste trabalho, Prof. Sandro R. Valentini, que contrubuiu muito para as discussões científicas e proporcionou uma excelente estrutura laboratorial, sem a qual este trabalho não seria possível.

À professora Dra. Alexandra Ivo de Medeiros, que foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho, proporcionando conhecimento, estrutura laboratorial e treinamento no aprendizado de várias técnicas.

Às colegas e amigas do laboratório de Imunologia da faculdade de Ciências Farmacêuticas Naiara, Ana e Thais pelos ensinamentos, disponibilidade e paciência em me ajudar.

Aos professores Dra. Valéria Valente e Dra. Andréia Machado Leopoldino pela participação e contribuição no exame geral de qualificação deste trabalho.

Ao Instituto de química e Faculdade de Ciências Farmacêuticas pelo apoio institucional de infraestrutura, a CAPES pela bolsa concedida para a realização do projeto. Ao CNPq, PADC-FCFAR, à FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro para a realização desse trabalho.

Às funcionárias da pós-graduação e biblioteca, sempre prontas para ajudar no que foi preciso.

Indispensável aqui, um agradecimento à todos os colegas e amigos de trabalho, cuja influência não se limitou aos experimentos e reuniões cientificas, indo até os bons momentos vividos. Portanto, aos atuais e antigos companheiros do "lab" BiomolVZ: Kdu, Leonardo, Paulo, Mariana, Fábio, Juliana, Kdu , Natália, Matheus, Vitor, Carol, Pri, Cris, Marco, Thais, Arthur, Paulinha, Silvinha, que hoje são partes permanentes da minha história.

I was looking back on my life
And all the things I've done to me
I'm still looking for the answers
I'm still searching for the key

The wreckage of my past keeps haunting me
It just won't leave me alone
I still find it all a mystery
Could it be a dream?

The road to nowhere leads to me

Through all the happiness and sorrow
I guess I'd do it all again
Live for today and not tomorrow
It's still the road that never ends

The wreckage of my past keeps haunting me
It just won't leave me alone
I still find it all a mystery
Could it be a dream?

The road to nowhere leads to me
The road to nowhere's gonna pass me by
I hope we never have to say goodbye
I never want to live without you

The wreckage of my past keeps haunting me
It just won't leave me alone
I still find it all a mystery
Could it be a dream?

The road to nowhere leads to me

Ozzy Osbourne - Road to Nowhere

Resumo

eIF5A é a única proteína conhecida que contém o resíduo do aminoácido incomum hipusina (hidroxiputrescina-lisina). Este resíduo de hipusina é essencial para a função de eIF5A e é formado pela modificação de um resíduo específico de lisina em uma reação pós-traducional, dependente da poliamina espermidina. A modificação no resíduo de lisina para a formação da hipusina é chamada de hipusinação, que ocorre em duas etapas: primeiramente, a enzima desoxi-hipusina sintase (DHPS) transfere o radical 4-aminobutil proveniente da espermidina para um resíduo específico de lisina em eIF5A (posição 50 em mamíferos); em seguida, este é hidroxilado pela desoxi-hipusina hidroxilase (DOHH). Muitos autores têm demonstrado que a inibição da hipusinação pelo inibidor de DHPS GC7 ou o silenciamento de eIF5A leva à inibição da proliferação celular em vários tipos de células de mamíferos, incluindo linhagens tumorais, e também induzem um efeito anti-inflamatório, evidenciado em modelo murino de diabetes e sepse. Este trabalho buscou utilizar a linhagem transformada de macrófagos RAW 264.7 para entender melhor os mecanismos pelos quais GC7 possui sua atividade. De forma complementar, foi também testado o efeito de GC7 em macrófagos de cultura primária e também em ratos. Como esperado, demonstramos aqui que GC7 inibe de maneira importante a hipusinação em linhagem RAW 264.7 e que, no entanto, este tratamento com GC7 não compromete a viabilidade celular nem altera significativamente o proteoma de células RAW 264.7. Por outro lado, GC7 inibe a produção e liberação da citocina pró-inflamatória TNF-α sem alterar os níveis de mRNA desta citocina, indicando uma modulação pós-transcricional, mais provavelmente no nível traducional, dada a função de eIF5A no processo de síntese proteica. De forma bastante interessante, este efeito de inibição na liberação de TNF-α também foi observado em macrófagos de cultura primária e *in vivo* em ratos. Foi também analisada a capacidade de GC7 inibir a proliferação celular da linhagem RAW 264.7, a qual se dá antes da fase S do ciclo celular e não leva à indução de apoptose. A análise de expressão gênica utilizando um *array* de genes envolvidos com ciclo celular confirmou esta parada e sugere uma inibição da atividade do fator de transcrição E2F como parte do mecanismo de GC7 para inibição da proliferação celular. Por fim, novos compostos guanidínicos selecionados por triagem virtual ou sintetizados por grupos colaboradores foram testados como possíveis inibidores da atividade de DHPS *in vitro* e alguns mostraram atividade inibidora tanto de DHPS como proliferação das células RAW 264.7, porém não mostraram efeito sobre a liberação de TNF-α. Estes resultados em conjunto mostram que a inibição da maturação de eIF5A através da inibição de DHPS constitui um alvo promissor para o desenvolvimento de alternativas terapêuticas para doenças proliferativas e/ou inflamatórias.

Abstract

eIF5A is the only known protein containing the unusual amino acid residue hypusine (hydroxiputrescine-lysine). This hypusine residue is essential for eIF5A function and it is formed by modifying a specific lysine residue in a posttranslational reaction dependent on the polyamine spermidine. The modification of the lysine residue for the formation of hypusine is called hypusination, which occurs in two steps: first, the enzyme deoxyhypusine-synthase (DHPS) transfers the 4-aminobutyl moiety from spermidine to a specific lysine residue in eIF5A (position 50 in mammals); then it is hydroxylated by deoxyhypusine-hydroxylase (DOHH). Many authors have demonstrated that inhibition of hypusination by the DHPS inhibitor GC7 or silencing eIF5A leads to inhibition of cell proliferation in several types of mammalian cells, including tumor cell lines, and also induce an anti-inflammatory effect, as evidenced in a murine model of diabetes and sepsis. This study aimed to use the macrophage cell line RAW 264.7 to better understand the mechanisms by which GC7 has its activity. Complementarily, its was also tested the effect of GC7 in primary culture of macrophages and in rats. As expected, we show here that GC7 inhibits hypusination in RAW 264.7 cells and, on the other hand, this treatment with GC7 does not compromise cell viability nor significantly alter the proteome of RAW 264.7 cells. Moreover, GC7 inhibits the production and release of TNF-α without affecting mRNA levels of this cytokine, indicating a posttranscriptional modulation, most probably at the translational level, given the eIF5A function in the process of protein synthesis. Interestingly, this inhibitory effect on TNF-α release was also observed in primary cultures of macrophages and *in vivo* in rats. It was also examined the GC7 ability to inhibit cell proliferation of RAW 264.7 cells, which occurs prior to the S phase of the cell cycle and does not lead to the induction of apoptosis. Gene expression analysis using an array of cell cycle genes confirmed this arrest and suggests an inhibition of the E2F transcription factor as part of GC7 mechanism for inhibition of cell proliferation. Finally, new guanidine compounds selected by virtual screening or synthesized by collaborating laboratories were tested as potential inhibitors of DHPS *in vitro* and some have shown DHPS inhibition and suppresses RAW 264.7 cells proliferation, but none showed effect on the release of TNF-α. Together, this results show that inhibition of eIF5A maturation through inhibition of DHPS is a promising target for the development of alternative treatments for proliferative and / or inflammatory diseases.

Lista de Figuras

Figura 1. Estruturas da proteína eIF5A humana e seu homólogo bacteriano EF-P 17

Figura 2. Modificação pós-traducional essencial de eIF5A: hipusinação. 21

Figura 3. Estrutura 3D de DHPS. 22

Figura 4. Etapas da reação de desoxi-hipusinação, catalisada pela enzima desoxi-hipusina sintase. 23

Figura 5. Exemplo do gráfico duplo-recíproco característico de inibição competitiva 43

Figura 6. Detecção de eIF5A hipusinada em células RAW 264.7. 46

Figura 7. Viabilidade celular frente ao tratamento com GC7. 47

Figura 8. Análise proteômica de células RAW 264.7 não tratadas e tratadas com GC7. 48

Figura 9. Análise de 2D-PAGE. 49

Figura 10. Distribuição percentual das relações funcionais das proteínas identificadas como diferencialmente presentes nas células não tratadas e tratadas com GC7. 50

Figura 11. Análise proteômica. 51

Figura 12. Avaliação da liberação de TNF-α em células RAW 264.7. 52

Figura 13. Análise dos níveis da forma transmembrana de TNF-α. 53

Figura 14. Efeito de GC7 sobre a liberação de citocinas em cultura primaria de macrófagos. 54

Figura 15. Curva da produção de TNF-α no plasma de ratos frente ao tratamento com GC7 e desafio sistêmico com LPS. 55

Figura 16. Níveis de mRNAs de marcadores inflamatórios em células RAW264.7 tratadas com GC7. 58

Figura 17. Perfil polissomal de células RAW 264.7 tratadas com GC7 59

Figura 18. Perfil traducional de marcadores inflamatórios em células RAW 264.7 tratadas com GC7. 60

Figura 19. Proliferação de células RAW 264.7 frente ao tratamento com GC7 62

Figura 20. GC7 induz um bloqueio na fase G0/G1 do ciclo celular. 63

Figura 21. Níveis de mRNAs de genes envolvidos no ciclo celular em células RAW264.7 tratadas com GC7. 65

Figura 22. Via de ciclo celular de *Mus musculus* descrita anotada na base de dados KEGG. 65

Figura 23. Análise dos níveis de E2F1. 69

Figura 24. GC7 não induz apoptose em células RAW 264.7. 70

Figura 25. Viabilidade celular frente ao tratamento com os compostos que apresentaram inibição no ensaio *in vitro* da atividade de DHPS. 71

Figura 26. Proliferação de células RAW 264.7 frente ao tratamento com compostos selecionados por triagem virtual e que apresentaram atividade inibidora de DHPS *in vitro*. 73

Lista de Tabelas

Tabela 1. Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para o estudo de expressão gênica relativa por meio de qPCR em células RAW 264.7 tratadas com GC7. 38

Tabela 2. Compostos testados no ensaio de atividade *in vitro* da enzima desoxi-hipusina sintase (DHPS) que apresentaram maior porcentagem de inibição. 44

Tabela 3. Grupo de genes testados por qRT-PCR. Os genes que não estão presentes na Figura 16 não foram estatisticamente significantes 57

Tabela 4. Genes analisados no qPCR *array* de ciclo celular distribuídos de acordo com seu grupamento funcional. 64

Abreviaturas

^{3}H	radioisótopo de hidrogênio trício
7-AAD	7- aminoactinomicina D
Å	angstron
AG	aminoguanidina
cDNA	DNA complementar ao mRNA
CFSE	carboboxi-fluoresceína succinimidil ester
C-terminal	carboxi-terminal
$D.O._{260nm}$	densidade óptica a 260nm
$D.O._{280nm}$	densidade óptica a 280nm
$D.O._{600nm}$	densidade óptica a 600nm
DAMP	padrões moleculares associados a danos
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP)
DTT	ditiotreitol
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
h	hora
kb	kilobase
KCl	Cloreto de potássio
NaCl	cloreto de sódio
kDA	quilodalton

LPS	lipopolissacarídeo
M	molar
m/z	relação massa/carga
dFP	desvio de luz polarizada
Kd	constante de dissociação
mA	miliampère
mg	miligrama
$MgCl_2$	cloreto de magnésio
KOAc	acetato de potássio
$Mg(OAc)_2$	acetato de magnésio
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
mRNA	RNA mensageiro
MTT	3-(4,5-Dimetil tiazol 2-il) 2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium
ng	nanograma
nm	nanômetro
nM	nanomolar
N-terminal	amino-terminal
PAMP	padrões moleculares associados a patógenos
pb	pares de base
PBS	“phosfate buffered saline” (solução salina tamponada com fosfato)
PBST	PBS com Tween 20

BSA	albumina do soro bovino
PEG	polietilenoglicol
pg	picograma
pH	potencial hidrogeniônico
PI	Iodeto de propídeo
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonila
PRR	receptores de reconhecimento de padrão
rcf	Força centrífuga relativa (*relative centrifugal force*)
RNA	ácido ribonucléico
rpm	rotações por minuto
rRNA	RNA ribossomal
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
SFB	soro fetal bovino
TE	tampão Tris-EDTA
Tris	tris-hidroximetilaminometano (trizma base)
Triton X-100	polietilenoglicol-terc-octilfenil eter
tRNA	RNA transportador
$tRNA_i^{Met}$	tRNA iniciador de metionina
Tween 20	monolaurato de polietilenoglicol-sorbitana
DMSO	dimetilsulfóxido
U	unidade de atividade enzimática
UV	ultravioleta

V	volt
V/h	volt por hora
v/v	relação volume/volume
x*g*	aceleração gravitacional
µCi	microCurie
µg	micrograma
µL	microlitro
µM	micromolar

Sumário

1. **Introdução** 16
   1.1. Fator de início de tradução de eucariotos 5A (eIF5A) 16
   1.2. Desoxi-hipusina sintase (DHPS) 21
   1.3. Resposta Inflamatória e a função dos macrófagos 24
   1.4. Efeitos anti-inflamatórios da inibição de eIF5A 24
   1.5. eIF5A e DHPS na proliferação celular 25
2. Objetivos 27
3. Métodos 28
   3.1. Cultivo de células de mamíferos 28
   3.2. Avaliação da atividade citotóxica em células RAW264.7 28
   3.3. Medida da hipusinação nas células RAW264.7 tratadas com GC7 29
   3.4. Ensaio de proliferação das células RAW 264.7 29
   3.5. Curva de crescimento 30
   3.6. Análise do ciclo celular por citometria de fluxo 31
   3.7. Análise da indução de apoptose pelo tratamento com GC7 nas células RAW264.7 31
   3.8. Avaliação da produção de TNF-α em cultura de células 32
   3.9. Análise da liberação de TNF-α *in vivo* 32
   3.10. Obtenção de células da medula óssea de camundongos e diferenciação em macrófagos 33
      3.10.1. Geração de macrófagos produtores de TNF-α e IL-6 33
      3.10.3. Quantificação das citocinas 33
   3.11. Análise proteômica 34
      3.11.1. Obtenção do extrato proteico 34
      3.11.2. Focalização isoelétrica das proteínas 34
      3.11.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida e análise dos spots de proteínas 34
      3.11.4. Tratamento dos spots recortados do gel e identificação das proteínas por ESI Q-ToF 35
   3.12. Perfil polissomal 36
   3.13. Extração de RNA a partir de gradientes de sacarose 36
   3.14. Extração do RNA total celular e transcrição reversa 37

3.15. Análise relativa dos níveis de mRNA por PCR em tempo real (qRT-PCR)...37
3.15.1. Desenho e otimização dos oligonucleotídeos.....37
3.15.2. Avaliação da eficiência das reações de qRT-PCR.....39
3.15.3. qRT-PCR utilizando TaqMan Array (Applied Biosystems).....39
3.15.4. qRT-PCR utilizando RT^2 Profiler PCR Array Mouse Cell Cycle (QIAGEN).....40
3.16. Ensaio de western blot.....40
3. 17. Novos inibidores da enzima Desoxi-hipusina sintase: triagem e ensaio de atividade *in vitro*.....41
4. Resultados e discussão.....45
4.1. GC7 reduz a formação de hipusina em eIF5A nas células RAW 264.7.....45
4.2. O tratamento com GC7 não compromete a viabilidade das células RAW264.7.....46
4.3. GC7 não altera significativamente o proteoma de células RAW264.7.....47
4.4. GC7 inibe a liberação de TNF-α por células RAW264.7.....51
4.5. GC7 reduz os níveis de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos primários diferenciados *in vitro*.....53
4.6. A administração de GC7 reduz os níveis de TNF-α *in vivo* após desafio inflamatório sistêmico por LPS.....54
4.7. Níveis de mRNAs de marcadores inflamatórios em células RAW264.7 tratadas com GC7.....56
4.8. GC7 causa defeito no início da tradução em células RAW264.7.....58
4.9. Análise do perfil traducional de células RAW 264.7 tratadas com GC7.....59
4.10. GC7 bloqueia a proliferação de células RAW264.7 e induz parada do ciclo celular na fase G0/G1.....61
4.11. Análise da expressão de genes envolvidos no ciclo celular por qRT-PCR...63
4.12. GC7 não induz apoptose em células RAW264.7.....69
4.13. Novos inibidores da enzima Desoxi-hipusina Sintase.....70
5. Conclusões.....74
Referências.....75

1. Introdução

1.1. Fator de início de tradução de eucariotos 5A (eIF5A)

eIF5A é uma proteína pequena, de aproximadamente 17 kDa, e presente tanto em eucariotos quanto em arqueas, mas não em bactérias (Park, Wolff e Folk, 1993a; PARK *et al.*,1997; Klier *et al.*, 1993). É uma proteína essencial em todos os organismos testados e altamente conservada evolutivamente (Park, Wolff e Folk, 1993a; PARK *et al.* 1997). As proteínas eIF5A de *Saccharomyces cerevisiae* e de mamíferos compartilham 63% de identidade (Schnier, Schwelberger, Smitmcbride*, et al.*, 1991; Chen e Liu, 1997), sendo que a proteína de humano substitui a de levedura, o que atesta sua conservação funcional (Schnier, Schwelberger, Smit-McBride*, et al.*, 1991).

Apesar de bactéria não possuir eIF5A, seu homológo estrutural em bactéria é o fator de elongação da tradução EF-P. A Figura 2 mostra que EF-P possui 3 domínios e eIF5A somente 2, sendo os domínios I e II de EF-P sobreponíveis aos domínios N-terminal e C-terminal de eIF5A, respectivamente (Hanawa-Suetsugu *et al.*, 2004). EF-P possui efeito estimulatório na formação de ligações peptídicas, sendo considerado um fator de elongação da tradução (Glick e Ganoza, 1975). Apesar de EF-P não ser totalmente essencial para a viabilidade celular (Bullwinkle *et al.*, 2012), como eIF5A, EF-P é capaz de estimular a síntese de metionil-puromicina *in vitro* e tem sua função alterada por inibidores da atividade peptidil-transferase do ribossomo (Ganoza, Kiel e Aoki, 2002), assim como eIF5A (Benne, R. e Hershey, J. W. B., 1978). Dados recentes sugerem que EF-P esteja envolvido no correto posicionamento do $tRNA^{Met}$ iniciador, atuando na formação da primeira ligação peptídica (Blaha, Stanley e Steitz, 2009).

Várias estruturas cristalográficas de eIF5A de eucariotos e arqueas têm sido determinadas e estas proteínas mostram uma significante similaridade estrutural. As estruturas tridimensionais dos homólogos de eIF5A oriundos de *M. jannaschii* (Kim *et al.*, 1998), *P. aerophilum* (Peat *et al.*, 1998) e *P. horikoshii* (Yao *et al.*, 2003), além de eIF5A de humano (Tong *et al.*, 2009) e de levedura (código PDB 3ER0) possuem estrutura tridimensional composta por dois domínios, sendo os resíduos por volta de 1 a 83 formando o domínio N-terminal. Este domínio consiste de seis folhas beta que se arranjam em um barril-beta parcialmente aberto (Kim et al., 1998). A comparação

destes domínios com outras proteínas de estruturas tridimensionais conhecidas mostra que o domínio N-terminal, o qual contém a hipusina, possui um enovelamento classificado como *Translation Protein SH3-like motif*, o qual também está presente em algumas proteínas ribossomais (Gough *et al.*, 2001). O domínio C-terminal consiste de 3 a 5 folhas beta e de 0 a 2 alfa-hélices, o qual se assemelha ao enovelamento presente em proteínas que se ligam a ácidos nucleicos de fita simples ("Single-stranded Oligonucleotide Binding Fold"), e desempenham diferentes funções celulares (http://supfam.org/SUPERFAMILY) (Gough *et al.*, 2001b). De fato, dois trabalhos publicados tentam correlacionar a função de eIF5A com a ligação a mRNAs, porém a extensão de tais estudos ainda necessita ser ampliada para se estabelecer um papel de eIF5A na interação física direta com mRNAs (Xu e Chen, 2001; Xu, Jao e Chen, 2004). Em todas as estruturas de eIF5A, os resíduos altamente conservados que flanqueiam o sítio de hipusinação se dispõem em uma longa alça compreendida entre as folhas beta 3 e beta 4 do domínio N-terminal (Figura 1).

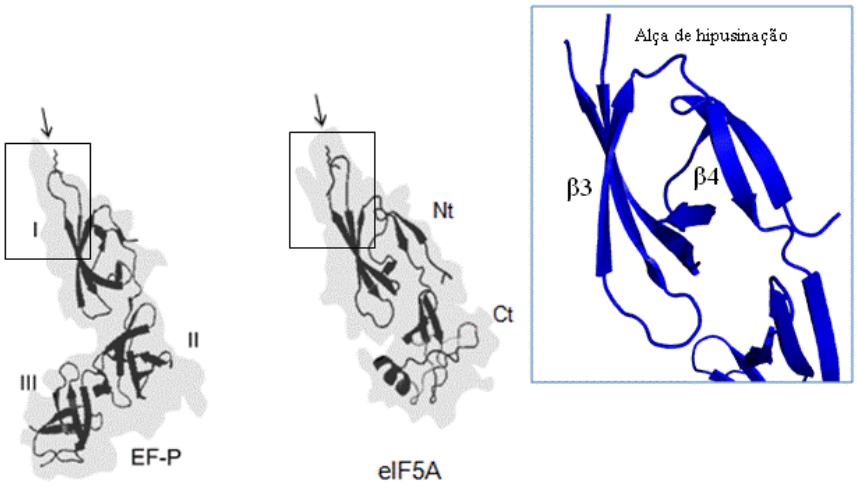


Figura 1. **Estruturas da proteína eIF5A humana e seu homólogo bacteriano EF-P (estrutura mostrada aqui de *E. coli*).** Em destaque, encontra-se a alça de modificação pós-traducional, localizada entre as folhas β3 e β4.

eIF5A foi inicialmente considerado um fator de início da tradução em eucariotos (eukaryotic translation initiation factor 5A) (Benne, R. e Hershey, J. W. B., 1978) por estimular a síntese *in vitro* de metionil-puromicina (Benne, R. e Hershey, J. W. B., 1978). O ensaio de metionil-puromicina mede a incorporação de metionina radioativa, a partir de metionil-$tRNA_i^{Met}$, à puromicina, através de catálise ribossomal, sendo, portanto, um ensaio bastante utilizado para avaliar a influência de diferentes

fatores no início da tradução. Apesar da capacidade evidente de eIF5A estimular a síntese de metionil-puromicina *in vitro*, utilizando-se tripletes AUG ou mRNA de globina, a não adição de eIF5A não mostrou nenhum impacto sobre a síntese de globina *in vitro*, discordando, assim, de resultados obtidos na ausência dos outros fatores de início de tradução também testados: eIF1, eIF1A, eIF3, eIF5B e eIF5 (Benne, R. e Hershey, J. W., 1978). Assim, apesar de eIF5A ter sido denominado inicialmente um fator de início de tradução, a sua função como tal não foi claramente demonstrada.

Dados recentes da associação de eIF5A com ribossomos ativamente engajados na tradução fortalecem o envolvimento desta proteína na síntese proteica (Jao e Chen, 2006; Zanelli *et al.*, 2006). Ensaios de co-purificação seguidos de identificação por espectrometria de massas revelaram que eIF5A interage com as proteínas ribossomais P0, S5 e L11 e com eEF2, componentes da maquinaria de tradução (Zanelli *et al.*, 2006). Além disso, defeitos observados em mutantes sensíveis a temperatura, quando cultivados na temperatura não permissiva, sugerem um papel para eIF5A na elongação da tradução por apresentarem defeitos claros na síntese de proteínas (Dias *et al.*, 2008) e um aumento nas frações polissomais em relação às frações de 80S (Gregio, A. P. B. *et al.*, 2009; Saini, Preeti *et al.*, 2009), semelhante ao que ocorre para um mutante dominante negativo de eEF2 (Gregio, A. P. B. *et al.*, 2009). Ainda, foi verificado que os mesmos mutantes apresentam um atraso significativo no tempo de trânsito ribossomal (Gregio, A. P. *et al.*, 2009; Saini, P. *et al.*, 2009). Adicionalmente, mutantes de eIF5A não apresentaram formação de *P-bodies* (agregados de mRNA e proteínas, onde também ocorre a degradação do mRNA) na temperatura não permissiva, característica semelhante à observada para células tratadas com ciclo-heximida, um inibidor da elongação da tradução. Este efeito sobre os *P-bodies* também é consistente com um papel de eIF5A na fase de elongação de tradução (Gregio, A. P. *et al.*, 2009). Além desses resultados, um mutante condicional de eIF5A tem seus defeitos de crescimento, síntese protéica e perfil polissomal suprimidos pelo aumento da expressão de eEF2, revelando uma relação funcional próxima entre eIF5A e eEF2 (Dias *et al.*, 2012). Estes dados sugerem um papel para eIF5A na etapa de elongação da tradução, no entanto, o mecanismo molecular pelo qual eIF5A afeta a tradução e se este efeito afeta a tradução global ou de um grupo específico de mRNAs, como tratado a seguir, são questões ainda em aberto.

Em *S. cerevisiae*, eIF5A é codificado por dois genes homólogos *TIF51A* (*HYP2*) e *TIF51B* (*ANB1*), os quais dão origem a proteínas com 90% de identidade. Estes genes são regulados transcricionalmente pelos níveis de oxigênio, sendo expressos em condições aeróbicas e anaeróbicas, respectivamente (Schnier, Schwelberger, Smit-McBride*, et al.*, 1991); Wohl *et al.*,1993; Valentini *et al.*, 2002). Estudos utilizando linhagens expressando apenas *TIF51A* (presente no cromossomo V) ou *TIF51B* (presente no cromossomo X), sob o controle de um promotor induzível por galactose, mostraram que a expressão tanto de um gene quanto de outro é suficiente para manter o crescimento celular nas situações de aerobiose ou anaerobiose, indicando que os produtos desses dois genes possuem função indistinguível (Kang, Schwelberger e Hershey, 1993). Em humano, eIF5A também é codificado por diferentes genes, *EIF5A1* e *EIF5A2*, os quais são filogeneticamente conservados e presentes nos vertebrados (Jenkins, Haag e Johansson, 2001). Ambas isoformas de humano são capazes de substituir a proteína de levedura (Schnier, Schwelberger, Smit-McBride*, et al.*, 1991; Clement *et al.*, 2006). Apesar de as proteínas resultantes de *EIF5A1* (eIF5A-1) e *EIF5A2* (eIF5A-2) terem sido relacionadas de diferentes maneiras à correlação de eIF5A com proliferação celular em mamíferos (Landau *et al.*, 2010; Colvin *et al.*, 2013; Wang, Guan e Xie, 2013; Memin *et al.*, 2014), nenhuma diferença de mecanismos destas isoformas foi identificada até o momento. Além disso, tanto eIF5A-1 como eIF5A-2 se ligam com afinidades muito semelhantes ao ribossomo (Dra. Danuza Rossi, dados não publicados). No presente trabalho, não foi feita a distinção entre as duas isoformas da proteína eIF5A, pois ambas apresentam identidade maior que 90% e as mesmas funções na tradução.

Embora a atuação de eIF5A na tradução seja clara, não está determinado se ela atua de maneira geral ou específica e, sendo específica, que tipo de mensageiros são favorecidos por este fator. Recentemente, foi observado que eIF5A e seu homólogo estrutural em bactéria, EF-P, apresentam um importante papel na atenuação de um tipo de *stalling* dos ribossomos, ou seja, eIF5A facilitaria a tradução de uma sequência de aminoácidos do polipeptídio, que por algum motivo, atrasa o processo de tradução. Estes resultados foram observados durante o processo de tradução de proteínas com sequências consecutivas de poliprolinas, demonstrando assim uma provável função específica para estes fatores no processo de tradução (Doerfel *et al.*, 2013; Gutierrez *et al.*, 2013a; Ude *et al.*, 2013).

Corroborando com o papel na tradução de sítios com sequência de prolina, eIF5A foi mostrado ser essencial para a fertilidade e o crescimento celular polarizado através da tradução da proteína Bni1, que possui sítio com 12 prolinas e tem seus níveis drasticamente diminuídos em linhagens *tif51a* mutantes (Li *et al.,* 2014).

eIF5A sofre uma modificação pós-traducional específica e exclusiva chamada de hipusinação (Chen e Liu, 1997; Park, Lee e Joe, 1997). A formação do aminoácido hipusina (do inglês hypusine: hydroxyputrescine-lysine) ocorre através da transferência de um grupo aminobutil da poliamina espermidina para o amino grupo livre de uma lisina específica, catalizada pela enzima desoxi-hipusina sintase (Dys1 em *S. cerevisiae*; DHPS em humano), logo que a proteína é sintetizada. Em seguida, a oxidação deste grupo pela enzima desoxi-hipusina hidroxilase (Lia1 em *S. cerevisiae*; DOHH em humano) termina a maturação de eIF5A (Park *et al.*, 2010) (Figura 2). O aminoácido hipusina não é removido ou modificado até que a proteína seja degradada, revelando a irreversibilidade do processo (Park, Wolff e Folk, 1993b). A substituição do resíduo de lisina específico de eIF5A, em *S. cerevisiae*, por arginina (K51R) leva à produção de eIF5A não hipusinado, o que resulta em inviabilidade celular (Schnier, Schwelberger, Smitmcbride*, et al.*, 1991). O fato de eIF5A ser a única proteína eucariótica que sofre hipusinação evidencia uma atividade biológica fundamental para este fator. A importância da hipusinação para a atividade de eIF5A no processo de tradução foi mostrada a partir da observação de que eIF5A humana recombinante, não hipusinada, foi incapaz de estimular a síntese *in vitro* de metionil-puromicina. Entretanto, quando este precursor foi modificado *in vitro* para a forma hipusinada, a proteína resultante tornou-se ativa neste ensaio (Park, 1989; Smit-McBride *et al.*, 1989).

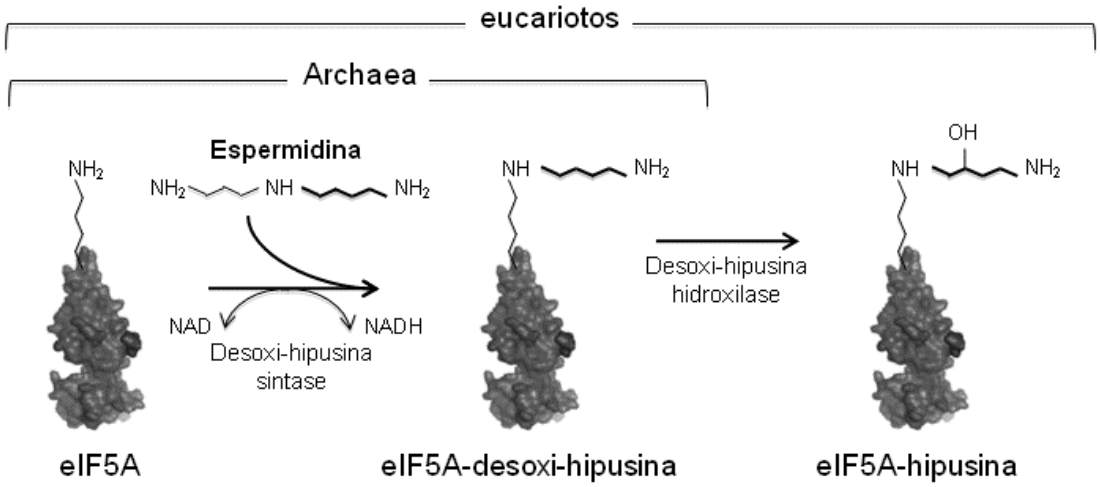


Figura 2. **Modificação pós-traducional essencial de eIF5A: hipusinação.** A hipusinação ocorre em duas etapas, as quais são catalisadas pelas enzimas desoxi-hipusina sintase (DHPS) e desoxi-hipusina hidroxilase (DOHH).

1.2. Desoxi-hipusina sintase (DHPS)

A enzima desoxi-hipusina sintase (EC 2.5.1.46) foi assim denominada durante o estudo da formação de eIF5A desoxi-hipusinada (eIF5A-Dhp), utilizando lisado celular de testículos de ratos como fonte da enzima. Nesse estudo foi proposto o mecanismo de via de biossíntese da desoxi-hipusina, compreendendo quatro etapas (Wolff, Park e Folk, 1990). A enzima é composta estruturalmente por quatro monômeros idênticos de aproximadamente 41 kDa, que se associam em dois pares de dímeros (A1B1 e A2B2), totalizando quatro sítios ativos por molécula. Os sítios ativos estão localizados nas interfaces dos dímeros, dispostos de forma anti-paralela (Liao *et al.*, 1998). Cada monômero apresenta em sua estrutura secundária características do enovelamento de Rossmann (do inglês, *Rossmann fold*), típico da maioria das desidrogenases (Bell, Yeates e Eisenberg, 1997) e conhecido por se ligar a nucleotídeos, em especial, ao co-fator nicotinamida adenina dinucletídeo (NAD^+/NADH) (Rao e Rossmann, 1973). O sítio catalítico da enzima DHPS encontra-se no final de um túnel estreito de aproximadamente 16 Å de profundidade, medido entre os resíduos de aminoácidos Gly314 (dímero A) e Asp243 (dímero B). O acesso ao sítio ativo tem o formato de um amplo funil de aproximadamente 7 Å de profundidade o qual se direciona à Lys329, que recebe covalentemente o fragmento 4-aminobutil da espermidina; aos resíduos de aminoácidos Glu323, Trp327, Tyr305, Asp316 e His288 de um monômero, e Asp243 de outro monômero no tetrâmero,

responsáveis pela ligação com a molécula de espermidina e ao anel da nicotinamida no co-fator NAD^+ (Liao *et al.*, 1998; Umland *et al.*, 2004) (Figura 3).

Assim como a proteína eIF5A, a enzima DHPS é altamente conservada ao longo da evolução, tanto em Archaea como em eucariotos (Brochier, Lopez-Garcia e Moreira, 2004). A atividade de DHPS é altamente específica, uma vez que catalisa a formação de desoxi-hipusina, utilizando como substrato apenas a proteína eIF5A, através da clivagem de espermidina (Park *et al.*, 2010). O mecanismo completo é composto por 4 etapas: A) oxidação NAD-dependente da espermidina em desidroespermidina; B) hidrólise da desidroespermidina e transferência da porção 4-aminobutil para o grupo amino ε do resíduo Lys329 de DHPS e consequente formação do composto intermediário enzima-imina; C) adição da porção 4-aminobutil da enzima para o grupo amino ε do resíduo de Lys50 de eIF5A, com a formação do composto intermediário eIF5A-imina; D) redução do intermediário que origina a desoxi-hipusina (Park, 2006) (Figura 4).

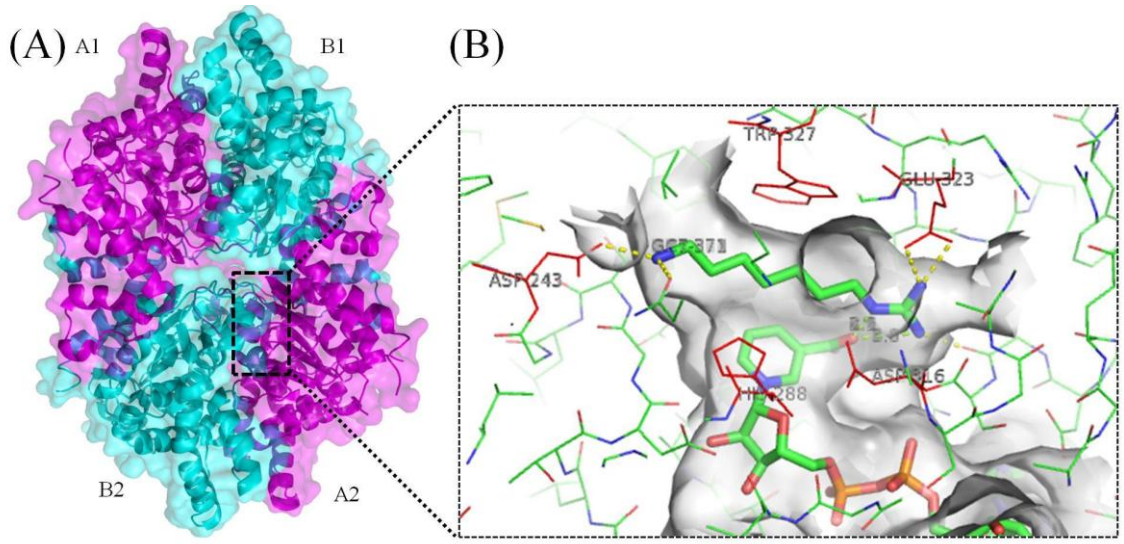


Figura 3. Estrutura 3D de DHPS. A) Estrutura da desoxi-hipusina sintase: cadeia A (magenta) e cadeia B (azul) se associam formando dímeros. O sítio ativo localiza-se na interface das cadeias associadas e a unidade funcional é formada pelo tetrâmero, também considerado "dímero de dímeros". B) Cavidade em que se localiza o sítio ativo da enzima DHPS. Os resíduos de aminoácidos responsáveis pela interação com o substrato estão destacados em vermelho. No formato de bastão estão destacados o inibidor GC7 e o co-fator NAD. As interações do inibidor com o sítio ativo são representadas pelas linhas amarelas tracejadas.

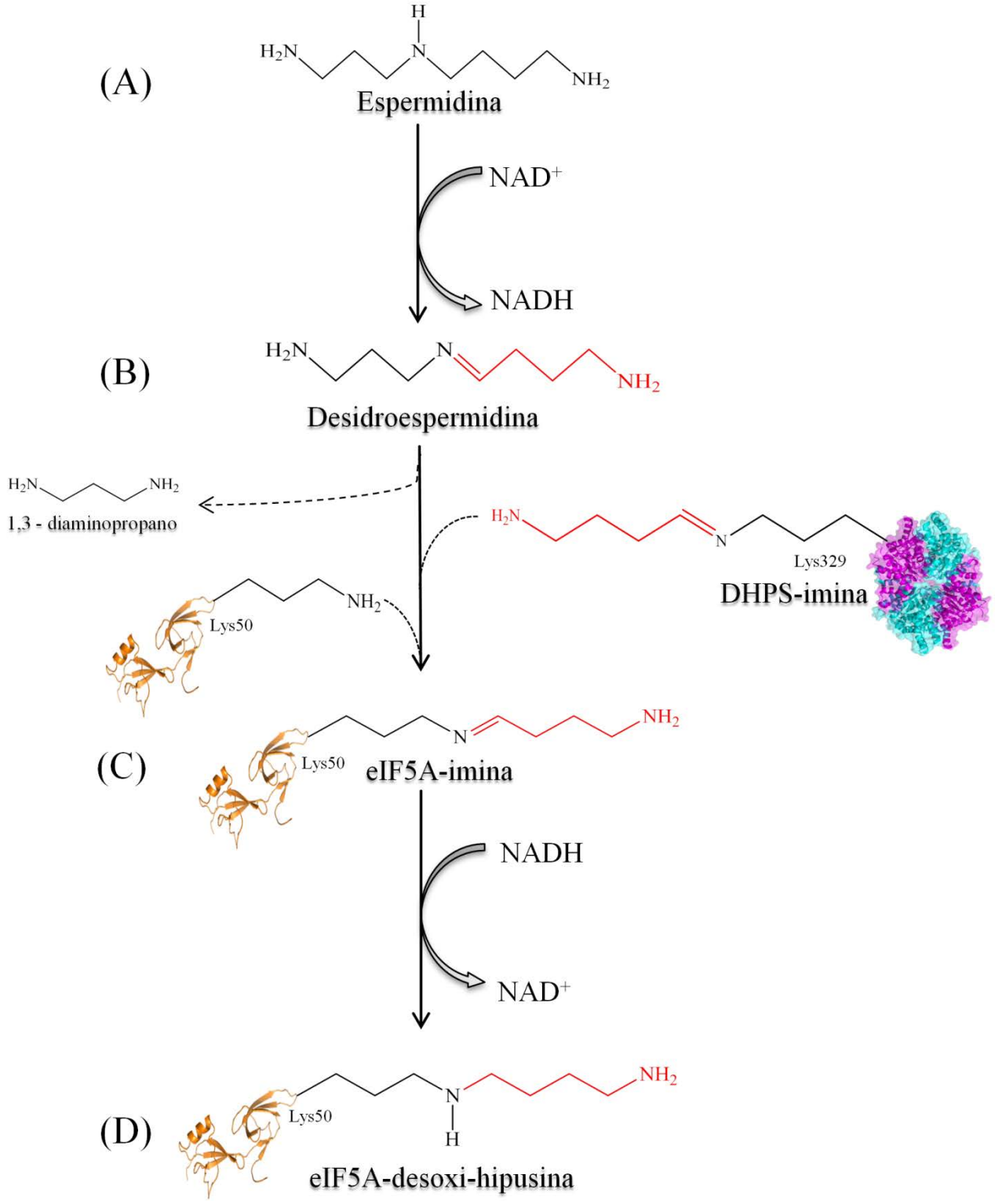


Figura 4. Etapas da reação de desoxi-hipusinação, catalisada pela enzima desoxi-hipusina sintase.

1.3. Resposta Inflamatória e a função dos macrófagos

A resposta inflamatória é um mecanismo de defesa utilizada pelo sistema imune do hospedeiro contra estímulos como componentes de micro-organismos (Padrões Moleculares Associados a Patógenos / *Pathogen-associated molecular pattern* – PAMPs) e componentes intracelulares oriundos de células necróticas (Padrões Moleculares Associados a Danos / *Damage-associated molecular pattern* – DAMPs). Os macrófagos são distribuídos por diferentes tecidos e compõem um dos mais importantes tipos celulares responsáveis por desencadear respostas contra agentes agressores. Os macrófagos apresentam uma diversidade de receptores de superfície conhecidos como receptores de reconhecimento de padrão (PRR), como os receptores Toll-like (TLRs), que podem interagir com PAMPs de bactérias, vírus, parasitas e fungos. Por exemplo, o lipopolissacarídeo (LPS), um PAMP oriundo da membrana externa de bactérias gram-negativas, interage com TLR4 através do complexo CD14/LBP/TLR4, resultando na ativação de uma complexa cascata de sinalização intracelular (Medzhitov, 2007; Beutler, 2009). Esta interação promove o recrutamento de proteínas MyD88 e IRAK quinases, a ativação de TRAF6 e, subsequentemente, dos fatores de transcrição NFκB e AP-1. A ativação destes genes resulta na produção de citocinas inflamatórias como TNF-α, interleucina 1 (Il-1a; IL-1b), IL-6 e outros mediadores inflamatórios, como óxido nítrico (NO) e prostaglandina E2 (PGE2), os quais podem desempenhar efeitos deletérios em doenças inflamatórias agudas e crônicas, como sepse e artrite reumatoide, respectivamente (Park *et al.*, 2009).

Na presença de estímulo inflamatório, macrófagos são capazes de produzir NO através da conversão de L-arginina pela óxido nítrico sintase (NOS), bem como as poliaminas celulares são oriundas da conversão de L-arginina pela arginase ornitina descarboxilase (ODC). Estes mediadores (NO e ornitina/poliaminas), os quais são produzidos por macrófagos durante a resposta inflamatória, podem constituir importantes marcadores para identificação de dois fenótipos distintos de macrófagos: pró-inflamatório (M1) e anti-inflamatório (M2) (Biswas e Mantovani, 2010).

1.4. Efeitos anti-inflamatórios da inibição de eIF5A

Estudos recentes investigando a resposta inflamatória relacionada à diabetes descobriram efeitos pro-inflamatórios mediados por eIF5A hipusinada. Tem sido

mostrado que o silenciamento de eIF5A por siRNA ou a administração do inibidor de hipusinação GC7 (N1-guanil-1,7- diaminoheptano) melhora os fenótipos relacionados à inflamação na diabetes em modelo murino, como a liberação de insulina, o controle glicêmico e a massa das ilhotas beta pancreáticas (Maier, Tersey e Mirmira, 2010; Robbins *et al.*, 2010; Templin *et al.*, 2011). Estes estudos também têm mostrado que a diminuição nos níveis de iNOS e na produção de NO são diretamente correlacionados com a inibição de eIF5A por siRNA, tratamento com GC7 ou haploinsuficiência do gene da enzima desoxi-hipusina sintase (*DHPS*) (Maier *et al.*, 2010; Templin *et al.*, 2011). É proposto que a produção de NO pela iNOS, em resposta a estímulos pro-inflamatórios, desempenha um papel importante nas células beta e na patogênese da diabetes, assim como os efeitos de citocinas pró-inflamatórias independentes de iNOS (Maier, Tersey e Mirmira, 2010).

Além da correlação das ações de eIF5A com estímulos pro-inflamatórios relacionados a diabetes, outros estudos tem mostrado que a administração de lipossomas de eIF5A-siRNA aumentam as taxas de sobrevivência de camundongos após injeção intraperitoneal de LPS, em um modelo murino de sepse (Moore *et al.*, 2008). Também foi demonstrado diminuições nos níveis séricos de TNF-α, IL-1b, IL-6 e outros mediadores inflamatórios após a administração de eIF5A-siRNA. Uma redução similar na liberação de citocinas inflamatórias foi observada quando eIF5A-siRNA foi administrado em camundongos desafiados com LPS por via intranasal. Além disso, a administração de eIF5A-siRNA após LPS intranasal induziu uma significante diminuição na mieloperoxidase pulmonar, uma enzima citotóxica produzida e liberada por neutrófilos (Moore *et al.*, 2008).

1.5. eIF5A e DHPS na proliferação celular

A relação entre eIF5A e a proliferação celular surgiu da observação de que a formação de hipusina neste fator é intensificada em linfócitos estimulados por mitógenos e dificilmente detectada na fase G_0 do ciclo celular (Cooper, Park e Folk, 1982). De fato, dados da literatura indicam que a inibição da hipusinação pode levar à inibição da proliferação celular em vários tipos de células de mamíferos (Park, Lee e Joe, 1997; Park, 2006). Além disso, em humanos, o aumento na expressão de ambas isoformas de eIF5A (eIF5A-1 e eIF5A-2) já foram amplamente documentadas

em células em estágio proliferativo, incluindo diferentes tipos de processos neoplásicos (Clement et al., 2006; Coller et al., 2000; Cracchiolo et al., 2004).

Em concordância com essas observações, inibidores de ambas etapas da hipusinação levam a parada da proliferação celular em culturas de células não transformadas e transformadas (Park, Lee e Joe, 1997). Portanto, a inibição seletiva das enzimas DHPS e DOHH representa uma estratégia importante para o estudo da hipusinação e da função biológica dessa modificação pós-traducional.

O inibidor de DHPS GC7 é um análogo estrutural da espermedina e o mais potente inibidor desta enzima caracterizado até o momento, com IC_{50} = 17 nM e K_i= 0,01μM. Esse inibidor é capturado ativamente pelo sistema de transporte de poliaminas e causa inibição na síntese de hipusina em diversos organismos testados (Park *et al.*, 1994; Kaiser *et al.*, 2006). Apesar da comprovada atividade de inibição de DHPS, e consequentemente da maturação de eIF5A, *in vitro* e *in vivo*, por GC7, um trabalho recente, utilizando cultura de células de mamífero, demonstrou que GC7 induz uma parada no início da tradução e que esta parada está relacionada à fosforilação de eIF2 e eIF4E-binding proteins 1 (4E-BP1), fatos que indicam a ativação de diferentes respostas de estresse celular (Landau *et al.*, 2004). Por outro lado, RNAi de eIF5A induziu parada da elongação da tradução. Um recente estudo, buscando elucidar o mecanismo de indução da autofagia por poliaminas, mostrou que GC7 é capaz de induzir notavelmente a autofagia basal em células de fibrosarcoma humano (linhagem 2fTGH) através de um mecanismo não relacionado com a inibição da hipusinação de eIF5A, uma vez que o silenciamento de eIF5A e DHPS por RNA de interferência ou a superexpressão de eIF5A não promoveu alterações na autofagia (Oliverio *et al.*, 2014). Dessa forma, apesar de inibir a função de eIF5A na elongação traducional, GC7 deve interferir também com outros processos celulares.

2. Objetivos

Objetivo geral:

O presente trabalho tem como objetivo geral estudar o efeito da ação do inibidor de hipusinação GC7 sobre a produção de marcadores inflamatórios e a proliferação de macrófagos e testar a atividade de novos inibidores da enzima desoxi-hipusina sintase.

Objetivos específicos:

- Avaliar os efeitos de GC7 sobre a hipusinação de eIF5A, a citotoxicidade e a liberação de TNF-α em cultura de macrófagos murinos (RAW 264.7);

- Avaliar o perfil proteômico de células RAW 264.7 mediante ao tratamento com GC7;

- Avaliar os efeitos de GC7 sobre a proliferação celular e no ciclo celular de células RAW 264.7;

- Avaliar o perfil traducional das células RAW264.7 tratadas com GC7;

- Avaliar o potencial anti-proliferativo de novos inibidores da enzima desoxi-hipusina sintase.

3. Materiais e Métodos

3.1. Cultivo de células de mamíferos

A linhagem RAW 264.7, derivada de macrófagos aderentes de camundongos Balb/c, foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). Estas células foram obtidas de tumores induzidos pela injeção intraperitoneal do Vírus da leucemia murina Abelson (A-MuLV), apresentando o oncogene viral v-Abl, responsável pela sua imortalização (Hartley *et al*., 2008).

As células foram armazenadas em nitrogênio líquido em solução de congelamento. Para a realização dos ensaios, as células foram descongeladas e expandidas em frascos de cultura celular em meio DMEM contendo 10% SBF (Soro fetal bovino) e gentamicina à temperatura de 37°C, em estufa incubadora umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO_2, conforme orientações do ATCC. Depois de formadas monocamadas, as células foram coletadas por deslocamento mecânico utilizando espalhador de células (300 mm com lâmina de 20 mm – TPP).

Na maioria dos experimentos, as células foram tratadas com diferentes concentrações de GC7 (50, 100 e/ou 150 μM) e, ao mesmo tempo, com 1 mM de aminoguanidina (inibidor de amino-oxidases para evitar a degradação de GC7) por 16 h e com 100 ng de LPS por 4 horas. Nos experimentos de proliferação celular (3.4), apoptose (3.7) e análise proteômica (3.11), as células não foram desfiadas com LPS.

3.2. Avaliação da atividade citotóxica em células RAW 264.7

Diferentes concentrações do composto GC7 (N1-guanil-1,7- diaminoheptano) foram dissolvidas em meio de cultura (DMEM completo) contendo 1 mM de aminoguanidina, homogeneizados, e esterilizados por filtração em membranas de 0,22 mm para a utilização experimental. Para avaliar a atividade citotóxica do GC7, foi utilizado o método colorimétrico utilizando 3-(4,5-Dimetil tiazol 2-il) 2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium (MTT). Assim, 5×10^4 células RAW 264.7 foram incubadas com as diferentes concentrações de GC7 e 1 mM de aminoguanidina por 24 horas em placas de cultivo celular de 96 cavidades em estufa umidificada, com 95% de ar e 5% de CO_2 a 37°C. Após o período de incubação, 10 μL de MTT na concentração de 5 mg/mL, foram adicionados aos poços e mantidas por mais 3 horas nas mesmas

condições em estufa umidificada. Após este período, foram acrescentados 50 µL de solução de dodecil sulfato de sódio 20% / HCl 0,01 N. As placas de cultivo celular foram mantidas por uma noite à temperatura ambiente, sob abrigo da luz. A avaliação da viabilidade celular foi medida em espectrofotômetro, utilizando filtro de interferência de 595 nm (Mosmann, 1983).

3.3. Medida da hipusinação nas células RAW 264.7 tratadas com GC7

As células RAW 264.7 foram cultivadas até atingir 70% de confluência, foi adicionada [^{3}H]-espermidina a 2 µCi/mL e, então, a cultura foi tratada com 1 mM de aminoguanidina + 100 µM de GC7, ou sem GC7, e incubadas por 24 horas. Após este período, as células foram coletadas e transferidas para tubos e centrifugadas a 1.000 rcf por 5 min a 4ºC. Os tubos foram colocados em gelo e as células foram lisadas por resuspensão em tampão de lise gelado (0,25 M EDTA, pH 8,0; 50 mM Tris-HCl, pH 7,9; 150 mM KCl; 0,1% Triton X-100; 10% de glicerol e coquetel de inibidores de protease) e vortexadas por 1 minuto. O lisado foi centrifugado a 20.000 rcf por 10 min a 4ºC. Em seguida, o sobrenadante foi cuidadosamente transferido para um novo tubo e a proteína total foi medida através do método de Bradford. Uma alíquota do extrato contendo 0,5 mg de proteína foi submetido a precipitação com 1 mL de ácido tricloroacético (15% m/v) contendo 1 mM de espermidina livre, incubado em gelo por 10 minutos e centrifugado a 20.000 rcf por 10 min a 4ºC. A etapa anterior foi repetida 3 vezes para remoção da espermidina radioativa não incorporada. O precipitado final foi ressuspendido em 100 µL de uma solução de NaOH 0,1 M e a radiação contada em cintilador (Beckman LS6500).

3.4. Ensaio de proliferação das células RAW 264.7

Foi utilizado o ensaio de proliferação com CFSE (CellTrace CFSE Cell Proliferation Kit – Life Technologies), partindo-se de $1x10^7$ de células RAW 264.7 plaqueadas, as quais foram incubadas por 2 horas para adesão na garrafa de cultura e, então, marcadas com 2 µM de CFSE (solução estoque de 5 mM diluída em PBS) por 15 minutos. Em seguida, as células foram coletadas da garrafa de cultura por raspagem, contadas e $1x10^5$ células foram distribuídas em placas de 6

poços. As células foram então tratadas com 50 μM e 150 μM de GC7 + 1 mM de aminoguanidina e, então, incubadas por 72 horas.

Após a incubação, as células foram coletadas, lavadas com PBS e fixadas com solução de 3,7% de formaldeído por 15 minutos à temperatura ambiente. Após a fixação, as céluas foram lavadas novamente com PBS e analisadas no citômetro de fluxo FACS Canto (BD Biosciences), com excitação no comprimento de onda de 488 nm e filtros de emissão apropriados para fluoresceína.

3.5. Curva de crescimento

A curva de crescimento obtida neste experimento é utilizada para avaliar as características de crscimento de linhagens celulares. A partir dela é possível determinar o tempo de dobramento, a densidade de saturação e o tempo da fase *Lag*. Para a realização do experimento, $5x10^4$ células da linhagem RAW 264.7 cultivadas em meio DMEM contendo 10% de soro fetal bovino foram plaqueadas em placas de 6 poços, suficientes para realização das contagens em triplicata para as condições experimentais (controle e tratadas com GC7), incubadas por duas horas a 37ºC em estufa com atmosfera de 5% de CO_2 para adesão das células na placa de cultivo.

O meio de cultura foi então trocado por novo meio DMEM contendo de 10% de soro fetal bovino adicionado de 1mM de aminoguanidina na condição controle e de 150 μM de GC7 + 1 mM de aminoguanidina na condição tratada. As placas foram incubadas por até 120 horas e cada ponto da curva foi coletado a cada 24 horas. O meio de cultura contendo os tratamentos foram trocados a cada 24 horas.

O procedimento de coleta consistiu em retirar o meio de cultura, lavar cada poço com 1 mL de PBS, adicionar 900 μL de PBS e suspender as células delicadamente utilizando um espalhador de células. As células em suspensão foram transferidas para microtubos contendo 100 μL de formaldeído 37%, atingindo 3,7% de concentração final, homogeneizadas gentilmente e incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida as células eram contadas imediatamente em hemocitômetro e os valores plotados em um gráfico. Alternativamente, as células fixadas podem ser mantidas a 4ºC por semanas.

3.6. Análise do ciclo celular por citometria de fluxo

A análise do ciclo celular das células RAW 264.7 foi realizada pela permeabilização e marcação das células com iodeto de propídeo (PI) e aferição do conteúdo de DNA marcado por citometria de fluxo, o que revela a porcentagem de células que estão em G1, S e G2/M.

No protocolo utilizado, $1x10^6$ células foram tratadas com GC7 nas concentrações de 50 e 150 µM e aminoguanidina 1 mM e incubadas por 16 horas. Em seguida, as células foram desafiadas com LPS (100 ng/mL) e incubadas por 4 h. As células foram então lavadas com PBS, coletadas por raspagem, fixadas com etanol 70% e mantidas em gelo por 2 horas. Em seguida as células foram marcadas com 1 mL de solução de PI (0,1% de Triton X-100, 10 µg/mL de PI e 100 µg/mL de RNase A livre de DNase) por 30 min à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Por fim a suspenão de células foi analisada no citômetro de fluxo FACS Canto (BD Biosciences).

3.7. Análise da indução de apoptose pelo tratamento com GC7 nas células RAW 264.7

Os ensaios de apoptose foram realizados utilizando o kit (FITC Anexin V Apoposis Detection kit I – BD Pharmigen) seguindo protocolo sugerido pelo fabricante. Sucintamente, após o tratamento das células RAW 264.7 com 50 e 150 µM de GC7 por aproximadamente 20 horas, as células aderidas forar lavadas 2 vezes com PBS gelado e ressuspendidas em tampão de ligação 1X (Hepes 0,01 M/NaOH pH 7,4; NaCl 140 mM; $CaCl_2$ 2,5 mM). 10^5 foram transferidas para tubos plásticos para citometria de fluxo. A cada tubo foi adicionado 5 µL de solução de Anexina FITC e os tubos incubados no gelo por 15 minutos. Em seguida foi adicionado 5 µL da solução de 7-AAD (7-aminoactinomicina D) e incubado por 5 minutos em gelo. Após a incubação, foi adicionado 400 µL de tampão de ligação e os tubos submetidos à análise no equipamento FACS Canto (BD Biosciences).

3.8. Avaliação da produção de TNF-α em cultura de células

A liberação de TNF-α e IL-6 foi avaliada em sobrenadantes de cultura de células RAW 264.7, empregando um ensaio imuno-enzimático (ELISA). A quantificação de TNF-α e IL-6 foi determinada utilizando anticorpo específico (purificado e biotinilado) e citocina padrão, de acordo com instruções do fabricante (R & D Systems, MN, e PharMingen, San Diego, CA). A densidade ótica das soluções foi avaliada em leitor de microplacas com filtro de 490 nm e a concentração das citocinas calculada a partir da curva padrão.

3.9. Análise da liberação de TNF-α *in vivo*

Para medir os níveis de TNF-α *in vivo* foi utilizada a mesma técnica descrita acima, utilizando como amostra o plasma de ratos Wistar, segundo as instruções do fabricante (R & D Systems, MN, e PharMingen, San Diego, CA – número de catálogo 558535).

Ratos Wistar pesando aproximadamente 250 g foram submetidos à cirurgia para canulação de artéria e veia femoral para possibilitar o acesso venoso facilitado e coleta de sangue pela artéria femoral. A cirurgia foi realizada com a utilização de uma combinação de cetamina (73 mg/kg) e xilazina (5,5mg/kg) como anestésicos administrados pela via intraperitoneal e em ambiente asséptico. No período de 24 horas após a cirurgia, os animais foram separados em 3 grupos distintos de 5 animais cada: grupo controle negativo (receberam a administração de 200 µL do veículo PBS por via intraperitoneal 1 h antes do início das coletas e 100 µL de PBS imediatamente após a primeira coleta, por via intravenosa); grupo controle positivo (administração de 200 µL do veículo PBS por via intraperitoneal 1 h antes do início das coletas e 100 µg/kg de LPS solubilizado em PBS imediatamente após a primeira coleta, por via intravenosa); e o grupo tratado (foi administrado o composto GC7 na dose de 40 µg/kg por via intraperitoneal 1 h antes da primeira coleta e 100 µg/kg de LPS solubilizado em PBS imediatamente após a primeira coleta como estímulo inflamatório, por via intravenosa). O presente projeto tem aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP – Araraquara (Parecer nº 22/2014 – em anexo).

Foram coletadas 6 alíquotas de sangue através da cânula arterial em intervalos de 1 h entre cada coleta, sendo que a primeira coleta (tempo 0) foi realizanda antes

do estímulo inflamatório com LPS. Após cada coleta, o plasma foi separado por centrifugação e armazenado a -20ºC para posterior avaliação da concentração de TNF-α, através de ELISA, como descrito no item anterior.

3.10. Obtenção de células da medula óssea de camundongos e diferenciação em macrófagos

Células da medula óssea dos fêmures e tíbias foram obtidas de camundongos C57Bl/6. Essas células foram lavadas, centrifugadas, contadas e 107 células foram cultivadas em placas de petri contendo DMEM (10% de SBF e gentamicina + piruvato + aminoácidos não essenciais) na presença de 20 ng/mL de M-CSF (Recombinant Murine M-CSF, Peprotech). Após 2 dias, 10 mL de DMEM contendo 20 ng/mL de M-CSF foram acrescentados à cultura. No 5º dia foram retirados 10 mL do meio de cultura e adicionados outros 10 mL de meio novo contendo 20 ng/mL de M-CSF. Ao final de 7 dias, período necessário para as células indiferenciadas da medula óssea se diferenciarem em macrófagos M0, o fenótipo de macrófagos M0 foi avaliado. Durante os experimentos, a mesma quantidade de células, 10^7/placa de petri, foi adicionada em todas as placas, visto que foi demonstrado que a quantidade de células da medula óssea incubadas por cm^2 pode influenciar no fenótipo da célula polarizada (Chan Mi Lee e Jim Hu, 2013).

3.10.1. Geração de macrófagos produtores de TNF-α e IL-6

Uma parte das células obtidas após 7 dias de diferenciação em macrófagos M0, $3x10^6$ células/poço, foram re-incubadas por 48 h na presença das condições polarizantes (500 ng/mL de LPS + 200 ng/mL de IFN-gama + 50 ng/mL de M-CSF) que promovem a diferenciação de macrófagos M0 em sua subpopulação M1, que é ativada para produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF-α e IL-6. Paralelamente, este protocolo foi realizado na presença de 150 µM de GC7 e 1 mM de aminoguanidina (AG).

3.10.3. Quantificação das citocinas

As citocinas TNF-α e IL-6 foram quantificadas do sobrenandante da cultura celular após as 48 h de tratamento com 150 µM de GC7 e condições que induzem a polarização para M1 através de ELISA, como descrito no item 3.8.

3.11. Análise proteômica

3.11.1. Obtenção do extrato proteico

As células RAW 264.7 cultivadas e tratadas como descrito no ítem 3.1, aderidas na garrafa de cultura foram lavadas com Tampão TBS pH 7,8 gelado e coletadas através de raspagem com auxílio de espalhadores de células. As células foram transferidas para tubos com fundo cônico e sedimentadas por centrifugação a 500 rcf por 5 minutos a 4ºC. O precipitado foi ressuspendido em 0,2 mL de tampão de lise (2 M tiourea, 7 M urea, 4% CHAPS, 0,5% Triton X-100, 1X PLAC, 20 mM PMSF, 2,5 mM de pirofosfato de sódio, 1 mM de ortovanadato de sódio) e lisado por 1 minuto de vórtex. O extrato foi clarificado por centrifugação a 20.000 rcf por 15 minutos a 4ºC. O extrato proteico total obtido foi quantificado pelo método de Bradford, utilizando o kit Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad).

3.11.2. Focalização isoelétrica das proteínas

Tiras de gradiente de pH 4-7 (IPG strip pH4-7 13 cm – GE Healthcare) foram hidradatadas com uma solução constituída de 300 µg de proteína total oriundo do extrato descrito no item anterior, 1,5% de tampão IPG (pH 4-7) e solução Destreak, completando o volume total de 0,25 mL. As tiras foram então incubadas em suporte adequado, protegidas da luz, calor e umidade, por 16-24 horas. Em seguida, as tiras foram submetidas ao processo de focalização isoelétrica, a fim de separar as proteínas na matriz de acordo com seus pontos isoelétricos. Para tanto, foi utilizado o aparelho Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare). Para tiras de 13 cm, foram usados os seguintes parâmetros para a focalização: *step* – 300 V por 12 horas; *grad* – 1.000 V até acumular 1.000 V/h; *grad* – 8.000 V até acumular 8.000 V/h; *step* – 8.000 V até acumular 20.000 V/h; *step* – 8.000 V por mais 4 horas, ou até acumular 36.000 a 40.000 V/h.

3.11.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida e análise dos spots de proteínas

Após a focalização das proteínas, as tiras de gradiente de pH foram tratadas com DTT (ditiotreitol 10 mg/mL em Tampão de Equilíbrio, constituído por 75 mM de Tris-HCl pH 8.8, 29,3% de glicerol, 6 M de uréia e 2% de SDS) e ioadacetamida (25 mg/mL em Tampão de Equilíbrio, adicionado de azul de bromofenol), por 20 minutos cada, à temperatura ambiente, para promover a redução e alquilação de grupamentos reativos, permitindo boa migração das proteínas e ausência de alguns artefatos. Após o tratamento, as tiras foram aplicadas em contato com gel de

poliacrilamida 12,5%, para realização da eletroforese em cuba SE600 (GE Healthcare), utilizando a amperagem de 15-20 mA por gel e potência e voltagem máximas, utilizando a fonte EPS601 (GE Healthcare). A eletroforese foi acompanhada até o corante atingir o limite inferior do gel (8-10 horas).

Após a eletroforese, os géis foram fixados e corados com Coomassie Blue G (Sigma) e descorados de acordo com o protocolo do fabricante. As imagens dos géis foram obtidas em um escâner Typhoon Trio (GE Healthcare). A quantificação dos *spots* de proteína e as análises comparativas foram realizadas utilizando o software ImageMaster 2D (Nonlinear Dynamics), de acordo com as instruções do fabricante. Os *spots* identificados como diferencialmente presentes entre as linhagens analisadas foram validados por teste *t* de Student, utilizando o programa ImageMaster 2D Platinum, e então recortados do gel com auxílio do aparelho Ettan Spot Picker (GE Healthcare).

3.11.4. Tratamento dos spots recortados do gel e identificação das proteínas por ESI Q-ToF

Os *spots* recortados do gel foram lavados quatro vezes com bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3) 50 mM em acetonitrila (ACN) 50%, para a remoção do SDS presente na amostra. Em seguida foram desidratados com adição de ACN 100% por 5 minutos. A ACN foi evaporada em evaporador e os *spots* foram submetidos a tratamento de redução e alquilação com adição de uma solução de DTT 10 mM e, em seguida, de iodacetamida 50 mM, com incubações de 30 minutos à temperatura ambiente. Ao fim do tratamento, foi adicionada aos *spots* uma solução de NH_4HCO_3 100 mM e foram incubados por 10 minutos. Os *spots* foram novamente desidratados com ACN 100% e os peptídeos hidrolisados pela adição de uma solução 20 ng/mL de tripsina *sequencing grade* (Promega) em solução de bicarbonato de amônio 50 mM, por 30 minutos em banho de gelo. O excesso de solução de tripsina foi removido e os *spots* incubados a 37ºC por 16 horas. A extração dos peptídeos do gel foi repetida duas vezes, com adição da solução de ácido fórmico 5% em ACN 50%. As frações foram unidas e concentradas em concentrador a vácuo até aproximadamente 1 µL. Por fim, o concentrado de peptídeos foi ressuspenso em 20 µL de ácido fórmico 5% para aplicação de todo o volume no espectrômetro de massas Q-ToF Premier – Micromass (Waters), utilizando a fonte de ionização ESI (electrospray ionization). As listas de m/z dos íons, geradas a partir dos espectros MS/MS, foram analisadas pelo programa MASCOT. Todo o protocolo de tratamento

dos *spots* e identificação de proteínas foi desenvolvido em nosso laboratório, utilizando protocolos estabelecidos pelo Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), vinculado ao Laboratório Nacional de Luz Sincontron (LNLS), onde realizamos a espectrometria de massas.

3.12. Perfil polissomal

Após tratamento com GC7 e estimulo com LPS (descritos no item 3.1), as garrafas de cultura celular foram tratadas com 100 µg/mL de ciclo-heximida por 10 minutos a 37ºC e, em seguida, acondicionadas em gelo. Em seguida, as células foram lavadas com 10 mL de PBS gelado contendo 100 µg/mL de ciclo-heximida. As células aderidas foram raspadas das garrafas com auxílio de espalhadores de células e transferidas para tubos de fundo cônico livres de RNase. As células foram sedimentadas por centrifugação a 2.000 rcf por 4 min a 4ºC. Os tubos foram imediatamente acondicionados em gelo e as células foram lisadas por ressuspensão em 0,5 mL de tampão de lise (50 mM NaCl,15 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris-HCl pH7,4, e 30 U/mL de inibidor de RNase RiboLock (Thermo Scientific) contendo 1% Triton X-100. O lisado foi clarificado por centrifugação a 20.000 rcf por 10 min a 4ºC e o sobrenadante teve sua absorbância a 260 nm medida. O sobrenadante foi colocado no topo de um gradiente de sacarose 7-47% ou 10-50% gelado, preparado em tampão de lise sem Triton X-100. Os tubos com o gradiente foram colocados em um rotor SW41Ti (Beckman) e centrifugado a 260.000 rcf por 3 h em uma ultracentrífuga Beckman. Os gradientes foram então fracionados deslocando-os para cima com uma solução de sacarose 60%, utilizando um fracionador de gradiente acoplado a um monitor de UV (Amersham Pharmacia Biotech) para a medida contínua da absorbância a 254 nm. As áreas dos picos de 80S (monossomos - M) e polissomos (P) foram quantificadas utilizando of software NIH Image J e comparadas entre si para calcular a relação P / M.

3.13. Extração de RNA a partir de gradientes de sacarose

Para estes procedimentos, os gradientes oriundos dos perfis polissomais a 4ºC foram separados em 14 frações de 600 µL. Para a extração de RNA, foi adicionado ao tubo contendo 600 µL do material fracionado, o mesmo volume da mistura fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), agitado vogorosamente por 30 segundos utilizando um vortex e centrifugado a 4ºC por 5 minutos a 14.000 x*g*. O sobrenadante foi transferido cuidadosamente para um novo tubo contendo 20 µL de

acetato de sódio 3 M pH 5,2, misturado e foi adicionado 1,1 mL de etanol 100%. Os tubos foram então incubados por 3 h a -20ºC. Após a incubação, os tubos foram centrifugados a 14.000 rcf por 30 minutos a 4ºC, descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70% gelado, utilizando o vortex para agitação vigorosa. Os tubos foram novamente centrifugados a 14.000 rcf por 20 minutos a 4ºC e o sobrenadante descartado. Os precipitados de RNA foram secados e ressuspendidos em 20 µL de água milli-Q estéril. O RNA foi quantificado por espectrofotometria de UV a 260 nm utilizando o equipamento Nanodrop® 2000 (Thermo Scientific). Para a avaliação da qualidade dos RNAs, verificou-se a relação entre as absorbâncias em 260 e 280 nm, sendo aceito como adequados valores entre 1,8 e 2,1, e a técnica de eletroforese em gel de agarose 1,2%, contendo formamida e brometo de etídeo, de acordo com o descrito em Masek *et al*, 2004.

Os RNAs oriundos das frações foram reunidos em "pools" referentes às frações ribossomais leves (40S, 60S e 80S) e polissomos e, então, realizada a transcrição reversa (como descrito em 3.12) para a avaliação dos níveis de mRNA de TNF-α e outros marcadores inflamatórios por qRT-PCR.

3.14. Extração do RNA total celular e transcrição reversa

O RNA total das células RAW 264.7 foi isolado utilizando a técnica de purificação por coluna de troca iônica, seguindo protocolo do fabricante (RNeasy Mini Kit, Cat. No. 74104, Qiagen Inc., Valencia, CA). Após a extração, as amostras de RNA de células não tratadas e tratadas com GC7, ambas desafiadas com LPS, foram quantificadas por espectrofotometria UV em NanoDrop ND-2000 (Thermo Electron North Marica, LLC) e foi avaliada a qualidade do RNA como descrito acima.

O RNA isolado (5 µg) foi submetido à reação de transcrição reversa, utilizando-se High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Cat. No. 4368813, Applied Biosystems, Foster City, CA).

3.15. Análise relativa dos níveis de mRNA por PCR em tempo real (qRT-PCR)

3.15.1. Desenho e otimização dos oligonucleotídeos

Para o ensaio de expressão gênica relativa por qRT-PCR, além do estudo dos genes de interesse, é necessária a escolha de genes de referência.

Para o desenho dos oligonucleotídeos, utilizou-se o software on line Primer3 (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi), considerando os

seguintes parâmetros:

- tamanho do amplificado (*amplicon*): entre 80 a 150 pares de base
- tamanho dos oligonucleotídeos: entre 19 a 21 bases
- conteúdo GC: entre 50% e 60%
- temperatura de hibridização: entre 59°C a 61°C

Ao todo, foram desenhados pares de oligonucleotídeos para 4 genes de estudo e utilizadas as sequências que estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para o estudo de expressão gênica relativa por meio de qPCR em células RAW264.7 tratadas com GC7.

Gene	Classe	Oligonucleotídeo F (5'-3')	Oligonucleotídeo R (5'-3')
Gapdh	Controle endógeno	CAGCAAGGACACTGAGCAAG	CTGGGATGGAAATTGTGAGG
Il1b	Alvo	TGAAGCAGCTATGGCAACTG	GGTCAAAGGTTTGGAAGCAG
Nos2	Alvo	AGCTCATCTTTGCCACCAAG	TACAGTTCCGAGCGTCAAAG
Ptgs2	Alvo	ATCCTGAGTGGGGTGATGAG	AAGTGGTAACCGCTCAGGTG
eIF5A	Alvo	GCCATGCCAAGGTCCATCTG	CATTCCGTTTGATGTTGGGGAC

As reações de PCR quantitativa foram realizadas utilizando-se o agente intercalante Sybr Green (Power SYBR Green PCR Master Mix, Cat. No. 4367659, Applied Biosystems, Foster City, CA) em um equipamento Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System. Todas as reações foram realizadas de acordo com as seguintes condições, sempre em triplicatas experimentais:

- 10 µL de Sybr Green Master Mix.
- 1 µL de cDNA.
- 9 µL de solução dos pares dos oligonucleotídeos.

Condições de temperatura:

Ciclos	Tempo	Temperatura
1	2 min	50ºC
1	10 min	95ºC
40	15 s	95ºC

1 min 60ºC*

* leitura da fluorescência

Foram realizados ensaios de otimização da concentração dos pares de oligonucleotídeos e observação de amplificação específica. Nesta etapa do experimento, foi utilizada uma solução de cDNA contendo alíquotas das duas situações amostrais (não tratado e tratado), na concentração final de 10 ng/µL em 20 µL de reação final. Nesta etapa, além das condições de ciclagem de temperatura descritas acima, foi adicionada uma fase de dissociação: 15 s a 95ºC, 1min a 60ºC e 15 s a 95ºC, com emissão de fluorescência durante toda a fase.

Foram testadas as concentrações de 0,25 µM, 0,40 µM, 0,50 µM e 0,70 µM dos pares de oligonucleotídeos de todos os genes estudados (alvos e controle endógeno). Neste teste, observou-se a amplificação dos fragmentos de interesse, bem como a curva de dissociação, escolhendo a concentração de pares de oligos que resultavam em uma curva de amplificação de menor Ct e com curva de dissociação única.

3.15.2. Avaliação da eficiência das reações de qRT-PCR

Para a validação das reações de qRT-PCR, foram utilizadas cinco diferentes diluições seriadas de cDNA, partindo-se da concentração inicial de 100 ng/µL. Nesta fase do experimento, a concentração dos pares de oligos na reação foi constante.

Foram considerados validados os pares de oligonucleotídeos mostrando uma curva padrão (Ct x Quantidade de cDNA inicial) com *slope* entre -3,0 e -3,6, resultando em eficiências de reação entre 90% e 110% e R^2 acima de 90%.

3.15.3. qRT-PCR utilizando TaqMan Array (Applied Biosystems)

Um grupo de 92 genes selecionados por seu envolvimento na resposta imune e 4 possíveis controles endógenos foram adquiridos em placas de 96 poços (TaqMan Array Immune Response – número de catálogo 4414210 - Applied Biosystems). Os procedimentos de preparo, termociclagem e leitura das placas foram realizadas de acordo com protocolo do fabricante. Os dados obtidos foram analisados baseando-se no método de $\Delta\Delta$CT (Livak e Schmittgen, 2001), utilizando a média geométrica dos genes de referência Gusb e Hprt1 como controle endógeno.

3.15.4. qRT-PCR utilizando RT^2 Profiler PCR Array Mouse Cell Cycle (QIAGEN)

As placas RT^2 Profiler PCR Array Mouse Cell Cycle (PAMM-020Z – QIAGEN) apresentam um painel de 84 genes envolvidos nas diferentes fases do ciclo celular e 5 genes candidatos a controles endógenos, além de poços com controles da eficiência da transcrição reversa, contaminação por DNA genômico e controles positivos da reação. Todos os oligos presentes na placa foram previamente validados pelo fabricante. Os procedimentos de preparo, termociclagem e leitura das placas foram realizadas de acordo com protocolo do fabricante. Os dados obtidos foram analisados baseando no método de $\Delta\Delta$CT (Livak e Schmittgen, 2001), utilizando a média geométrica entre as replicatas do gene de referência B2m (Beta-2 microglobulina) como controle endógeno.

3.16. Ensaio de western blot

Para a determinação da concentração proteica de extratos celulares e de proteínas purificadas foi utilizado o kit "BioRad Protein Assay" (BioRad), baseado no método de Bradford.

Um total de 20 µg do extrato total de proteínas foi submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida descontínuo (SDS-PAGE). O gel de empacotamento contém acrilamida:bis-acrilamida (29:1) 5%; Tris-HCl 380 mM pH6,8; SDS 0,1%; persulfato de amônio 0,1%; 1 µL/mL de TEMED e o gel de separação acrilamida:bis-acrilamida (29:1) 12%; Tris-HCl 380 mM pH8,8; SDS 0,1%; persulfato de amônio 0,1%; 0,4 µL/mL de TEMED. As amostras em tampão de amostra para proteína (Tris-HCl 40 mM pH6,8; glicerol 8%; SDS 2%; DTT 100 mM; azul de bromofenol 0,1%) foram incubadas a 96ºC por 5 minutos e aplicadas no gel. O gel foi submetido a voltagem de 150 V em tampão de corrida (Tris-HCl 25 mM; glicina 250 mM; SDS 0,1%).

Após separação por SDS-PAGE, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Hybond-ECL GE Healthcare) por 1 h a 100 V em tampão de transferência (Tris-HCl 12 mM; glicina 125 mM), utilizando um sistema de transferência Mini Protean 3 (BioRad). A transferência foi avaliada por coloração com Ponceau S (Pounceau S 1 mg/mL; ácido acético 5%) e a membrana foi bloqueada pela incubação com tampão PBST (PBS pH7,4; 0,25% Tween-20) contendo 5% de leite desnatado a temperatura ambiente por ao menos 30 minutos. Após bloqueio, a membrana foi incubada em PBST contendo 5% de leite desnatado e o anticorpo primário de interesse por 2 h à temperatura ambiente sob agitação

branda. Posteriormente, a membrana foi lavada três vezes por 5 minutos com PBST e incubada por 1 h com anti-IgG de de coelho conjugado com peroxidase (Sigma), na diluição de 1:5.000 em PBST contendo 5% de leite desnatado. Após três lavagens de 5 minutos com PBST, a membrana foi tratada com reagentes quimioluminescentes (ECL-GE Healthcare) e utilizada na exposição de filme autorradiográfico. Os anticorpos primários aqui utilizados são: anti-eIF5A (1:10.000), anti-TNF-α (1:2.000), anti-Actina (1:2.000) e anti-E2F1 (1:1000).

3.17. Novos inibidores da enzima Desoxi-hipusina sintase: triagem e ensaio de atividade *in vitro*

Um recente trabalho em nosso laboratório buscou novos compostos inibidores da enzima desoxi-hipusina sintase de humano (DHPS) através de ensaios *in silico* utilizando a estrutura cristalográfica descrita como um complexo ternário DHPS-NAD-GC7 com 3 Å de resolução (PDB 1RQD - Umland *et al.,* 2004) e uma subcoleção de moléculas guanidínicas depositadas no banco de dados ZINC (Ana Paula Biazotto - dissertação de mestrado). Esta busca resultou na seleção final de 10 compostos, dos quais 7 deles puderam ser adquiridos comercialmente e testados para a determinação da capacidade de inibição de DHPS *in vitro*. Além dos compostos obtidos através da triagem virtual, vários outros compostos sintetizados e cedidos por colaborações foram testados em ensaio *in vitro*.

O ensaio de atividade *in vitro* da enzima desoxi-hipusina sintase foi padronizado e validado utilizando a enzima DHPS e a proteína eIF5A-1 de humano recombinantes, produzidas e purificadas em nosso laboratório. A atividade enzimática foi monitorada através de ensaio espectrofluorimétrico em que se detectou a intensidade de fluorescência de NADH, conforme a sua produção na primeira etapa da reação mediada pela enzima DHPS (Figura 4). O ensaio contendo o composto candidato a inibidor foi submetido a excitação com luz ultravioleta no filtro λ=340/360nm e a fluorescência emitida foi detectada pelo filtro λ=440/460nm, medida em RFU (*relative fluorescence units*).

Todas as reações ocorreram em triplicata, em placas de 96 poços opacas de poliestireno, a 37°C. O meio reacional foi composto de 0,2 M tampão glicina/NaOH pH 9,2, 10 μM de espermidina, 200 μM de NAD^+, 200 nM de DHPS, 2 μM de eIF5A, água deionizada e inibidor diluído em DMSO. O volume final de reação foi de 200 μL. Utilizou-se DMSO 10% como controle negativo e 1 μM de GC7 como controle

positivo de inibição. O experimento ocorreu em duas etapas: triagem e variação das concentrações dos compostos que apresentaram atividade inibitória.

No processo de triagem, parte da reação (tampão, NAD^+, DHPS, 500 µM do inibidor e H_2O) foi preparada em placa. Após 1 min de incubação da molécula supostamente inibidora com a enzima na reação descrita acima, foi adicionado o restante da reação, compreendendo a mistura de espermidina e eIF5A. Após 3 segundos de agitação, iniciou-se a leitura da fluorescência do NADH presente. A duração do ensaio foi de 90 s e os resultados da fluorescência detectada foram armazenados em planilha do Excel.

Os dados de RFU foram normalizados e a atividade inibitória das moléculas foi calculada de acordo com a fórmula:

$$\%\ Inibi \quad o = \left(1 - \frac{V_i}{V_0}\right) \times\ 100$$

em que V_i e V_0 são as velocidades iniciais na presença e na ausência do inibidor, respectivamente.

Os inibidores que apresentaram porcentagem de inibição maior que 30% foram testados novamente em diversas concentrações (entre 6 e 7), a fim de se calcular a concentração do composto capaz de inibir 50% da enzima DHPS (IC_{50}). Para tanto, foi utilizado o programa SigmaPlot, segundo a fórmula:

$$V = \frac{V_{max} \cdot [S]}{IC_{50} + [S]}$$

em que V e V_{max} correspondem, respectivamente, a velocidade e velocidade máxima da reação, $[S]$ corresponde à concentração do substrato e IC_{50} corresponde à concentração de inibidor responsável pela diminuição de metade da velocidade de reação.

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

A validação do ensaio de atividade de DHPS por detecção da fluorescência foi realizada com o inibidor GC7, pois a inibição competitiva e a afinidade do inibidor (demonstrada pelos parâmetros IC_{50}= 17 nM e K_i= 9,7 nM) estão bem estabelecidos (Jakus *et al.*, 1993).

Deste modo, o ensaio foi realizado utilizando diferentes concentrações de GC7 e espermidina para calcular o gráfico duplo-recíproco (Lineweaver-Burk), em que o resultado correspondente a uma determinada concentração do inibidor é

disposto em gráfico de maneira linear, com a velocidade de reação $(1/V)$ em função da concentração do substrato $\left(1/[S]\right)$, como mostra o gráfico abaixo.

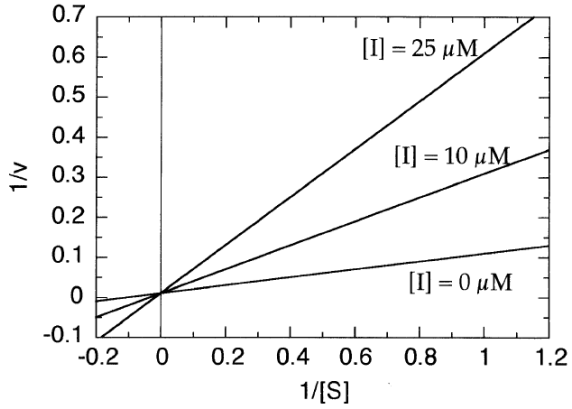


Figura 5. Exemplo do gráfico duplo-recíproco característico de inibição competitiva

Foram feitas reações em triplicata com cinco concentrações de espermidina (20 μM; 10 μM; 8,2 μM; 5 μM e 1 μM) para cada concentração de inibidor (0 μM; 0,15 μM; 0,3 μM e 0,5 μM). As condições foram as mesmas utilizadas no ensaio padronizado descrito acima.

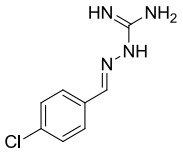
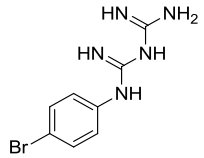
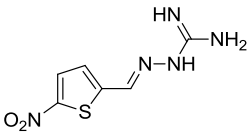
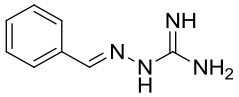
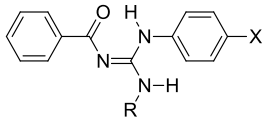
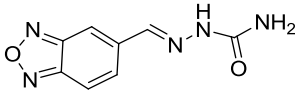
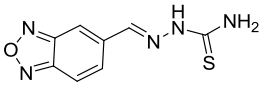
Os dados de RFU foram normalizados e a atividade inibitória do GC7 foi calculada de acordo com a fórmula:

$$\frac{1}{v} = \left(\frac{K_m}{V_{max}}\frac{1}{[S]}\right) + \frac{1}{V_{max}}$$

De todos os compostos avaliados pelo ensaio de atividade enzimática de DHPS *in vitro*, os compostos com melhores porcentagens de inibição e IC_{50} foram selecionados para ensaios biológicos *in vitro*: compostos oriundos da triagem virtual ZINC47607 e ZINC73406, nomeados aqui de Z3 e Z6, respectivamente; a benzoilguaninina aqui nomeada BZ7, sintetizadas e cedidas pelo Prof. Dr. Eduardo René Perez Gonzalez, do Laboratório de Química Orgânica Fina da Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Campus de Presidente; compostos guanidínicos NSN e MI9 cedidos pelo Prof. Dr. Gustavo Trossini, do Laboratório de Química Farmacêutica da Universidade de São Paulo (FCF-USP); e moléculas guanidínicas contendo subunidade benzofuroxana, aqui denominadas J5 e J6. A Tabela 2

apresenta as estruturas químicas e os resultados de inibição e IC_{50} determinados no ensaio *in vitro.*

Tabela 2. Compostos testados no ensaio de atividade *in vitro* da enzima desoxi-hipusina sintase (DHPS) que apresentaram maior porcentagem de inibição.

Nome	**Estrutura**	**% Inibição (500 µM)**	**IC_{50} (µM)**
ZINC47607(Z3)		47,5	105 ± 14
ZINC73406 (Z6)		42,5	286 ± 81
NSN		79	40 ± 4
MI-9		32	175 ± 30
BZ 7	 **R**= C_4H_{11} **X**= NO_2	83	111 ± 23
J5		88,8	26 ± 2
J6		88,6	78 ±17

4. Resultados e discussão

4.1. GC7 reduz a formação de hipusina em eIF5A em células RAW 264.7

Na inflamação crônica, macrófagos e células T são importantes fontes de mediadores inflamatórios, tais como TNF-α, IL-1α, IL-1β e IL-6 (Strand, Kimberly e Isaacs, 2007). Para estudar a inibição direta da eIF5A em macrófagos, decidimos utilizar a linhagem celular de macrófagos de camundongo RAW 264.7 e o inibidor de desoxi-hipusina sintase GC7, para determinar os efeitos desse tratamento na fisiologia celular global e da produção de citocinas pró-inflamatórias.

Primeiramente, confirmamos que GC7 diminui significativamente a formação de eIF5A hipusinada nas células RAW 264.7, medindo a incorporação de [^{3}H]-espermidina. Como mostrado na Figura 6, o tratamento com 100 μM de GC7 por 24 h resultou em uma significante redução da formação de eIF5A hipusinada. Apesar de efetiva, esta redução observada com 24 h de incubação é menor do que o demonstrado em outras linhagens celulares, como em células de insulinoma INS-1. Isto pode indicar que a meia-vida de eIF5A nas células RAW 264.7 deve ser mais longa que o descrito para as células de insulinoma INS-1, que foi de 4 a 6 horas (Maier, Tersey e Mirmira, 2010). No entanto, outros estudos reportaram uma longa meia vida de eIF5A em células CHO (*Chinese hamster ovary cells*), como sendo maior que 72 h (Torrelio, Paz e Gallop, 1987; Bergeron *et al.*, 1998). Tais relatos mostram que a elevada estabilidade de eIF5A é a principal razão para que os efeitos de análogos de poliaminas apresentem efeitos mais acentuados na inibição da formação de hipusina com maiores tempos de tratamento (Bergeron *et al*., 1998). Em linhagem celular de carcinoma mamário murino (FM3A cells), a determinação da estabilidade de eIF5A hipusinada revelou uma meia vida superior a 7 dias, a qual parece ser a principal razão dos fracos efeitos de GC7 sobre o crescimento desta linhagem (Nishimura *et al.*, 2005).

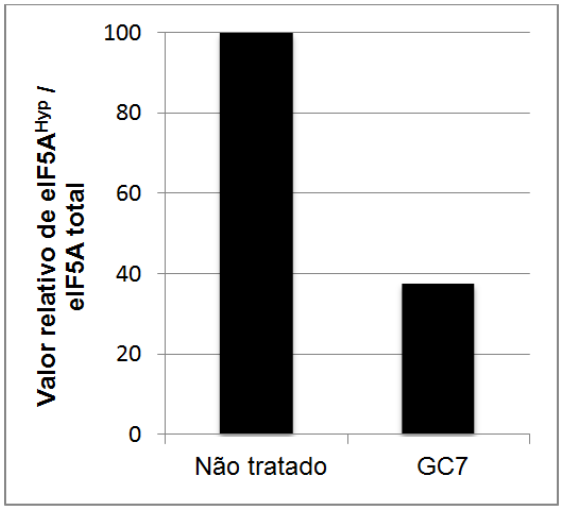


Figura 6. Detecção de eIF5A hipusinada em células RAW 264.7. Amostras de extrato proteico total de células RAW264.7 não tratadas e tratadas com GC7, cultivadas na presença de 2 µCi/mL de [^{3}H]-espermidina (espermidina radioativa), foram precipitadas e lavadas com TCA 10% e a radiação emitida pela espermidina radioativa incorporada foi medida em cintilador. A contagem da radiação foi normalizada relativamente ao conteúdo de eIF5A total na células medido por western-blot (dados não mostrados).

4.2. O tratamento com GC7 não compromete a viabilidade das células RAW 264.7

Avaliamos a viabilidade celular das células RAW 264.7 tratadas com diferentes concentrações de GC7 e desafiados com LPS através do ensaio de MTT, o qual avalia a viabilidade celular medindo-se a atividade de óxido-redutases mitocondriais. Os dados mostram que o GC7 não interfere na viabilidade celular desta linhagem durante o período de tratamento, pois, mesmo na concentração de 150 µM, nenhuma citotoxicidade significativa foi observada (Figura 7A).

Também foi avaliada a viabilidade dos macrófagos RAW 264.7 mediante ao tratamento com GC7 por período de 72 horas, porém, sem a adição de LPS, uma vez que nos experimentos de proliferação celular, as células são expostas a tempos de tratamento de 72 horas sem LPS. Dessa forma, foi necessário determinar a viabilidade celular nestes períodos para podermos descartar que os efeitos observados na inibição da proliferação são artefatos oriundos de algum possível impacto na viabilidade. As células RAW 264.7 foram cultivadas e tratadas com diferentes concentrações de GC7 e 1 mM de aminoguanidina, utilizado como inibidor de amino-oxidases para evitar a degradação de GC7, por um período de 72 horas

em placas de 96 poços, efetuando-se a troca do meio de cultura a cada 24 horas. Após o tratamento, foi realizado o ensaio de MTT, que não revelou grande impacto sobre a viabilidade celular após 72 horas (Figura 7B).

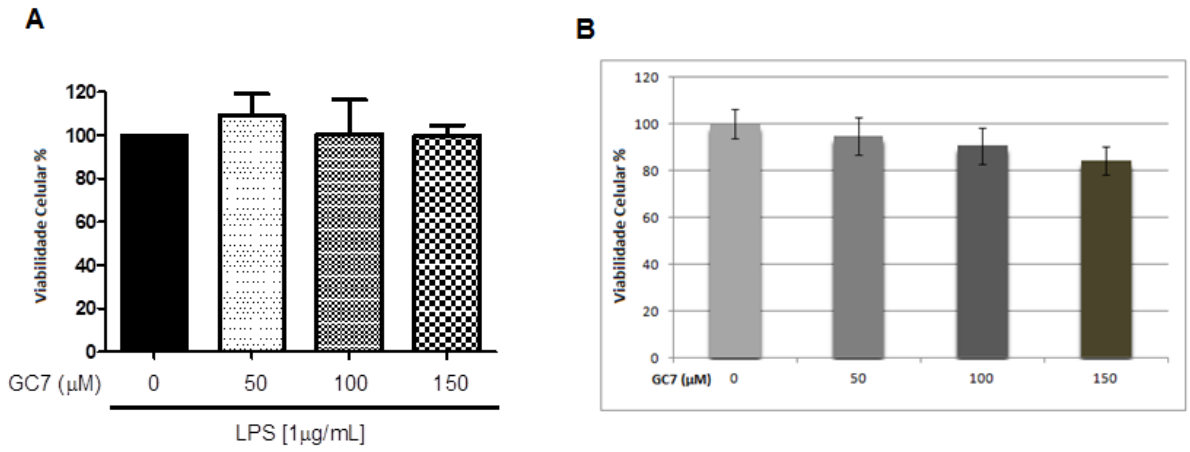


Figura 7. Viabilidade celular frente ao tratamento com GC7. A) Porcentagem das células viáveis após tratamento de 16 h com diferentes concentrações de GC7 (50, 100 e 150 μM), seguindo-se desafio com LPS (1 μg/mL) por 4 h. **B)** Porcentagem das células viáveis após tratamento de 72 h com diferentes concentrações de GC7 (50, 100 e 150 μM) sem adição de LPS.

O ensaio de MTT é amplamente utilizado para testar a citotoxicidade de muitos compostos e outros agentes biológicos em muitas linhagens celulares, inclusive em macrófagos. Já foi relatado que em células RAW 264.7, a ativação por LPS gera alterações na detecção entre os testes de MTT e Sytox Green. O Sytox Green é utilizado como marcador de ácidos nucleicos. Foi demonstrado que o MTT superestimou os valores de viabilidade celular nos macrófagos ativados por LPS, o que foi atribuído a alterações no metabolismo e expressão de enzimas envolvidas na expressão de citocinas inflamatórias, como iNOS (Pozzolini *et al.*, 2003). Dessa forma, diante da possibilidade de o tratamento com LPS ter superestimado a verificação de viabilidade frente a GC7, a realização deste ensaio sem LPS aumenta a segurança do resultado.

4.3. Efeito de GC7 sobre o proteoma de células RAW 264.7

Para avaliar os efeitos de GC7 na fisiologia celular global, analisamos as diferenças no perfil proteômico de células tratadas e não tratadas com GC7. Para

avaliar estas diferenças de maneira qualitativa e quantitativa, foi realizada uma análise proteômica a partir de gel bidimensional (2D-PAGE).

A mesma quantidade de extrato proteico total de células RAW 264.7 foi preparado em triplicata para o grupo controle (não tratado) e para células tratadas com GC7. Após realizado o 2D-PAGE em triplicatas experimentais, as imagens dos géis foram analisadas, revelando a presença de 103 *spots* de proteínas diferencialmente presentes entre as amostras não tratadas e tratadas, após validação estatística ($p \leq 0,05$, determinado pelo teste *t* de *Student*) (Figura 8). Os *spots* foram então selecionados de géis preparativos e as proteínas foram identificadas por MS/MS (Espectrometria de massas em tandem). Como exemplo, é mostrada na Figura 9 uma ampliação do par de *spots* da proteína Lcp1 e um gráfico revelando um aumento desta proteína nas células tratadas comparadas com as células não tratadas.

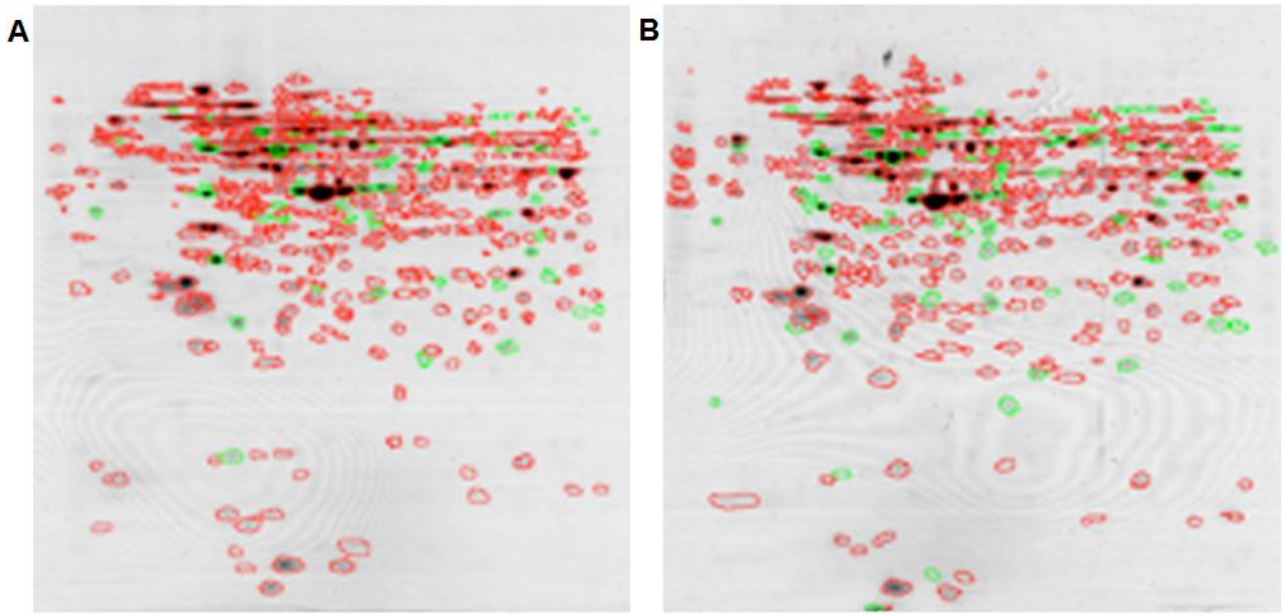


Figura 8. Análise proteômica de células RAW 264.7 não tratadas (A) e tratadas (B) com GC7. Imagens de géis bidimensionais de proteínas totais de células RAW 264.7 não tratadas e tratadas com GC7 coradas com coomassie coloidal. Os extratos totais de ambos os grupos foram submetidos a focalização isoelétrica, utilizando Immobiline DryStrip pH 4-7 (linear – 13 cm). Subsequentemente, as strips foram aplicadas em gel de poliacrilamida 12,5% e submetido a eletroforese. As análises comparativas entre A e B permitiu a identificação de aproximadamente 600 *spots*, dos quais 103 *spots* (destacados em verde) apresentaram-se diferencialmente expressos (Student's t-test, $P < 0.05$).

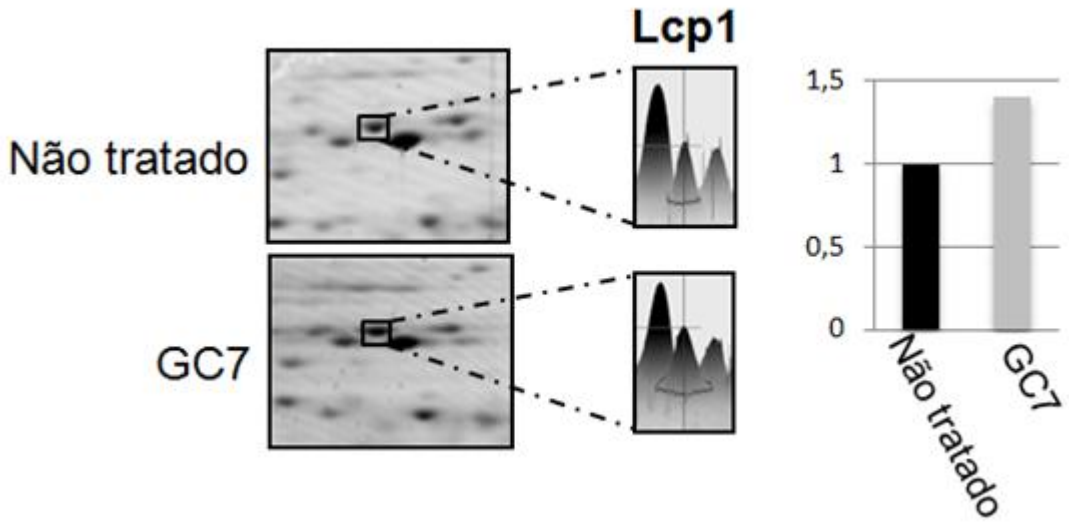


Figura 9. Análise de 2D-PAGE. Visão ampliada de um *spot* proteico, incluindo uma representação quantitativa tridimensional obtida dos géis 2D de células não tratadas e tratadas com GC7. O *fold-change* é mostrado em relação com o grupo não tratado.

A correlação funcional entre as proteínas identificadas foi obtida por análise de ontologia genética (GOA - http://omicslab.genetics.ac.cn/GOEAST/index.php). Os resultados de GOA revelaram 13 proteínas significativamente correlacionadas em termos de ontologia genética, como: processo metabólico (26%), metabolismo de proteínas (17%), resposta a estresse (15%), entre outros, como mostrado na Figura 10.

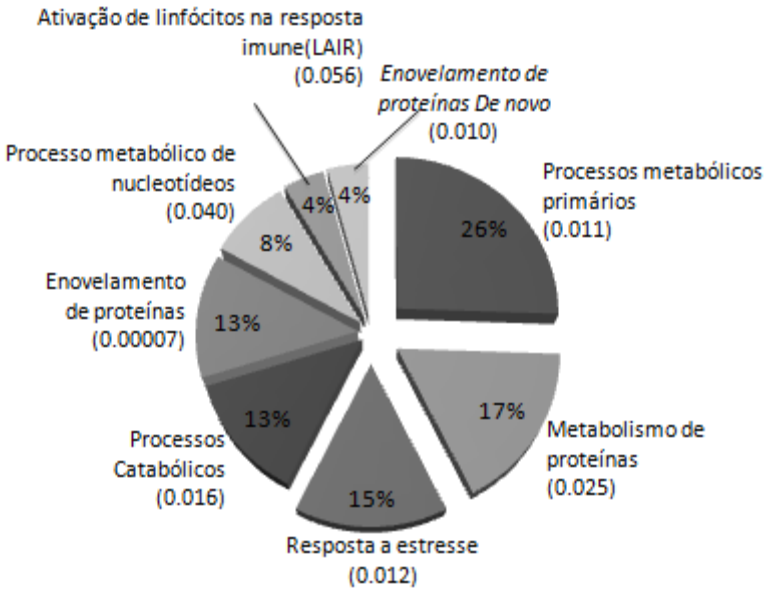


Figura 10. Distribuição percentual das relações funcionais das proteínas identificadas como diferencialmente presentes nas células não tratadas e tratadas com GC7. As proteínas foram representadas no gráfico de acordo com sua classificação por função celular de maneira relativa ao número total de proteínas identificadas como diferencialmente presentes. O número do valor de *p* da análise estatística está indicado entre parênteses

A Figura 11 mostra as proteínas diferencialmente presentes de acordo com sua classificação em termos de GO. Os resultados não mostram nenhuma perturbação direta do tratamento com GC7 com uma via específica na linhagem celular RAW 264.7. Ao contrário, a maioria das proteínas identificadas são envolvidas no metabolismo geral e resposta geral a diferentes tipos de estresse. A partir desta análise, é possível concluir que, apesar do tratamento com GC7 causar algumas alterações em níveis proteicos, GC7 não afeta vias específicas nas células RAW264.7 e não desempenha nenhum efeito fisiológico deletério importante em macrófagos.

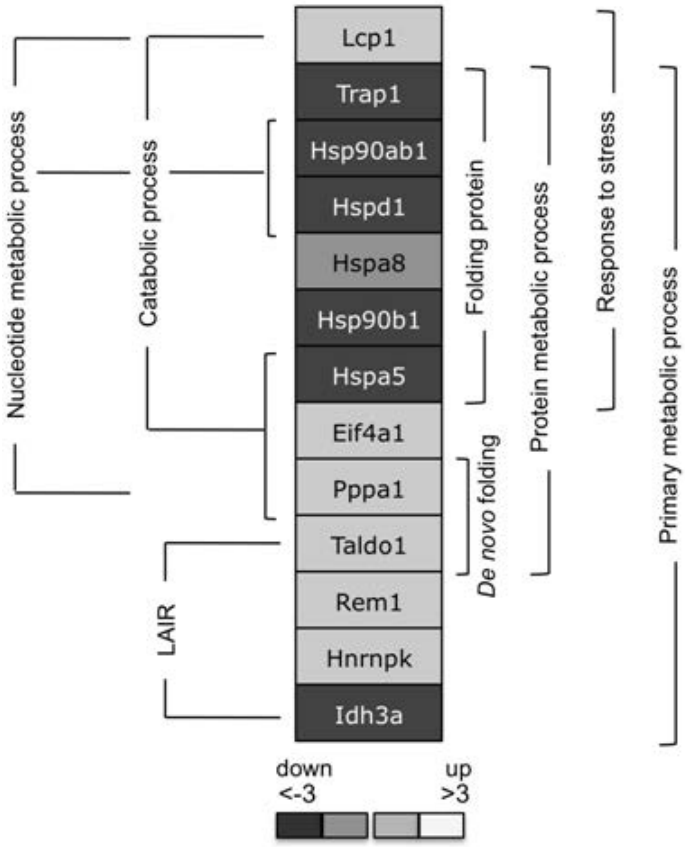


Figura 11. **Análise proteômica.** As proteínas diferencialmente presentes identificadas neste experimento foram classificadas de acordo com sua função celular utilizando a ferramenta GOA. A escala de cinza indica o *fold-change* das proteínas.

4.4. GC7 inibe a liberação de TNF-α por células RAW 264.7

Para avaliar se GC7 reproduz os efeitos anti-inflamatórios de eIF5A-siRNA observados após a administração de LPS em modelo animal (Moore *et al.*, 2008), analisamos a liberação de TNF-α de células RAW 264.7 após desafio com 1 µg/mL de LPS, pelo ensaio de ELISA, utilizando como amostra o sobrenadante de cultura celular não tratadas e tratadas com diferentes concentrações de GC7 (50, 100 e 150 µM). Como podemos observar na Figura 12, todas as concentrações de GC7 testadas geraram significantes reduções na liberação de TNF-α, após estímulo com LPS, por estes macrófagos. Estes resultados demonstram que GC7 é capaz de induzir uma redução nos níveis da citocina pró-inflamatória TNF-α em macrófagos, similar aos resultados observados com a administração de eIF5A-siRNA em modelo murino de sepse severa e injúria pulmonar aguda (Moore *et al.*, 2008).

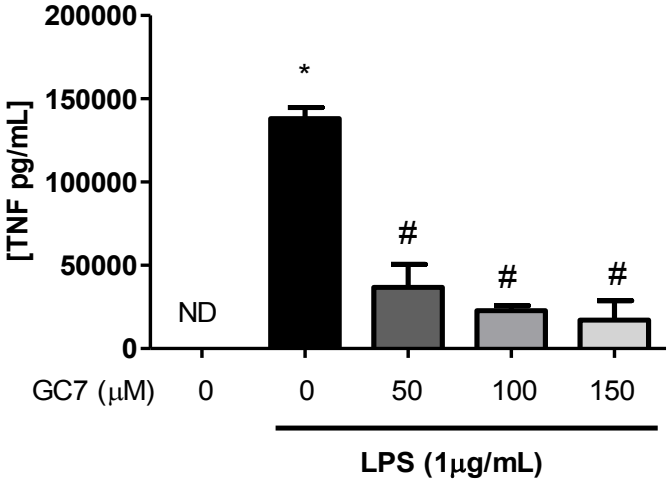


Figura 12. Avaliação da liberação de TNF-α em células RAW 264.7. Efeito do tratamento com diferentes concentrações de GC7 por 16 h, seguido de estímulo com LPS por 4 h sobre a liberação de TNF-α. O gráfico mostra os níveis de liberação de TNF-α pelas células RAW264.7 sem nenhum estímulo com LPS (ND – não detectado); após ativação com 1μg/mL de LPS (barra preta) e após tratamento com 50, 100 e 150 μM de GC7 (barras cinzas). O gráfico mostra a média e o desvio padrão de três experimentos independentes ($p<0,05$).

Para melhor analisar o efeito de diminuição de TNF-α liberado no sobrenadante da cultura celular, buscamos diferenciar se ocorre bloqueio na secreção ou na tradução do mRNA desta citocina. Para isso, foi realizado western blot com o com o extrato total de células RAW 264.7 tratatas com GC7 e desafiadas com LPS (100 ng/mL). Os resultados mostram uma redução nos níveis totais da forma associada à célula, transmembrana, de TNF-α, de 26 kDa, o que sugere que a tradução do mRNA de TNF-α é reduzido frente ao tratamento com GC7 (Figura 13). Se o defeito ocasionado por GC7 fosse na liberação, ou seja, pós-tradução de TNF-α, esperaríamos ver um acúmulo desta citocina de maneira associada às células, como acontece na inibição de TACE (ADAM17), enzima responsável pela liberação de TNF-α solúvel (17 kDa) da superfície celular por clivagem do domínio transmembrana (Zhang *et al.*, 2000).

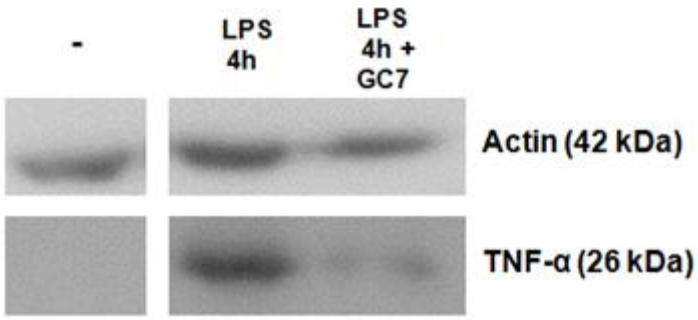


Figura 13. Análise dos níveis da forma transmembrana de TNF-α. Western-blot de TNF-α a partir de extrato celular total de células RAW264.7 após 16 horas de tratamento com GC7 e 4 horas de LPS. O controle negativo (-) foi realizado com extrato de células RAW264.7 não tratadas com LPS ou GC7.

4.5. GC7 reduz os níveis de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos primários diferenciados *in vitro*

No intuito de confirmar se os resultados de redução na produção e liberação de TNF-α na linhagem RAW 264.7 pelo tratamento com GC7 se reproduzem em macrófagos não imortalizados, repetimos essa análise em macrófagos derivados da medula óssea de camundongos C57BL/6. Após a diferenciação das células obtidas de fêmur e tíbia de camundongos em macrófagos pelo tratamento com M-CFS, estas células foram plaqueadas e incubadas na presença de IFN-γ e LPS por 48 h para gerar macrófagos com fenótipo M1, capazes de produzir citocinas pró-inflamatórias como TNF-α e IL-6. Para avaliar o impacto de GC7 sobre a liberação dessas citocinas nestas condições, 150 μM de GC7 e 1 mM de aminoguanidina (AG) foi adicionado durante as 48 horas de incubação com LPS e IFN-γ e, então, o sobrenadante da cultura celular foi coletado e as citocinas TNF-α e IL-6 foram quantificadas por ELISA.

Os resultados apresentados na Figura 14 mostram que o tratamento com GC7 gerou diminuição na liberação de TNF-α e IL-6 em comparação às células não tratadas com GC7, corroborando com os dados obtidos em macrófagos RAW 264.7 tratados com GC7 e com a observação *in vivo* de uma acentuada redução nos níveis séricos de TNF-α e IL-6 frente à administração de eIF5A siRNA (Moore *et al.*, 2008). Além disso, estes resultados estão de acordo com o observado anteriormente em outro estudo que mostra que as células RAW 264.7 respondem similarmente a macrófagos primários derivados da medula óssea frente ao LPS. No entanto, sempre é necessário cuidado ao extrapolar resultados obtidos com células RAW

264.7 para culturas primárias de macrófagos, principalmente porque o fenótipo e funções podem alterar-se com o cultivo contínuo desta linhagem (Berghaus *et al.*, 2010).

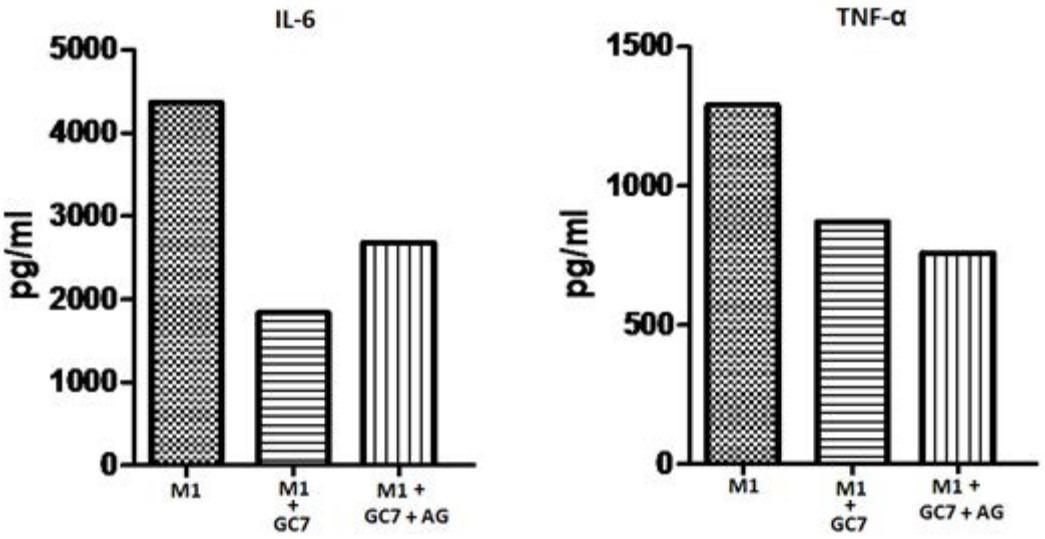


Figura 14. Efeito de GC7 sobre a liberação de citocinas em cultura primaria de macrófagos. As citocinas TNF-α e IL-6 foram quantificadas por ELISA nos sobrenadantes da cultura de macrófagos submetidos a 48 h de tratamento com meio contendo IFN-γ e LPS na ausência ou presença de 150 μM de GC7 e 1 mM de aminoguanidina (AG).

4.6. A administração de GC7 reduz os níveis de TNF-α *in vivo* após desafio inflamatório sistêmico por LPS

No intuito de avaliar se GC7 apresenta efeitos anti-inflamatórios semelhantes aos observados em cultura celular de macrófagos pela inibição da produção de TNF-α, foram realizados experimentos em ratos que tiveram a artéria e veia femoral canuladas cirurgicamente. Os animais foram divididos nos seguintes grupos: C, controle negativo, que não receberam GC7 e LPS; LPS, controle positivo, que receberam 200 μL de PBS (veículo) por via intraperitoneal 1 hora antes do início das coletas e 100 μg/kg de LPS pela cânula venosa imediatamente após a primeira coleta; e o grupo GC7, tratado, que recebeu 40 μg/kg de GC7 por via intraperitoneal 1 hora antes das coletas e LPS tal como no controle positivo.

As alíquotas de sangue coletados pela cânula arterial a cada hora, totalizando 6 coletas, tiveram o plasma separado por centrifugação e o TNF-α quantificado por ELISA. Os resultados apresentados na Figura 15 mostram que o grupo que recebeu

previamente o GC7 apresenta uma acentuada redução nos níveis plasmáticos de TNF-α depois da primeira hora do desafio pró-inflamatório por LPS. Os resultados descritos aqui corroboram com um estudo anterior realizado em modelo murino tratado 24 h antes com lipossomas contendo eIF5A-siRNA, e desafiados com LPS por via intraperitoneal (Moore *et al.*, 2008). Naquele trabalho, os níveis séricos de TNF-α se apresentaram significativamente reduzidos em relação aos animais que receberam o siRNA controle 90 min após receberem a injeção de LPS. Tais dados mostraram que a inibição de eIF5A gera efeitos sobre a concentração sérica de TNF-α semelhantes à dexametasona, confirmando o potencial de estratégias que utilizam o silenciamento de eIF5A ou a inibição da hipusinação como terapia anti-inflamatória.

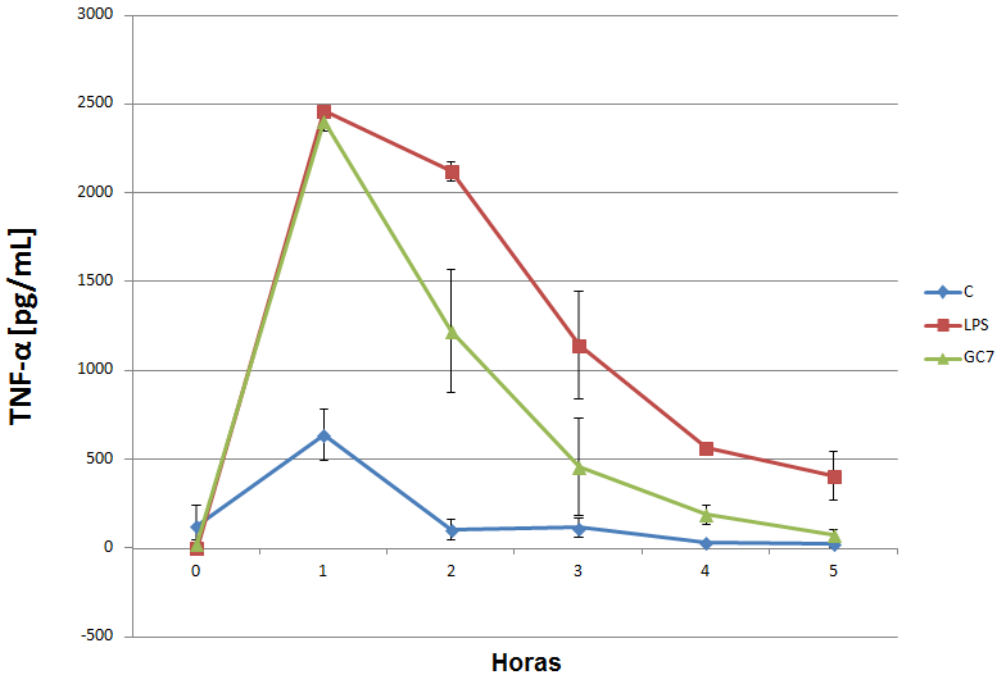


Figura 15. Curva da produção de TNF-α no plasma de ratos frente ao tratamento com GC7 e desafio sistêmico com LPS. Ratos Wistar com aproximadamente pesando aproximadamente 250g foram submetidos a canulação cirúrgica da artéria e veia femoral. Após 24 h foram divididos em 3 grupos: C = grupo controle, o qual recebeu PBS (veículo diluente de GC7 e LPS) por via intraperitoneal e por via venosa após 1 h; LPS = grupo que recebeu PBS intraperitoneal e desafio inflamatório com LPS por via intravenosa após 1 h; GC7 = grupo que recebeu injeção de GC7 por via intraperitoneal e LPS por via intravenosa após 1 h.

4.7. Níveis de mRNAs de marcadores inflamatórios em células RAW 264.7 tratadas com GC7

Como a diminuição de TNF-α total das células RAW264.7 pode estar diminuído por conta de redução dos níveis de seu mRNA, utilizamos qRT-PCR para analisar esta possibilidade. Interessantemente, observamos um pequeno aumento nos níveis de mRNA de TNF-α, descartando a possibilidade de que GC7 prejudica a indução transcricional de gene TNF-α após o estímulo com LPS (Figura 16). O fato de que não há diminuição nos níveis de mRNA desta citocina em macrófagos tratados com GC7, enquanto há uma grande diminuição na produção da proteína TNF-α, sugere que a tradução de TNF-α é regulada por eIF5A.

Também foram determinados os níveis de mRNA para outras citocinas e fatores envolvidos na resposta imune, no intuito de se realizar uma caracterização mais geral do impacto de GC7, e na resultante inibição de eIF5A, na resposta das células RAW 264.7 ao LPS. Para a maioria dos genes testados, não houve diferenças significantes ($p>0,05$) nos níveis de mRNA (Tabela 3). Por outro lado, os níveis de mRNAs de citocinas pro-inflamatórias como IL-1α, IL-1β e iNOS apresentaram-se bastante reduzidos. Estes resultados sugerem que GC7 pode exercer sua atividade anti-inflamatória alterando a tradução de mRNAs específicos, como no caso de TNF-α, bem como diminuindo os níveis de mRNA de outros fatores, como IL1-α, IL1-β e iNOS.

Tabela 3. Grupo de genes testados por qRT-PCR. Os genes que não estão presentes na Figura 16 não foram estatisticamente significantes.

Gene	Não tratado (RQ)	Tratado (RQ)	Expressão gênica relativa
Il1a	1	0,0644	diminuído
Il1b	1	0,0722	
Il12b	1	0,1379	
Nos2	1	0,1084	
Cxcr3	1	0,1893	
Icos	1	0,2518	
Ccr2	1	0,3201	
Vegfa	1	0,3368	
Icam1	1	0,3916	
Socs1	1	0,4836	Não alterado
Nfkb2	1	0,5085	
Nfkb1	1	0,5361	
Ccl2	1	0,6189	
Bcl2l1	1	0,6401	
Stat6	1	0,6417	
Lif	1	0,7487	
Tgfb1	1	0,7740	
C3	1	0,7814	
Nfatc3	1	0,7952	
Cxcl11	1	0,8814	
Ly96	1	1,0972	
Cxcl10	1	1,1144	
Ptgs2	1	1,1461	
Bax	1	1,1678	
Ccl3	1	1,2200	
Tnfa	1	1,4756	Aumentado
Cd68	1	1,7893	
Smad7	1	2,8524	

1. RQ = quantificação relativa

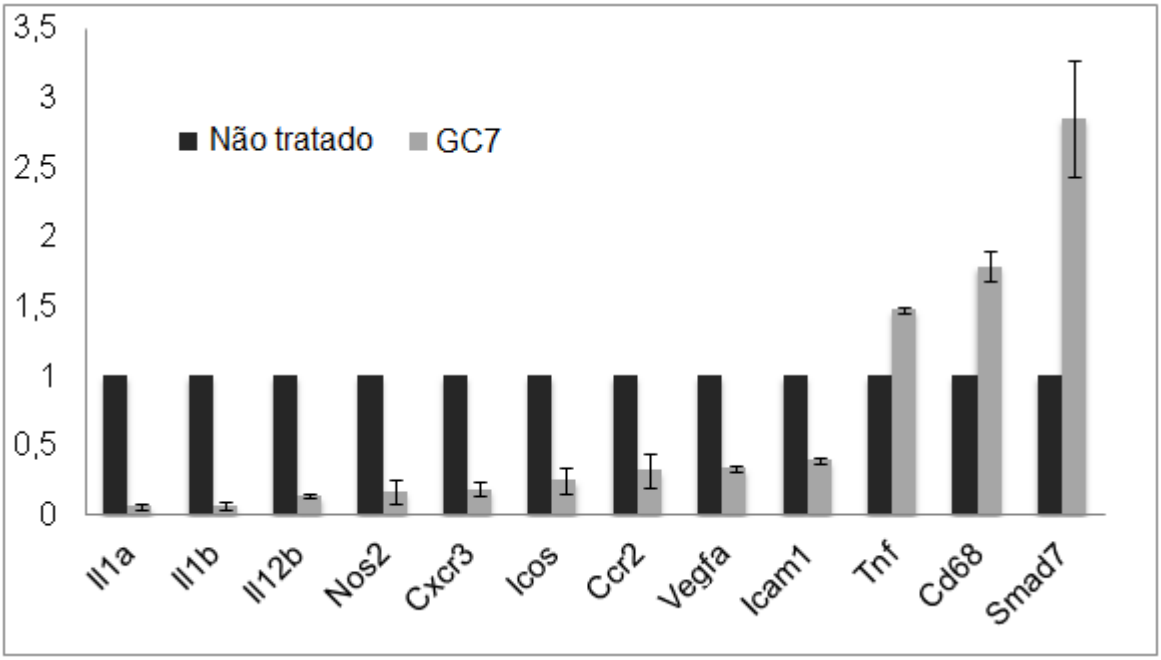


Figura 16. Níveis de mRNAs de marcadores inflamatórios em células RAW 264.7 tratadas com GC7. Gráfico mostrando a expressão relativa dos genes da Tabela 2 determinados como significativamente diferentes.

4.8. GC7 causa defeito no início da tradução em células RAW 264.7

Foi demonstrado que eIF5A desempenha um importante papel no processo de tradução e faz parte da maquinaria de síntese proteica. Dessa forma, analisamos a síntese proteica global através do ensaio de perfil polissomal para verificar o número de ribossomos associados com mRNAs na célula. Uma única molécula de mRNA pode associar-se com mais de um ribossomo 80S, formando um polissomo e a média do número de polissomos nos mRNAs celular indica a taxa de tradução na célula. As diferenças no perfil polissomal obtido de células não tratadas e tratadas com GC7 podem também distinguir se o defeito na síntese proteica ocorre no início ou na elongação da tradução. Como se pode observar na Figura 17, o tratamento com GC7 aumenta o pico de 80S (monossomos) e diminui os picos de polissomos e a quantidade de mRNAs associados com 5 ou mais ribossomos, o que é demonstrado pela área sob o gráfico. A área integrada dos picos do gráfico foi quantificada e a relação entre polissomos e monossomos (P/M) é claramente diminuída após o tratamento com GC7.

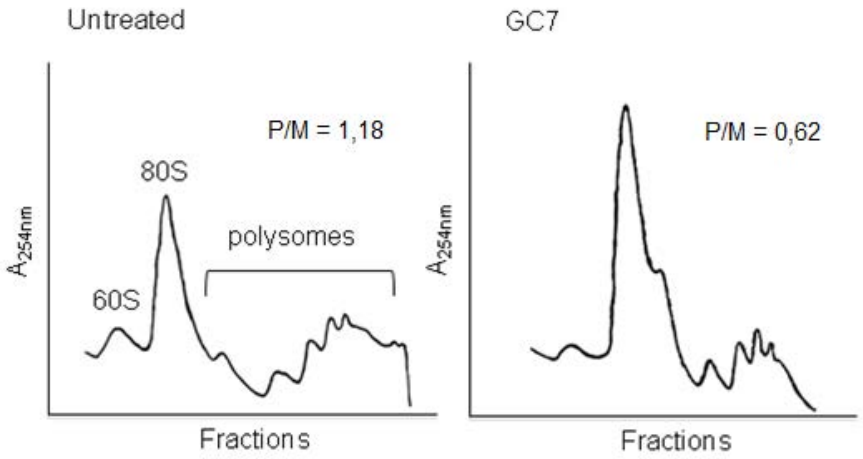


Figura 17. Perfil polissomal de células RAW 264.7 tratadas com GC7. Células não tratadas e tratadas com 150 µM de GC7 foram, em seguida, tratadas com cicloheximida para estabilizar os ribossomos ligados aos mRNAs. Então, o extrato total foi preparado e 10 Ods a 260 nm foram separadas em gradiente de sacarose 7 - 47%. As áreas dos picos de 80S (monossomos - M) e polissomos (P) foram quantificadas utilizando of software NIH Image J e comparadas entre si para calcular a relação P / M.

Estes resultados indicam que os defeitos na síntese proteica ocorrem, principalmente, no início da tradução. Embora eIF5A tenha sido associado com a elongação da tradução, os resultados aqui apresentados estão de acordo com dados publicados que mostram que adicionalmente ao bloqueio da formação de eIF5A ativa, o tratamento com GC7 também causa alterações na atividade de outros fatores de um modo secundário, como a indução da fosforilação de eIF2α e a redução da fosforilação de 4E-BP, resultando em um perfil polissomal característico de defeito no início da tradução (Landau *et al.*, 2010).

4.9. Análise do perfil traducional de células RAW 264.7 tratadas com GC7

Os perfis polissomais de células RAW 264.7 foram realizados no intuito de se separar os mRNAs associados aos ribossomos traducionalmente ativos, ou seja, que estão em processo de tradução, versus mRNAs que não estão sendo traduzidos na célula. Uma vez separadas as frações ribossomais, o RNA foi extraído e submetido a análise de PCR em tempo real (qRT-PCR) para determinação relativa dos níveis de mRNA de *Tnf* (codifica para TNF-α), *Ptgs2* (codifica para COX-2), *Nos2* (codifica para iNOS), *Il1b* (codifica para interleucina 1 beta) e *Eif5a* (codifica para eIF5A-1).

As frações dos perfis polissomais de células tratadas e não tratadas com GC7 foram unidas em “pools” de frações leves (60S e 80S) e de polissomos para extração do RNA e análise por qRT-PCR. A Figura 18 mostra os resultados dos mRNAs associados às frações leves e aos polissomos frente ao RNA total separado. Os resultados mostraram-se inconclusivos para os mRNAs de eIF5A e IL-1β, visto que as replicatas não foram reprodutivas, o que pode ser observado pelas barras de erro. Já em relação aos mRNAs dos demais marcadores, não houve deslocamento dos mRNAs dos polissomos para as frações leves, mostrando um efeito geral, comum aos genes avaliados. Os dados obtidos não corroboram com dados relatados em trabalhos anteriores, que avaliaram o controle traducional de oxido nítrico sintase (*Nos2*) em células de ilhotas beta de pâncreas (INS-2) (Nishiki *et al.*, 2013). No estudo citado é mostrada a inibição da tradução de *Nos2* no tratamento com GC7. No entanto, este método pode ser útil para avaliar o perfil traducional de outros marcadores que podem contribuir para a elucidação do mecanismo responsável pelos efeitos mostrados no tratamento dos macrófagos RAW 264.7 com GC7.

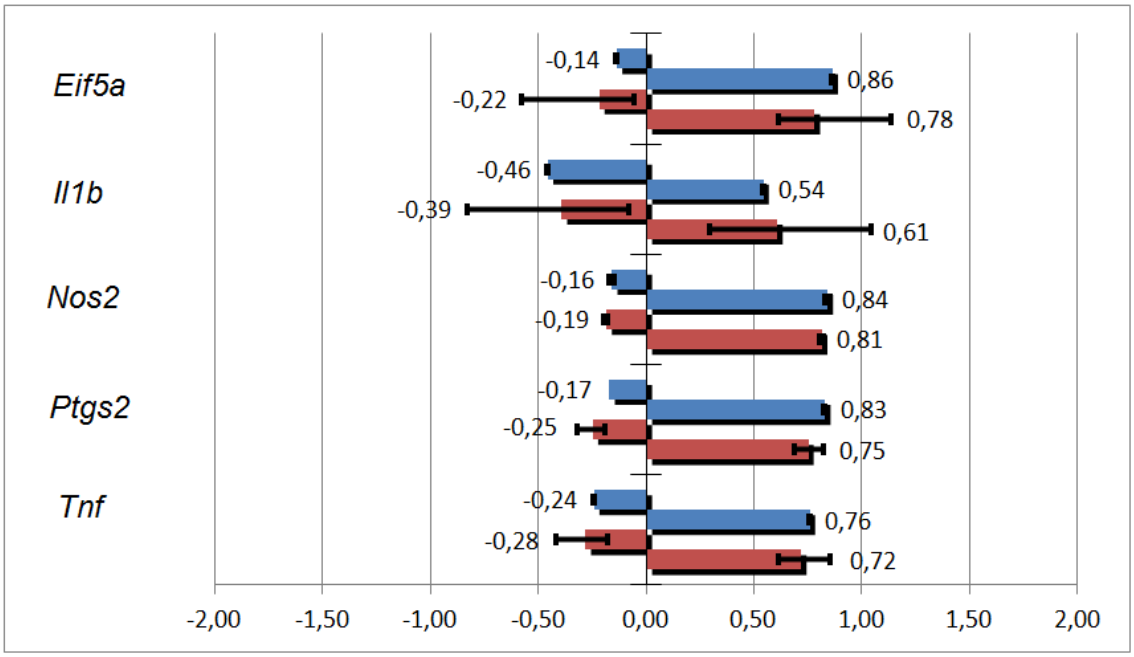


Figura 18. Perfil traducional de marcadores inflamatórios em células RAW 264.7 tratadas com GC7. O gráfico mostra a porcentagem de mRNAs e eIF5A, *Il1b*, *Nos2*, *Ptgs2* e *Tnf* entre as frações ribossomais leves e polissomos em relação ao RNA total separado pelos perfis polissomais. As barras azuis correspondem às células não tratadas e as barras vermelhas às células tratadas com GC7. Os valores negativos (-) são referentes as frações leves enquanto que os valores positivos referem-se aos polissomos.

4.10. GC7 bloqueia a proliferação de células RAW 264.7 e induz parada do ciclo celular na fase G0/G1

Uma vez que foram relatados efeitos antiproliferativos da inibição de eIF5A em diferentes tipos celulares (Mathews e Hershey, 2015), decidimos testar a proliferação celular de células RAW 264.7 após tratamento com GC7. Para isto, empregamos a medida da divisão da fluorescência após a marcação com carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE). Nesta técnica, o fluoróforo CFSE é incorporado às células ligando-se covalentemente a proteínas. A fluorescência é dividida entre as células filhas a cada divisão celular, sendo possível determinar a inibição ou o aumento da proliferação frente às condições experimentais.

A Figura 19A mostra a fluorescência de CFSE em função do número de células das amostras tratadas com 50 e 150 μM de GC7 (em vermelho), comparadas ao controle (células não tratadas, em preto). Observa-se uma acentuada inibição da proliferação celular no tratamento com GC7 em ambas as concentrações testadas. Além disso, para observarmos o padrão de crescimento destes macrófagos na presença e ausência de GC7, foi realizada uma curva de crescimento das células RAW 264.7 frente ao tratamento com 150 μM de GC7 por um período de 5 dias (120 horas), mensurando a quantidade de células a cada 24 horas. Observa-se na Figura 19B que as células tratadas com GC7 não proliferam significativamente durante o período analisado.

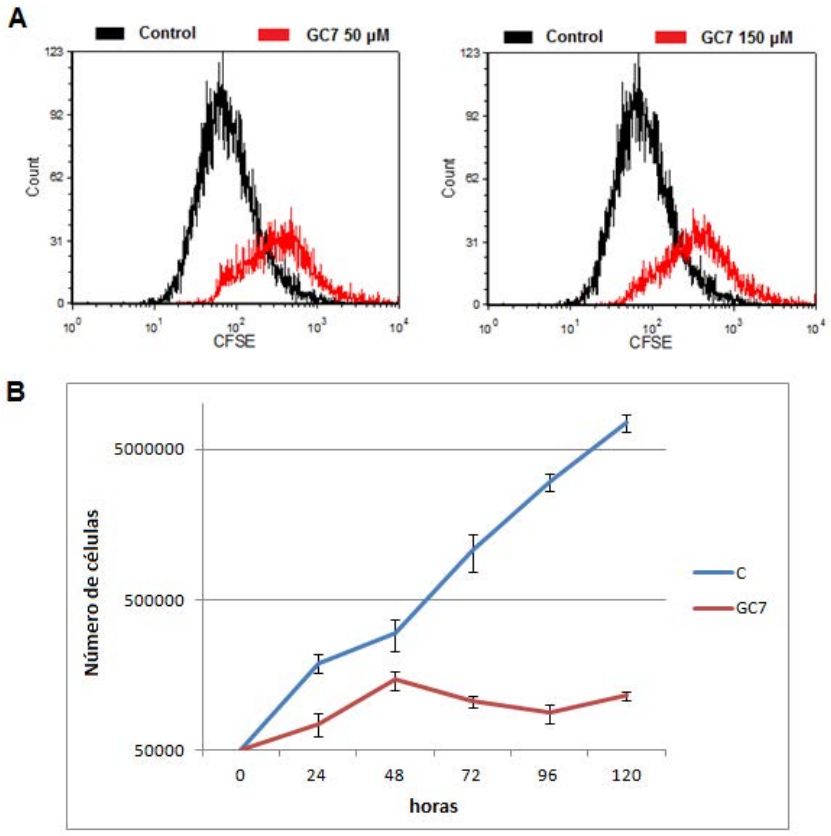


Figura 19. **Proliferação de células RAW 264.7 frente ao tratamento com GC7**. **(A)** $1x10^5$ células marcadas com 2 µM de CFSE foram tratadas com 50 e 150 µM de GC7 + 1 mM de aminoguanidina e incubadas por 72 h. A fluorescência (eixo X) e o número de células (eixo Y) foram determinados por citometria de fluxo. O deslocamento dos picos de fluorescência para esquerda é proporcional à proliferação das células RAW 264.7. **(B)** Curva de crescimento de células RAW 264.7 não tratadas e tratadas com GC7. $5x10^4$ células foram plaqueadas em placas de cultivo com área de 10 cm^2 e incubadas por 2 h até aderirem. Após a adesão das células no fundo das placas, foi trocado o meio de cultura e adicionado tratamento de 1 mM de aminoguanidina no controle (C) e 150 µM de GC7 + 1 mM de aminoguanidina na condição tratada (GC7). As células eram coletadas e contadas em hemocitômetro a cada 24 horas por um período de 120 h.

A observação da inibição da proliferação celular em RAW 264.7 por GC7 nos levou a investigar a sua influência sobre o ciclo celular nesta linhagem de macrófago. Foram realizados, então, ensaios de ciclo celular pela marcação com iodeto de propídeo (PI) e análise por citometria de fluxo para identificar a porcentagem de células em cada fase do ciclo celular após o tratamento com GC7. A Figura 20 mostra um acentuado acúmulo de células em G0/G1.

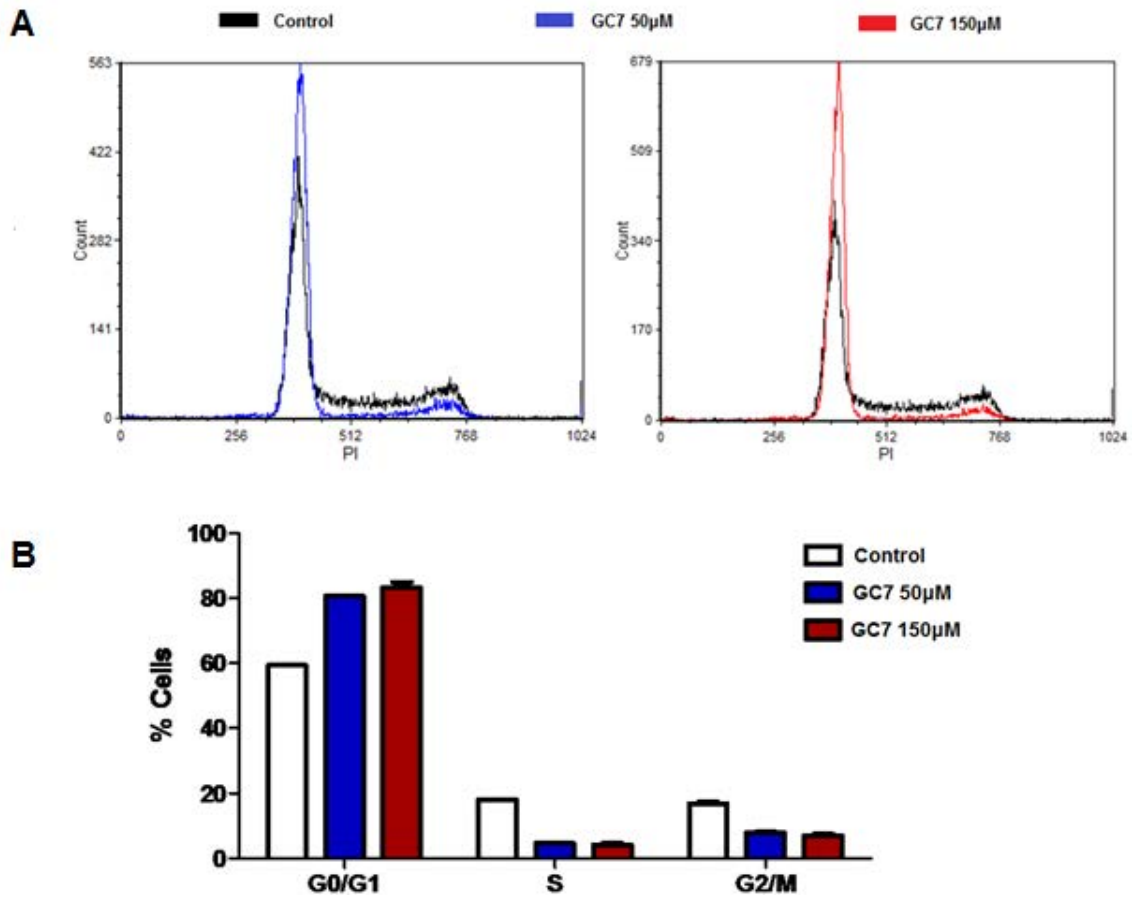


Figura 20. GC7 induz um bloqueio na fase G0/G1 do ciclo celular. (A) 1x10^6 células foram tratadas com 50 µM (azul) e 150 µM (vermelho) de GC7 por 16 h e desafiadas com 100 ng/mL de LPS por 4 horas. Após o tratamento, as células foram coletadas, fixadas, marcadas com iodeto de propídeo (PI) e analisadas por citometria de fluxo quanto à porcentagem de células em cada fase do ciclo celular. **(B)** Dados do painel A representados em gráfico de barras.

4.11. Análise da expressão de genes envolvidos no ciclo celular por qRT-PCR

No intuito de identificar os genes envolvidos no ciclo celular possivelmente alterados pelo tratamento com GC7, analisamos por qRT-PCR os níveis de mRNA de 84 genes das diferentes fases do ciclo celular, dispostos em um qPCR *array* (RT² Profiler PCR Arrays - Mouse Cell Cycle PCR Array - Qiagen). Destes genes, 32 apresentaram expressão gênica relativa diminuída com o tratamento com GC7 e 1 gene teve sua expressão aumentada (Figura 21). A Tabela 4 mostra o painel de genes analisados, separados de acordo com o agrupamento funcional no ciclo celular.

Tabela 4. Genes analisados no qPCR *array* de ciclo celular distribuídos de acordo com seu grupamento funcional.

Grupo funcional[1]	Genes presentes no qPCR *array*[2,3]	Genes com expressão alterada
Fase G1 e transição G1/S	Cdk6, Cdkn3, Gpr132, Itgb1, Myb, Skp2, Slfn1	**Diminuído:** Cdkn3, Cdk6
Fase S e replicação do DNA	**Cdc6**, Cdc7, **Mcm2**, **Mcm3**, **Mcm4**, Mki67, Mre11a, **Msh2**, Rad17, **Rad51**	**Diminuídos: Cdc6**, **Mcm2**, **Mcm3**, **Mcm4**, Mki67, **Msh2**, **Rad51**
Fase G2 e transição G2/M	Birc5, Cdkn3, Chek1, **Ppm1d**	**Diminuídos:** Birc5, Cdkn3, Chek1
Fase M	Aurkb, Brca2, Ccna1, Ccnb1, Cdc20, **Cdc25a**, Cdc25c, **Cdc6**, **Cdk1** (Cdc2), **Cdk2**, Nek2, Rad21, Ran, Shc1, **Smc1a** (Smc1l1), **Stag1**, **Stmn1**, Terf1, **Wee1**	**Diminuídos:** Aurkb, Brca2, Ccnb1, **Cdc25a**, **Cdc6**, **Cdk1**, Rad21, **Stmn1**, **Wee1**
"Checkpoints" e parada do ciclo celular	Atr, Brca2, Casp3, Cdc25c, **Cdk1** (Cdc2), Cdk5rap1, **Cdkn1a** (p21Cip1/Waf1), **Cdkn1b** (p27Kip1), Cdkn2a (p16Ink4), Cdkn2b (p15Ink4b), Cdkn3, Chek1, Chek2 (Rad53), Cks1b, Ddit3 (CHOP), Dst, Gadd45a, Hus1, Mad2l1, Mdm2, **Msh2**, Nbn (Nbs1), Notch2, Pkd1, Pmp22, **Ppm1d** (WIP1), Rad9a, **Rb1**, Sfn (14-3-3s), Slfn1, **Smc1a** (Smc1l1), Tsg101	**Diminuídos:** Brca2, Cdc25c, **Cdk1**, **Cdkn1b**, Cdkn3, Chek1, Chek2, Cks1b
Regulação do ciclo celular	Abl1, Atr, Aurka, Bcl2, Brca2, Ccna1, **Ccna2**, Ccnb1, Ccnb2, Ccnc, Ccnd1, Ccnd2, **Ccnd3**, **Ccne1**, Ccnf, Cdc20, Cdc25c, **Cdc6**, **Cdk1** (Cdc2), Cdk4, Cdk6, **Cdkn1a** (p21Cip1/Waf1), Cks1b, **E2f1**, **E2f2**, **E2f3**, **E2f4**, Gadd45a, Itgb1, Rad9a, Ran, **Rb1**, Sfn (14-3-3s), Shc1, Skp2, Tfdp1	**Diminuídos:** Abl1, Aurka, Brca2, **Ccna2**, Ccnb1, Ccnb2, **Ccnd3**, Ccnf, Cdc25c, **Cdc6**, **Cdk1**, Cdk6, Cks1b **Aumentado:** Ccnd2
Regulação negativa do ciclo celular	**Atm**, **Brca1**, Casp3, Cdkn2a (p16Ink4), Cdkn2b (p15Ink4b), **Rbl1**, **Rbl2**, Trp53, Trp63	**Diminuídos: Brca1**, **Rbl1**, **Rbl2**

[1] "Functional Gene Grouping". Classificação segundo a ferramenta disponível online: http://www.sabiosciences.com/rt_pcr_product/HTML/PAMM-020A.html#howitwork)

[2] Os genes destacados em vermelho não foram amplificados adequadamente na reação, portanto, não foram considerados nesta análise.

[3] Os genes marcados em negrito são alvos de regulação por E2F (E2F transcription factor network - http://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosystems/137934; (Bracken *et al.*, 2004)

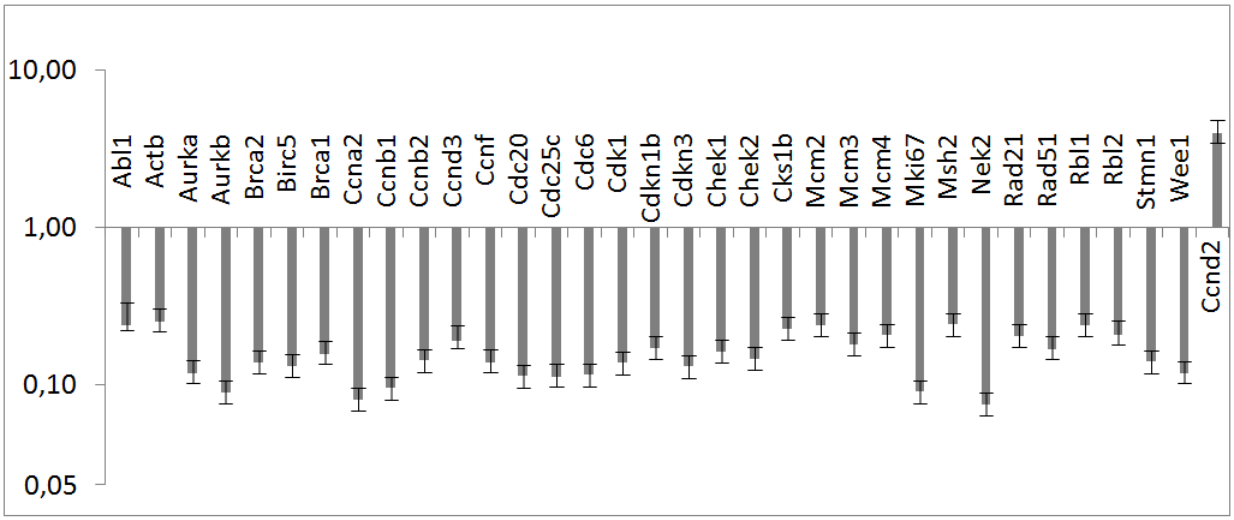


Figura 21. Níveis de mRNAs de genes envolvidos no ciclo celular em células RAW 264.7 tratadas com GC7. Gráfico mostrando a expressão relativa dos genes alterados significativamente.

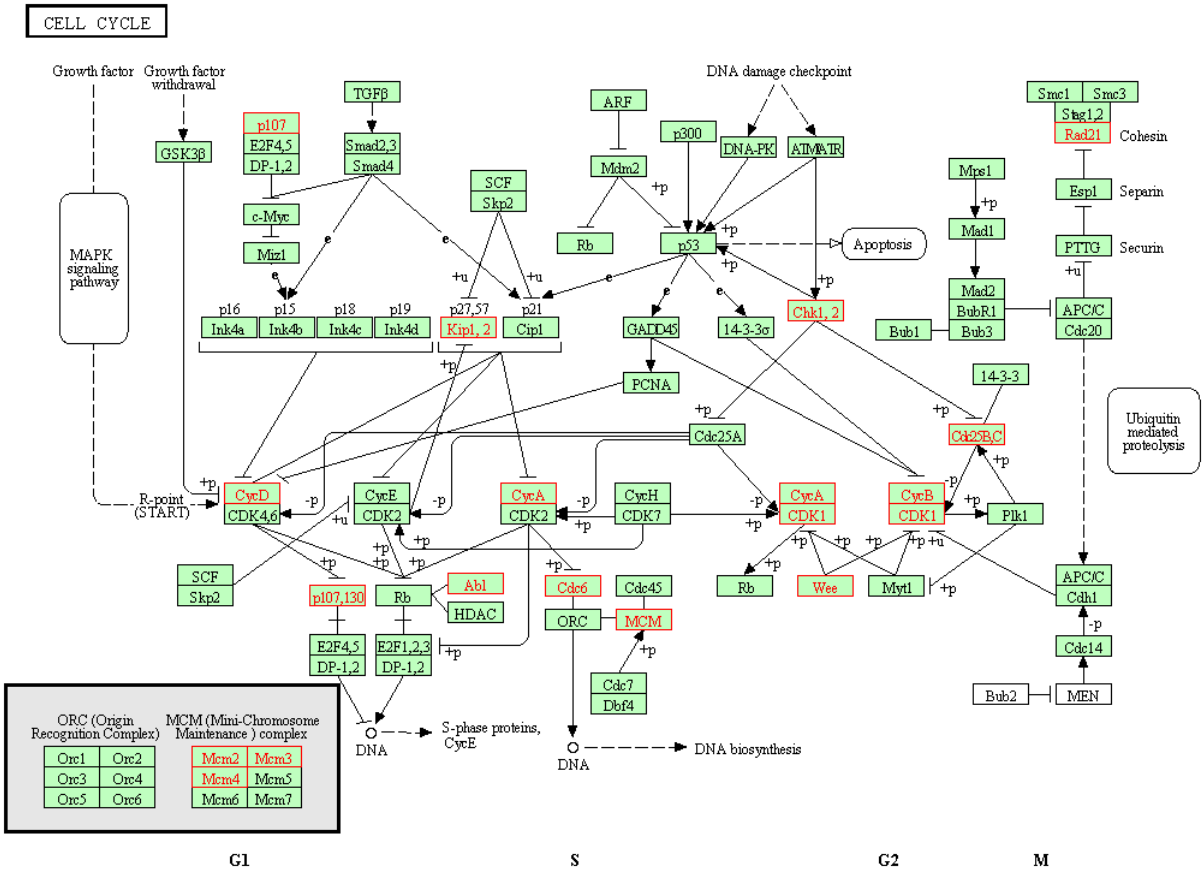
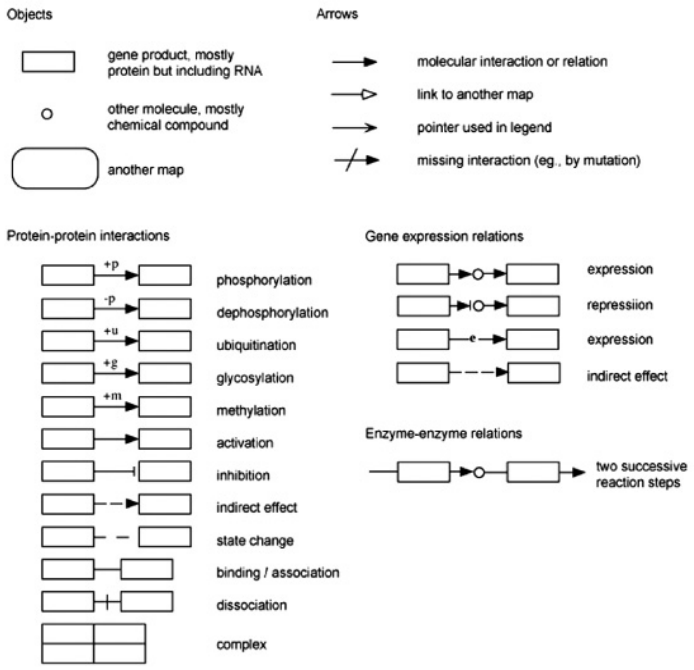


Figura 22. Via de ciclo celular de *Mus musculus* descrita anotada na base de dados KEGG (http://www.genome.jp/kegg/pathway.html). Os genes em vermelho correspondem àqueles que tiveram sua expressão relativa diminuída no tratamento com GC7. Correspondência na nomenclatura dos genes: Abl=Abl1; CycA=Ccna (ciclina A); CycB=Ccnb (ciclina B); CycD=Ccnd (ciclina D); CycE=Ccne (ciclina E); p107=Rbl1; p130=Rbl2; p21 ou Cip1=Cdkn1a; p27 ou Kip1=Cdkn1b; p57 ou Kip2=Cdkn1c. As descrições dos símbolos utilizados neste mapa de vias envolvendo o ciclo celular estão mostrados abaixo.



Para esta análise, é importante levarmos em consideração que as células da linhagem RAW 264.7 são derivadas de animais infectados pelo vírus oncogênico da leucemia murina (*Abelson Murine Leukemia Virus* - A-MuLV) e, portanto, possuem o oncogene viral v-Abl, o qual deve possuir um papel importante para a proliferação desses macrófagos em cultura (Hartley *et al.*, 2008). O v-Abl é uma versão constitutivamente ativa da quinase Abl, que tem um papel importante para proliferação celular (BirchenallRoberts *et al.*, 1997). Entre os mecanismos relacionados com a indução de proliferação por v-Abl, a qual é muito semelhante àquela promovida pela quinase produto da translocação BCR-ABL (Kharas e Fruman, 2005), a ativação de diferentes vias de sinalização que culminam no aumento da expressão de ciclinas D (CyclinD) e das quinases dependendes de ciclina 4 (Cdk4) e 6 (Cdk6) está diretamente relacionada à indução da proliferação pelos oncogenes Abl (BCR-ABL e v-Abl) (Coutts, Zou e Calame, 2000; Sonoyama *et al.*, 2002). Por sua vez, os complexos Cdk4-CyclinD e Cdk6-CyclinD fosforilam pRb, o que libera E2F para ativar a transcrição de genes necessários para a fase S do ciclo celular (replicação do DNA) e ciclina E (CyclinE), uma ciclina necessária para a transição G1/S do ciclo celular (Cam e Dynlacht, 2003).

Apesar da linhagem RAW 264.7 possuir a forma constitutivamente ativa v-Abl, os resultados obtidos no “qPCR array” mostram a diminuição dos níveis de mRNA

de Abl1. A redução da expressão de Abl1 pode ser importante para a parada na progressão do ciclo celular na linhagem RAW 264.7, no entanto, é necessário avaliarmos também a expressão do oncogene v-Abl. Observamos que ciclinas D2 (Ccnd2) e D3 (Ccnd3), importantes para a progressão no ciclo celular, estão com seus níveis alterados. No entanto, enquanto a expressão do gene Ccnd3 está diminuída aproximadamente 5,3 vezes, a do gene Ccnd2 está aumentada 4 vezes. É possível que o tratamento com GC7 leve a uma menor expressão de Ccnd3, assim como os vários outros genes menos expressos neste painel, e que o aumento em Ccnd2 seja algum tipo de compensação a esta diminuição em Ccnd3. O contrário já foi observado em linfócitos B de camundongos (Lam *et al.*, 2000). Contudo, independentemente desta possível compensação, não é possível estimar se a diminuição em Ccnd3 seria suficiente para bloquear um estímulo de entrada na fase S do ciclo celular. Por outro lado, a expressão de Cdk6 está diminuída, enquanto a expressão de Cdk4 está inalterada após tratamento. Desta forma, o ponto de restrição do ciclo celular pode estar diminuído por conta desta diminuição na expressão em Cdk6. Como resultado, a menor ativação de Cdk6-CyclinD, diminui atividade transcricional de E2F e leva a parada do ciclo celular em G1/S. Em concordância com esta possibilidade, dos 29 genes controlados por E2F presentes no qPCR *array*, 15 estão diminuídos após o tratamento com GC7 (Tabela 3). Entre os genes diminuídos, estão tanto aqueles envolvidos com controle da progressão no ciclo celular: Cdk1 e ciclina A (Ccna2) (o complexto Cdk1-CyclinA é necessário para entrada na fase M); como genes de fatores envolvidos diretamente com a replicação de DNA: o fator de estabilização de forquilha de replicação Cdc6, componentes do complexo de pré-replicação MCM (Mcm2, Mcm3, Mcm4). Além desses, outros genes controlados por E2F, envolvidos com a regulação do ciclo celular estão diminuídos (Tabela 3) (Lim e Kaldis, 2013).

Além dos resultados considerados acima, é importante destacar que não existe indução de genes envolvidos com danos no DNA, o que reforça que GC7 não induz este tipo de problema no ciclo celular, o qual é uma importante causa de parada no ciclo celular (Lim e Kaldis, 2013). Como mostrado em seguida neste trabalho, estes resultados estão de acordo com o fato de GC7 não induzir apoptose na linhagem RAW 264.7.

Para promover proliferação celular v-Abl e BCR-ABL ativam várias vias de transdução de sinais intracelulares, tais como Ras, Jak-Stat, JNK e PI-3 quinase e a

transformação por v-Abl, por exemplo, pode ser bloqueada pela interferência na função de Ras. Um aumento de expressão de c-Myc é necessário na transformação por v-Abl, sendo uma das primeiras características observadas em células transformadas por v-Abl, como observado nas células RAW 264.7 (Hester *et al*., 2007). No painel de genes analisados no presente trabalho não estão presentes genes envolvidos nas vias de Ras, Jak-Stat, JNK ou PI-3 quinase, tal como c-Myc. No entanto, é possível que os dados de inibição da proliferação e parada no ciclo celular aqui observados estejam relacionados com uma regulação negativa na expressão ou nas funções de v-Abl e dos fatores envolvidos nas vias ativadas por v-Abl em decorrência da inibição de DHPS na linhagem RAW 264.7. Estudos anteriores já mostraram efeitos antiproliferativos em linhagens celulares de Leucemia mieloide crônica (CML), positivas para BCR-ABL, pelo tratamento com GC7 e outros inibidores de DHPS, sugerindo, inclusive, o uso de inibidores de DHPS em terapia combinada com o inibidor de BCR-ABL, imatinib (Balabanov *et al.*, 2007; Ziegler *et al.*, 2012).

Um estudo recente mostrou a importância de eIF5A hipusinada na tradução de proteínas contendo “motifs” com 3 ou mais resíduos consecutivos de prolina (Gutierrez *et al.*, 2013b). Curiosamente, v-Abl apresenta “motif” de poliprolina em sua porção c-terminal, sendo possível que eIF5A module a tradução desta tirosina quinase. Para evidenciarmos isso, serão necessários novos experimentos para mostrarmos os níveis da proteína v-Abl na inibição da hipusinação de eIF5A.

A família de fatores de transcrição E2F desempenha um papel fundamental na regulação da expressão de genes envolvidos na progressão do ciclo celular e na síntese de DNA. A atividade de E2F é controlada primariamente pela família de proteínas retinoblastoma Rb, Rbl1 e Rbl2 (Cam e Dynlacht, 2003). No presente trabalho, avaliamos os níveis de mRNA dos genes da família E2F por qPCR, no entanto, estes não apresentaram alterações estatisticamente significativas (dados não mostrados). Analisando as sequências peptídicas destes fatores, identificamos que estes fatores da família E2F apresentam “motif” de poliprolina em sua estrutura, os quais geram parada dos ribossomos durante a tradução, a qual é aliviada por eIF5A hipusinada (Gutierrez *et al.*, 2013b). Frente a isso, consideramos a possibilidade de que a parada no ciclo celular observada no tratamento com GC7 ser devido à uma possível diminuição na tradução dos fatores E2F diante da falta de eIF5A madura. Para responder esta questão, foi adquirido o anticorpo anti-E2F1

(Abcam) para avaliarmos os níveis proteicos deste fator após o tratamento com GC7. Na Figura 23, mostramos que não há alterações nos níveis de E2F no tratamento das células RAW 264.7 com o inibidor de DHPS GC7. Portanto, novas análises de funcionalidade das vias ativadas por v-Abl serão necessárias para identificar mais precisamente o mecanismo de GC7 para inibição da proliferação celular em RAW 264.7.

Figura 23. Análise dos níveis de E2F1. Western-blot de E2F1 a partir de extrato celular total de células RAW264.7 após 20 horas de tratamento com 150 μM de GC7.

4.12. GC7 não induz apoptose em células RAW 264.7

Para melhor entender os mecanismos da ação antiproliferativa de GC7, foi testado se GC7 é capaz de induzir apoptose. Para isso, utilizamos a estratégia de marcação com 7-AAD (7-aminoactinomicina D) e Anexina V, em que é possível determinar se as células estão em processo de apoptose e observar se estão em estágio inicial de apoptose (positivo somente para Anexina V) ou em estágio tardio (positivos para 7-AAD e Anexina V). Na Figura 24, podemos observar que o tratamento com GC7 não induz apoptose na linhagem de macrófagos RAW 264.7.

Trabalhos anteriores mostraram o papel de eIF5A na apoptose independente da hipusinação, uma vez que a superexpressão tanto de eIF5A1, quanto do mutante incapaz de sofrer hipusinação, eIF5A^{K50A}, levou à indução de apoptose em células de câncer de pulmão (Taylor *et al.*, 2013). A inibição da hipusinação através do tratamento com GC7 em células RAW 264.7, por sua vez, não induziu apoptose. No entanto, isto não parece ocorrer de forma similar em outros tipos celulares, uma vez que já foi relatado que GC7 é capaz de, além de inibir a proliferação celular, também induzir apoptose em queratinócitos orais humanos (IHOK) e em células primárias de câncer oral (HN4) (Lee *et al.*, 2009).

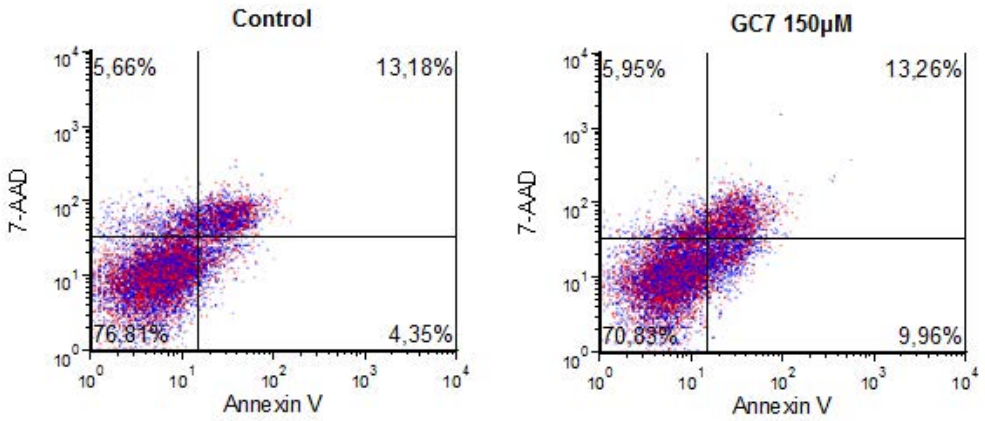


Figura 24. GC7 não induz apoptose em células RAW 264.7. Células não tratadas (controle) e tratadas com 150 µM de GC7 foram marcadas com 7-AAD (7-aminoactinomicina D) e Anexina V. Os gráficos acima mostram as porcentagens de células negativos para 7-AAD e Anexina (não apoptóticas) e positivos (13,18% no controle e 13,26% na amostra tratada com GC7).

4.13. Novos inibidores da enzima Desoxi-hipusina Sintase

Os compostos apresentados na Tabela 2 (item 3.17), os quais apresentaram inibição da atividade *in vitro* de DHPS foram testados quanto a sua citotoxicidade *in vitro*, impacto na liberação de TNF-α e proliferação celular em cultura de macrófagos da linhagem RAW 264.7.

Primeiramente, avaliamos a viabilidade celular na presença dos compostos selecionados para determinarmos as concentrações adequadas para avaliarmos os efeitos sobre a liberação de TNF-α e na proliferação celular (Figura 25).

Em seguida, testamos se os compostos testados *in vitro* apresentam capacidade inibidora da liberação de TNF-α pelas células RAW 264.7 desafiadas com LPS, assim como mostrado com o GC7 (Figura 8). Realizamos ensaios de ELISA para a quantificação de TNF-α nos sobrenadantes de cultura celular tratadas por 16 h com os compostos Z3 (12,5 e 50 µM), Z6 (50 e 150 µM), NSN (12,5 e 50 µM), MI9 (50 e 150 µM), BZ7 (50 e 150 µM), J5 e J6 (50 e 150 µM) e desafiadas com 1 µg/mL de LPS por 4 h. Os resultados não mostraram nenhuma diminuição nos níveis de TNF-α no sobrenadante da cultura celular em comparação com os controles (células não tratadas e estimuladas por LPS) (dados não mostrados).

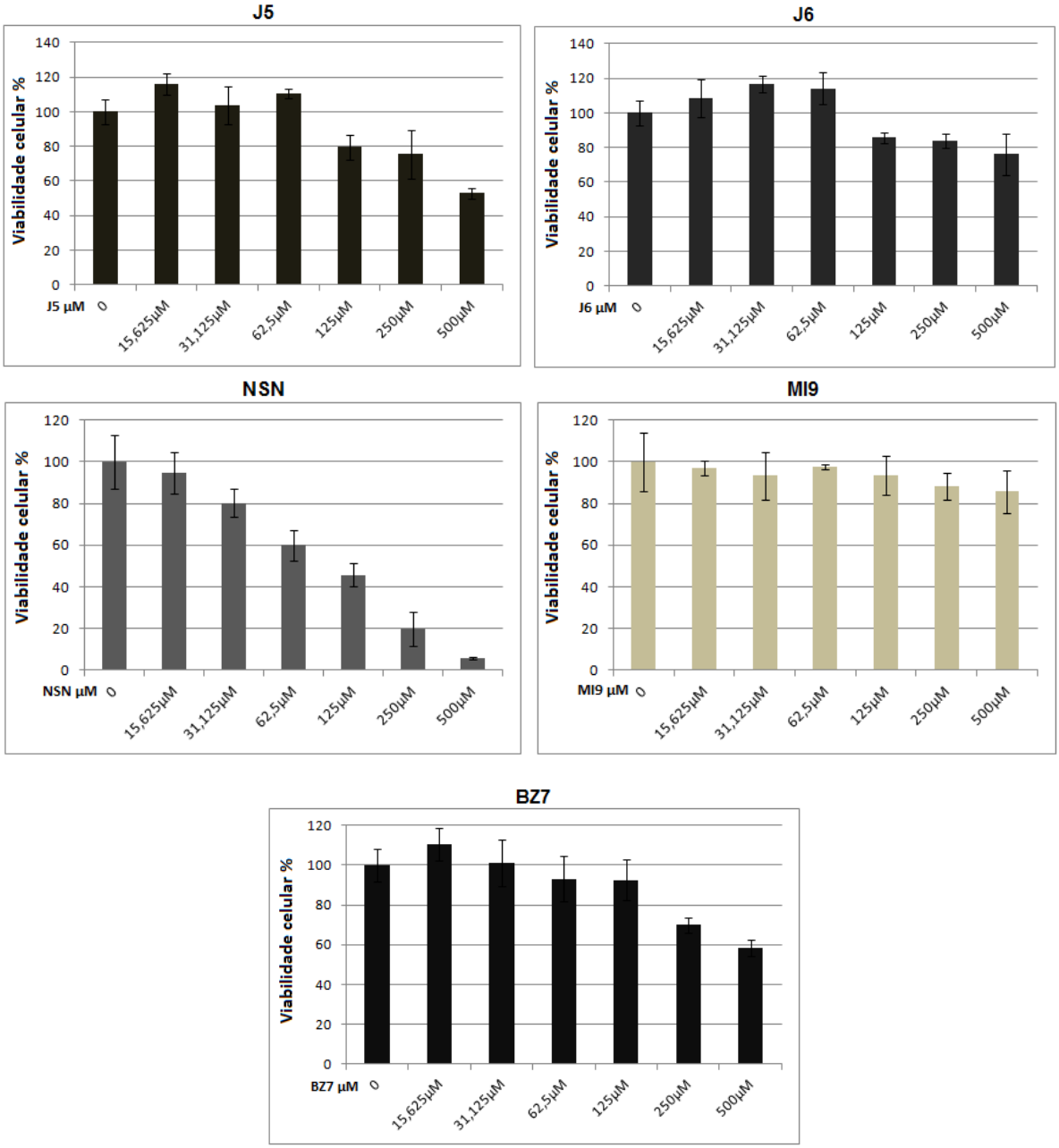


Figura 25. Viabilidade celular frente ao tratamento com os compostos que apresentaram inibição no ensaio *in vitro* da atividade de DHPS. Porcentagem das células viáveis após tratamento de 20 h com diferentes concentrações (15,6; 31,12; 62,5; 125; 250 e 500 µM) dos compostos Z3, Z6, NSN, MI9, BZ7, J5 e J6.

Assim como realizado para GC7 (item 4.10), considerando o conhecido efeito antiproliferativo da inibição farmacológica da hipusinação ou silenciamento de eIF5A (Colvin *et al.*, 2013; Memin *et al.*, 2014), avaliamos a proliferação de células RAW 264.7 após tratamento com os compostos que apresentaram resultados positivos para inibição de DHPS *in vitro* através da medida da divisão da fluorescência após a marcação com carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE) por citometria de fluxo. As células RAW 264.7 foram marcadas com CFSE, coletadas, contadas e $1x10^5$ células foram plaqueadas em placas de 6 poços (aproximadamente 9,5 cm^2 de área por poço). Após a adesão das células, as mesmas foram tratadas com os compostos Z3 (12,5 e 50 μM), Z6 (50 e 150 μM), NSN (12,5 e 50 μM), MI9 (50 e 150 μM), BZ7 (50 e 150 μM), J5 e J6 (50 e 150 μM) e incubadas por 72 h. As células fixadas com formaldeído 3,7% foram lavadas, ressuspendidas e tiveram a fluorescência e contagem determinadas por citometria de fluxo.

Como é possível observar na Figura 26, dentre os compostos testados, os compostos Z3 e NSN mostraram uma diminuição significativa sobre a proliferação das células RAW 264,7 mesmo em doses baixas (12,5 μM). O impacto destes compostos mostrou-se semelhante ao gerado pelo tratamento com GC7.

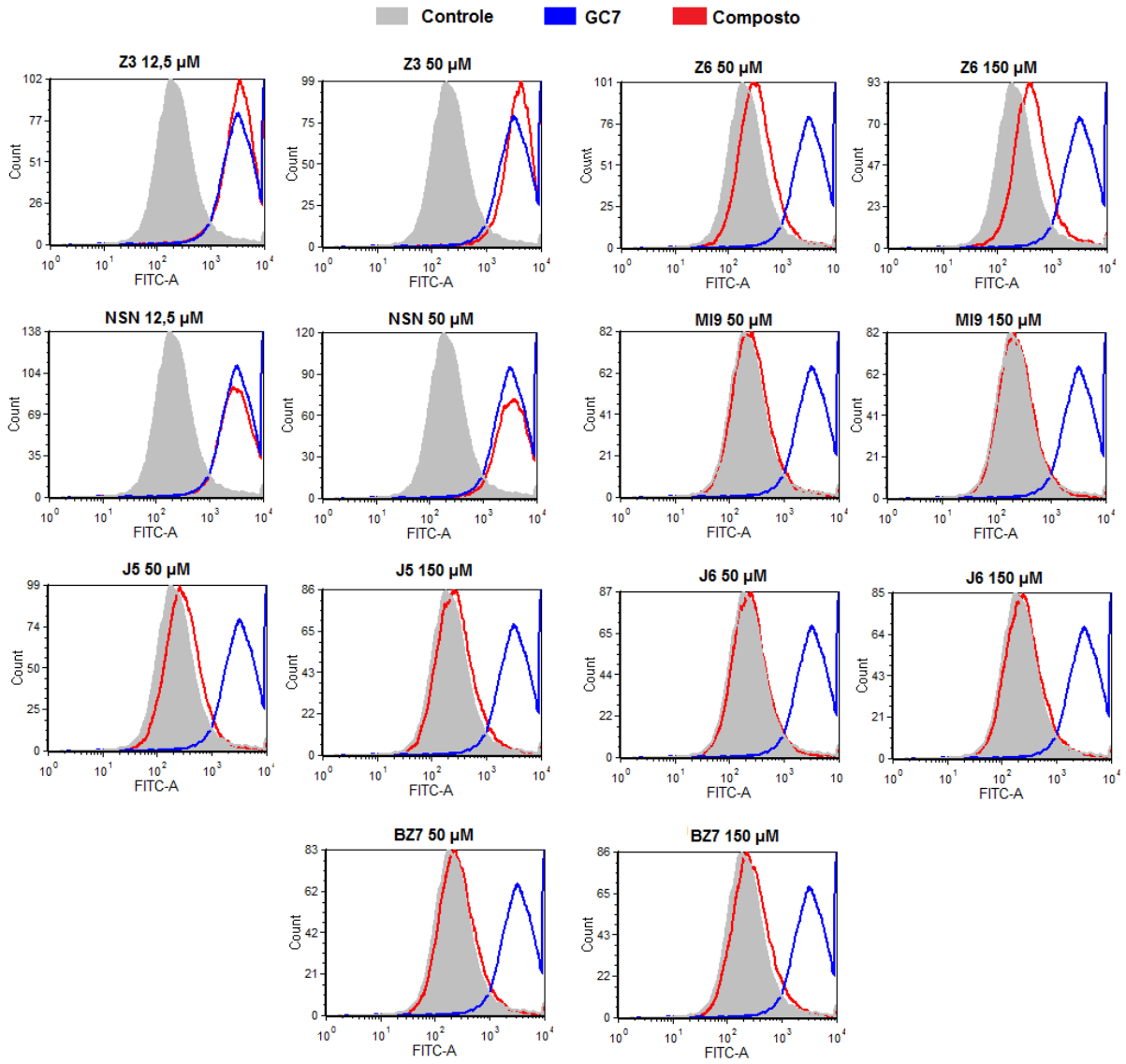


Figura 26. Proliferação de células RAW 264.7 frente ao tratamento com compostos selecionados por triagem virtual e que apresentaram atividade inibidora de DHPS *in vitro*. 1x10^5 células marcadas com 2 µM de CFSE foram tratadas com diferentes concentrações dos compostos Z3 (12,5 e 50 µM), Z6 (50 e 150 µM), NSN (12,5 e 50 µM), MI9 (50 e 150 µM), BZ7 (50 e 150 µM), J5 e J6 (50 e 150 µM) e incubadas por 72 h. As curvas em cinza representam a condição controle (células sem tratamento); em azul representam células tratadas com 150 µM de GC7; e em vermelho, os compostos testados. A fluorescência (eixo X) e o número de células (eixo Y) foram determinados por citometria de fluxo. O deslocamento dos picos de fluorescência para esquerda é proporcional à proliferação das células RAW 264.7.

5. Conclusões

Os resultados obtidos permitem concluir que GC7 possui uma ação anti-inflamatória e antiproliferativa sobre a linhagem de macrófagos de camundongos RAW264.7.

Com relação à citocina TNF-α, foi possível demonstrar que se trata de uma inibição na etapa de tradução desta proteína.

Concluímos também que este efeito de inibição da liberação de TNF-α, frente ao estímulo com LPS, também ocorre em modelo animal.

Com relação ao efeito antiproliferativo, concluímos que GC7 afeta a progressão no ciclo celular durante G0/G1.

Por fim, demonstramos aqui que outros inibidores da enzima DHPS, apesar de não demonstrarem efeito de bloqueio na liberação de TNF-α, demonstraram efeito antiproliferativo comparável ao inibidor GC7.

Referências

BALABANOV, S. et al. Hypusination of eukaryotic imtiation factor 5A (eIF5A): a novel therapeutic target in BCR-ABL-positive leukemias identified by a proteomics approach. **Blood**, v. 109, n. 4, p. 1701-1711, Feb. 2007.

BELL, C. E.; YEATS, T.; EISENBERG, D. Unusual conformation of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) bound to diphtheria toxin: a comparison with NAD bound to the oxidoreductase enzymes. **Protein Sciences**, v. 6, n. 10, p. 2084-2096, Oct. 1997.

BENNE, R.; HERSHEY, J. W. The mechanism of action of protein synthesis initiation factors from rabbit reticulocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 253, n. 9, p. 3078-3087, May 1978.

BERGERON, R. J. et al. Effect of polyamine analogues on hypusine content in JURKAT T-cells. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, n. 20, p. 3901-3908, Sept. 1998.

BERGHAUS, L. J. et al. Innate immune responses of primary murine macrophage-lineage cells and RAW 264.7 cells to ligands of Toll-like receptors 2, 3, and 4. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**, v. 33, n. 5, p. 443-454, Sept. 2010.

BEUTLER, B. A. TLRs and innate immunity. **Blood**, v. 113, n. 7, p. 1399-1407, Feb. 2009.

BIRCHENALL-ROBERTS, M. C. et al. The p120-v-Abl protein interacts with E2F-1 and regulates E2F-1 transcriptional activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 14, p. 8905-8911, Apr. 1997.

BISWAS, S. K.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. **Nature Immunology**, v. 11, n. 10, p. 889-896, Oct. 2010.

BLAHA, G.; STANLEY, R. E.; STEITZ, T. A. Formation of the first peptide bond: the structure of EF-P bound to the 70S ribosome. **Science**, v. 325, n. 5943, p. 966-970, Aug. 2009.

BRACKEN, A. P. et al. E2F target genes: unraveling the biology. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 29, n. 8, p. 409-417, Aug. 2004.

BROCHIER, C.; LOPEZ-GARCIA, P.; MOREIRA, D. Horizontal gene transfer and archaeal origin of deoxyhypusine synthase homologous genes in bacteria. **Gene**, v. 330, p. 169-176, Apr. 2004.

BULLWINKLE, T. J. et al. (R)-β-lysine modified elongation factor P functions in translation elongation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, p. 4416-4423, Feb. 2013.

CAM, H.; DYNLACHT, B. D. Emerging roles for E2F: beyond the G1/S transition and DNA replication. **Cancer Cell**, v. 3, n. 4, p. 311-316, Apr. 2003.

CHEN, K. Y.; LIU, A. Y. C. Biochemistry and function of hypusine formation on eukaryotic initiation factor 5A. **Biological Signals**, v. 6, n. 3, p. 105-109, June 1997.

CLEMENT, P. M. et al. Differential expression of eIF5A-1 and eIF5A-2 in human cancer cells. **Febs Journal**, v. 273, n. 6, p. 1102-1114, Mar. 2006.

COLVIN, S. C. et al. Deoxyhypusine synthase promotes differentiation and proliferation of T helper type 1 (Th1) cells in autoimmune diabetes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 51, p. 36226-36235, Dec. 2013.

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**, v. 29, n. 3, p. 791-797, 1982.

COUTTS, M.; ZOU, X. M.; CALAME, K. v-Abl utilizes multiple mechanisms to drive G1/S progression in fibroblasts. **Oncogene**, v. 19, n. 6, p. 801-809, Feb. 2000.

DIAS, C. A. O. et al. eIF5A dimerizes not only in vitro but also in vivo and its molecular envelope is similar to the EF-P monomer. **Amino Acids**, v. 44, n. 2, p. 631-644, Feb. 2013.

DIAS, C. A. O. et al. Structural modeling and mutational analysis of yeast eukaryotic translation initiation factor 5A reveal new critical residues and reinforce its involvement in protein synthesis. **Febs Journal**, v. 275, n. 8, p. 1874-1888, Apr. 2008.

DOERFEL, L. K. et al. EF-P is essential for rapid synthesis of proteins containing consecutive proline residues. **Science**, v. 339, n. 6115, p. 85-88, Jan. 2013.

GANOZA, M. C.; KIEL, M. C.; AOKI, H. Evolutionary conservation of reactions in translation. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 460-485, Sept. 2002.

GLICK, B. R.; GANOZA, M. C. Identification of a soluble protein that stimulates peptide bond synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 72, n. 11, p. 4257-4260, Nov. 1975.

GOUCH, J. et al. Assignment of homology to genome sequences using a library of hidden Markov models that represent all proteins of known structure. **Journal of Molecular Biology**, v. 313, n. 4, p. 903-919, Nov. 2001.

GREGIO, A. P. et al. eIF5A has a function in the elongation step of translation in yeast. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 380, n. 4, p. 785-790, Mar. 2009.

GUTIERREZ, E. et al. eIF5A promotes translation of polyproline motifs. **Molecular Cell**, v. 51, n. 1, p. 35-45, July 2013.

HANWA-SUETSUGU, K. et al. Crystal structure of elongation factor P from *Thermus thermophilus* HB8. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 26, p. 9595-9600, June 2004.

HARTLEY, J. W. et al. Expression of infectious murine leukemia viruses by RAW264.7 cells, a potential complication for studies with a widely used mouse macrophage cell line. **Retrovirology**, v. 5, Jan. 2008. doi:10.1186/1742-4690-5-1.

JAKUS, J. et al. Features of the spermidine-binding site of deoxyhypusine synthase as derived from inhibition studies - effective inhibition by bis-guanylated and mono-guanylated diamines and polyamines. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 18, p. 13151-13159, June 1993.

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

JENKINS, Z. A.; HAAG, P. G.; JOHANSSON, H. E. Human eIF5A2 on chromosome 3q25-q27 is a phylogenetically conserved vertebrate variant of eukaryotic translation initiation factor 5A with tissue-specific expression. **Genomics**, v. 71, n. 1, p. 101-109, Jan. 2001.

KAISER, A. et al. Inhibition of hypusine biosynthesis in plasmodium: a possible, new strategy in prevention and therapy of malaria. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 11, p. 1231-1241, Nov. 2006.

KANG, H. A.; SCHWELBERGER, H. G.; HERSHEY, J. W. Translation initiation factor eIF-5A, the hypusine-containing protein, is phosphorylated on serine in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 20, p. 14750-14756, July 1993.

KHARAS, N. G.; FRUMAN, D. A. ABL oncogenes and phosphoinositide 3-kinase: mechanism of activation and downstream effectors. **Cancer Research**, v. 65, n. 6, p. 2047-2053, Mar. 2005.

KIM, K. K. et al. Crystal structures of eukaryotic translation initiation factor 5A from *Methanococcus jannaschii* at 1.8 A resolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 18, p. 10419-10424, 1998.

KLIER, H. et al. Determination and mutational analysis of the phosphorylation site in the hypusine-containing protein Hyp2p. **Febs Letters**, v. 334, n. 3, p. 360-364, Nov. 1993.

LAM, E. W. F. et al. Cyclin D3 compensates for loss of cyclin D2 in mouse B-lymphocytes activated via the antigen receptor and CD40. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 5, p. 3479-3484, Feb. 2000.

LANDAU, G. et al. The role of polyamines in supporting growth of mammalian cells is mediated through their requirement for translation initiation and elongation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 17, p. 12474-12481, Apr. 2010.

LEE, S. K. et al. N1-guanyl-1,7,-diamineoheptane, an inhibitor of deoxyhypusine synthase, suppresses differentiation and induces apoptosis via mitochondrial and AMPK pathways in immortalized and malignant human oral keratinocytes. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 38, n. 10, p. 792-800, Nov. 2009.

LIAO, D. I. et al. Crystal structure of the NAD complex of human deoxyhypusine synthase: an enzyme with a ball-and-chain mechanism for blocking the active site. **Structure**, v. 6, n. 1, p. 23-32, Jan. 1998.

LIM, S.; KALDIS, P. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. **Development**, v. 140, n. 15, p. 3079-3093, Aug. 2013.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, Dec. 2001.

MAIER, B.; TERSEY, S. A.; MIRMIRA, R. G. Hypusine: a new target for therapeutic intervention in diabetic inflammation. **Discovery Medicine**, v. 10, n. 50, p. 18-23, July 2010.

MAIER, B. et al. The unique hypusine modification of eIF5A promotes islet beta cell inflammation and dysfunction in mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 6, June 2010.

MATHEWS, M. B.; HERSHEY, J. W. B. The translation factor eIF5A and human cancer. **Biochimica at Biophysica Acta**, v. 1849, n. 7, p. 836-844, May 2015.

MEDZHITOV, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. **Nature**, v. 449, n. 7164, p. 819-826, Oct. 2007.

MEMIN, E. et al. Blocking eIF5A modification in cervical cancer cells alters the expression of cancer-related genes and suppresses cell proliferation. **Cancer Research**, v. 74, n. 2, p. 552-562, Jan. 2014.

MOORE, C. C. et al. Eukaryotic translation initiation factor 5A small interference RNA-liposome complexes reduce inflammation and increase survival in murine models of severe sepsis and acute lung injury. **Journal of Infectious Diseases**, v. 198, n. 9, p. 1407-1414, Nov. 2008.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1/2, p. 55-63, Dec. 1983.

NISHIKI, Y. et al. Translational control of inducible nitric oxide synthase by p38 MAPK in islet beta-cells. **Molecular Endocrinology**, v. 27, n. 2, p. 336-349, Feb. 2013.

NISHIMURA, K. et al. Independent roles of eIF5A and polyarnines in cell proliferation. **Biochemical Journal**, v. 385, p. 779-785, Feb. 2005.

OLIVERIO, S. et al. The spermidine analogue GC7 (N1-guanyl-1,7-diamineoheptane) induces autophagy through a mechanism not involving the hypusination of eIF5A. **Amino Acids**, v. 46, n. 12, p. 2767-2776, Dec. 2014.

PARK, B. S. et al. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. **Nature**, v. 458, n. 7242, p. 1191-1195, Apr. 2009.

PARK, M. H. The essential role of hypusine in eukaryotic translation initiation factor 4D (eIF-4D). Purification of eIF-4D and its precursors and comparison of their activities. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 31, p. 18531-18535, Nov. 1989.

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

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

PARK, M. H.; WOLFF, E. C.; FOLK, J. E. Hypusine - its posttranslational formation in eukaryotic initiation factor-5a and its potential role in cellular-regulation. **Biofactors**, v. 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 in Biochemical Sciences**, v. 18, n. 12, p. 475-479, Dec. 1993b.

PARK, M. H. et al. Antiproliferative effects of inhibitors of deoxyhypusine synthase. Inhibition of growth of Chinese hamster ovary cells by guanyl diamines. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 45, p. 27827-27832, Nov. 1994.

PARK, M. H. et al. Functional significance of eIF5A and its hypusine modification in eukaryotes. **Amino Acids**, v. 38, n. 2, p. 491-500, Feb. 2010.

PEAT, T. S. et al. Structure of translation initiation factor 5A from *Pyrobaculum aerophilum* at 1.75 A resolution. **Structure**, v. 6, n. 9, p. 1207-1214, Sept. 1998.

POZZOLINI, M. et al. Interference in MTT cell viability assay in activated macrophage cell line. **Analytical Biochemistry**, v. 313, n. 2, p. 338-341, Feb. 2003.

RAO, S. T.; ROSSMANN, M. G. Comparison of super-secondary structures in proteins. **Journal of Molecular Biology**, v. 76, n. 2, p. 241-256, May 1973.

ROBBINS, R. D. et al. Inhibition of deoxyhypusine synthase enhances islet beta cell function and survival in the setting of endoplasmic reticulum stress and type 2 diabetes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 51, p. 39943-39952, Dec. 2010.

SAINI, P. et al. Hypusine-containing protein eIF5A promotes translation elongation. **Nature**, v. 459, n. 7243, p. 118-129, May 2009.

SCHNIER, J. et al. Translation initiation factor 5A and its hypusine modification are essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 11, n. 6, p. 3105-3114, June 1991.

SMIT-McBRIDE, Z. et al. Protein synthesis initiation factor eIF-4D. Functional comparison of native and unhypusinated forms of the protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 31, p. 18527-18530, Nov. 1989.

SONOYAMA, J. et al. Functional cooperation among Ras, STAT5, and phosphatidylinositol 3-kinase is required for full oncogenic activities of BCR/ABL in K562 cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 10, p. 8076-8082, Mar. 2002.

STRAND, V.; KIMBERLY, R.; ISAACS, J. D. Biologic therapies in rheumatology: lessons learned, future directions. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, n. 1, p. 75-92, Jan. 2007.

TAYLOR, C. A. et al. Role of p38 and JNK MAPK signaling pathways and tumor suppressor p53 on induction of apoptosis in response to Ad-eIF5A1 in A549 lung cancer cells. **Molecular Cancer**, v. 12, n. 35, May 2013. doi: 10.1186/1476-4598-12-35.

TEMPLIN, A. T. et al. Deoxyhypusine synthase haploinsufficiency attenuates acute cytokine signaling. **Cell Cycle**, v. 10, n. 7, p. 1043-1049, Apr. 2011.

TONG, Y. et al. Crystal structure of human eIF5A1: insight into functional similarity of human eIF5A1 and eIF5A2. **Proteins**, v. 75, n. 4, p. 1040-1045, June 2009.

TORRELIO, B. M.; PAZ, M. A.; GALLOP, P. M. The formation and stability of the hypusine containing protein in chinese-hamster ovary cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 145, n. 3, p. 1335-1341, June 1987.

UDE, S. et al. Translation elongation factor EF-P alleviates ribosome stalling at polyproline stretches. **Science**, v. 339, n. 6115, p. 82-85, Jan. 2013.

UMLAND, T. C. et al. A new crystal structure of deoxyhypusine synthase reveals the configuration of the active enzyme and of an enzyme·NAD·inhibitor ternary complex. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 27, p. 28697-28705, July 2004.

VALENTINI, S. R. et al. Genetic interactions of yeast eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) reveal connections to poly(A)-binding protein and protein kinase C signaling. **Genetics**, v. 160, n. 2, p. 393-405, Feb. 2002.

WANG, F. W.; GUAN, X. Y.; XIE, D. Roles of eukaryotic initiation factor 5A2 in human cancer. **International Journal of Biological Sciences**, v. 9, n. 10, p. 1013-1020, Oct. 2013.

WOHL, T. et al. The HYP2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is essential for aerobic growth: characterization of different isoforms of the hypusine-containing protein Hyp2p and analysis of gene disruption mutants. **Molecular and General Genomics**, v. 241, n. 3/4, p. 305-311, Nov. 1993.

WOLFF, E. C.; PARK, M. H.; FOLK, J. E. Cleavage of spermidine as the first step in deoxyhypusine synthesis. The role of NAD. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 9, p. 4793-4799, Mar. 1990.

XU, A.; CHEN, K. Y. Hypusine is required for a sequence-specific interaction of eukaryotic initiation factor 5A with postsystematic evolution of ligands by exponential enrichment RNA. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 4, p. 2555-2561, Jan. 2001.

XU, A.; JAO, D. L.; CHEN, K. Y. Identification of mRNA that binds to eukaryotic initiation factor 5A by affinity co-purification and differential display. **Biochemical Journal**, v. 384, n. 3, p. 585-590, Dec. 2004.

YAO, M. et al. Crystal structure of hyperthermophilic archaeal initiation factor 5A: a homologue of eukaryotic initiation factor 5A (eIF-5A). **Journal of Biochemistry**, v. 133, n. 1, p. 75-81, Jan. 2003.

ZANELLI, C. F. et al. eIF5A binds to translational machinery components and affects translation in yeast. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 348, n. 4, p. 1358-1366, Oct. 2006.

ZHANG, Z. L. et al. Inhibition of TNF-alpha processing and TACE-mediated ectodomain shedding by ethanol. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 67, n. 6, p. 856-862, June 2000.

ZIEGLER, P. et al. Evaluation of deoxyhypusine synthase inhibitors targeting BCR-ABL positive leukemias. **Investigational New Drugs**, v. 30, n. 6, p. 2274-2283, Dec. 2012.

Anexos

Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 13/2014
Interessado: OEDEM PAULO DE ALMEIDA JUNIOR
Orientador: Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli
Projeto: Estudo da especificidade e toxicidade do inibidor de hipusinação GC7 e busca de novos inibidores da enzima desoxi-hipusina sintase (DHS)

Parecer nº 22/2014 – Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, reunida em 14 de maio de 2014, considerou que o protocolo para uso de animais na pesquisa: "Estudo da especificidade e toxicidade do inibidor de hipusinação GC7 e busca de novos inibidores da enzima desoxi-hipusina sintase (DHS)", apresentado pelo pós-graduando OEDEM PAULO DE ALMEIDA JUNIOR, sob orientação do Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli, do Departamento de Ciências Biológicas desta Faculdade, está estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em MAIO de 2017 em formulário para este fim.

Araraquara, 19 de maio de 2014.

Prof. Dr. CARLOS CÉSAR CRESTANI
Coordenador da CEUA

Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.net

Hypusine Modification of the Ribosome-binding Protein eIF5A, a Target for New Anti-Inflammatory Drugs: Understanding the Action of the Inhibitor GC7 on a Murine Macrophage Cell Line

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

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

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

Keywords: eIF5A, hypusine modification inhibitor, CG7, TNF-α, anti-inflammatory drugs.

INFLAMMATION AND THE ROLE OF MACROPHAGES

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

POLYAMINES AND eIF5A

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

Spermidine plays an essential role in the maturation of the eIF5A protein, by which a specific lysine residue is posttranslationally modified into hypusine (hydroxyputrescine-lysine), an Nε-(4-amino-2-hydroxybutyl)-lysine (Fig. **1**). This reaction occurs via the following two steps: first, the enzyme deoxyhypusine synthase (DHS) transfers a 4-aminobutyl moiety of the polyamine sper-

*Address correspondence to this author at the Department of Biological Sciences, Univ Estadual Paulista – UNESP, Araraquara-SP, Brazil; Tel: +55 16 3301-6954; Fax: +55 16 3301-6940; E-mail: valentsr@fcfar.unesp.br

1873-4286/14 $58.00+.00 © 2014 Bentham Science Publishers

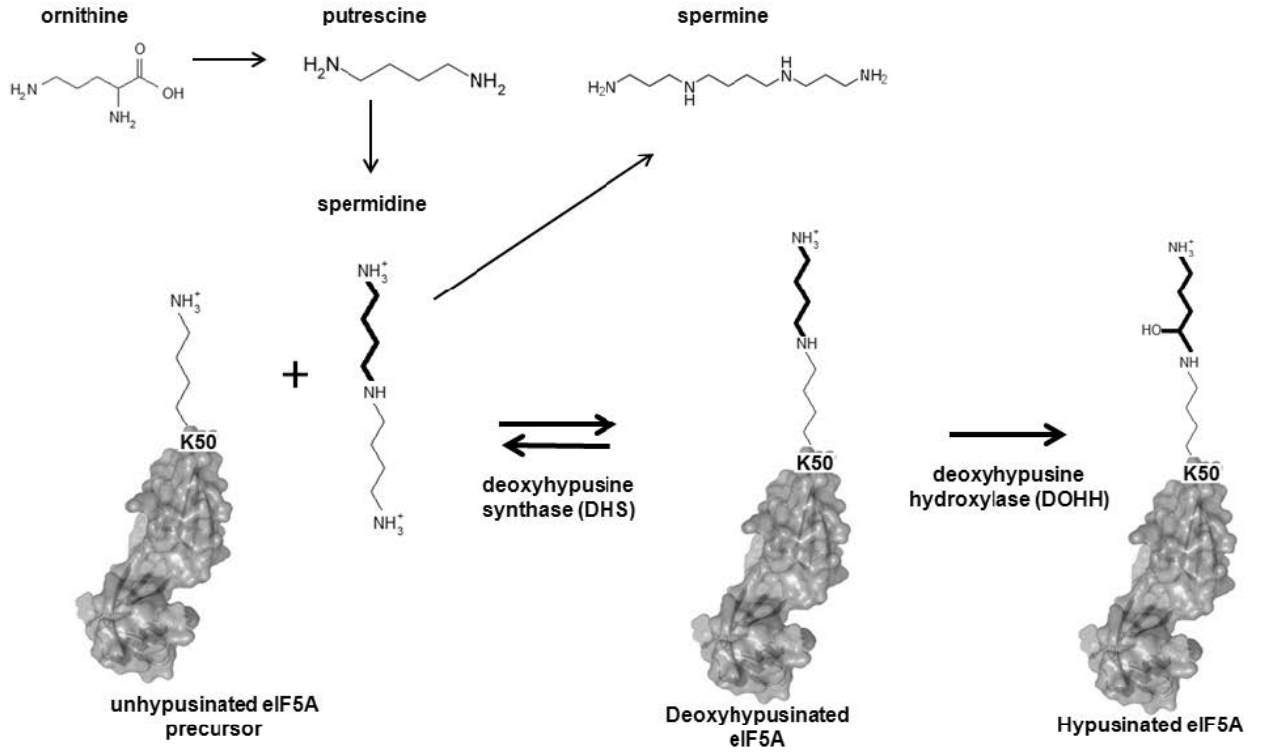


Fig. (1). Hypusine modification of eIF5A. The polyamine spermidine, which is synthesized from putrescine, is the source of the aminobutyl moiety of hypusine, as indicated in bold structures. The synthesis of hypusine occurs at the specific lysine 50 residue (K50) of the unhypusinated eIF5A precursor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

midine to a specific lysine residue in eIF5A; second, the deoxyhypusine residue is hydroxylated by the enzyme deoxyhypusine hydroxylase (DOHH) to form the hypusine residue [12].

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

Studies have also shown that eIF5A binds to RNA, and an *in vitro* study involving selection of RNA ligands (SELEX) identified specific sequence motifs that bind eIF5A. However, the same study was not able to identify endogenous mRNAs harboring the putative specific eIF5A-RNA binding consensus sequences using bioinformatics approaches [23]. An independent study has demonstrated that eIF5A is able to co-purify the iNOS mRNA, coding for the inducible nitric oxide synthase (iNOS), from whole cell extracts in a hypusine-dependent manner. Interestingly, the iNOS mRNA harbors a 6-nucleotide sequence that is contained in the putative eIF5A-RNA-binding consensus [24]. Although co-purification of iNOS mRNA by eIF5A from whole cell extracts could occur through bridging via the binding of eIF5A to the ribosome, that work provides the first evidence of an endogenous mRNA co-purifying with eIF5A in a sequence-specific manner. More importantly, Maier *et al.* (2010) have demonstrated that although iNOS mRNA levels are not reduced when the rat insulinoma cell line INS-1 is treated with the DHS inhibitor N1-guanyl-1,7-diaminoheptane (GC7), the protein levels of iNOS are significantly decreased, suggesting that active, hypusine-containing eIF5A is necessary for translation of iNOS mRNA. In addition, treatment of INS-1 cells with GC7 did not alter the mRNA levels of the Endoplasmic Reticulum (ER) stress marker CHOP, while CHOP protein production was abolished by GC7 treatment [25]. Similarly, GC7 treatment generated a large reduction in CD83 protein on the surface of *in vitro*-differentiated human dendritic cells (DCs), while no alteration in the CD83 mRNA levels occurred [26]. It is important to note that no transcript variants of either CHOP or CD83 mRNAs contain the 6-nucleotide putative eIF5A-RNA-binding consensus sequence proposed (data not shown). Therefore, despite the precise mechanism that dictates the differential expression of specific mRNAs caused by the depletion of eIF5A or the hypusine modification of eIF5A, these studies show that eIF5A regulates gene expression posttranscriptionally. Given the fact that recently published data strongly support a function for eIF5A in the elongation step of protein synthesis in different organisms and cell lines [20, 21, 27-30], it is likely that eIF5A can regulate the translation of specific mRNAs during cellular stresses or other special situations, such as cell differentiation or proliferation.

ANTI-INFLAMMATORY EFFECT OF eIF5A-siRNA AND GC7

Recent studies investigating inflammatory responses related to diabetes have found that eIF5A inhibition results in a proinflammatory effect mediated via hypusine-containing eIF5A. It has been shown that eIF5A-siRNA knockdown or administration of the hypusine-formation blocker GC7 improves phenotypical actions related to inflammation-induced diabetes in mice models, such as insulin release, glycemic control and islet mass [24, 25]. These studies have also shown that decreases in iNOS levels and NO production are directly correlated with eIF5A inhibition by siRNA of eIF5A, GC7 treatment or deoxyhypusine synthase gene (*DHPS*) haploinsufficiency [24, 31]. The production of NO by iNOS in response to proinflammatory stimuli is proposed to play a major role in islet β cells and the pathogenesis of diabetes, as are the iNOS-independent effects of proinflammatory cytokines [32, 33].

In addition to correlating the action(s) of eIF5A with proinflammatory stimuli related to diabetes, studies have shown that the administration of eIF5A-siRNA liposomes increases the survival rates of mice after LPS intraperitoneal injection (in a murine model of severe sepsis) [34]. Previous studies have also demonstrated decreases in the serum levels of TNF-α, IL-1β, IL-6 and other inflammatory mediators after the administration of eIF5A-siRNA. A similar reduction in the release of inflammatory cytokines was observed when eIF5A-siRNA was administered to mice challenged with LPS intranasally. Moreover, eIF5A-siRNA administration after intranasal LPS induced a significant decrease in lung myeloperoxidase, a cytotoxic enzyme produced and released by neutrophil granulocytes [34]. In addition to the obvious effect of eIF5A-siRNA on the neutrophilic response to LPS, it is anticipated that eIF5A-siRNA is also involved in decrease the release of inflammatory mediators from macrophages. However, to date, the direct effects of eIF5A inhibition in murine macrophages have not been demonstrated *in vitro*.

ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS OF GC7 ON CULTURED MURINE MACROPHAGES

In chronic inflammation, macrophages and T cells are major sources of inflammatory mediators such as TNF-α, IL-1 α, IL-1 β and IL-6 [35]. To study the direct inhibition of eIF5A in macrophages, we used the mouse macrophage cell line RAW264.7 and the deoxyhypusine inhibitor GC7, to determine the effects of this treatment on global cell physiology and proinflammatory cytokine

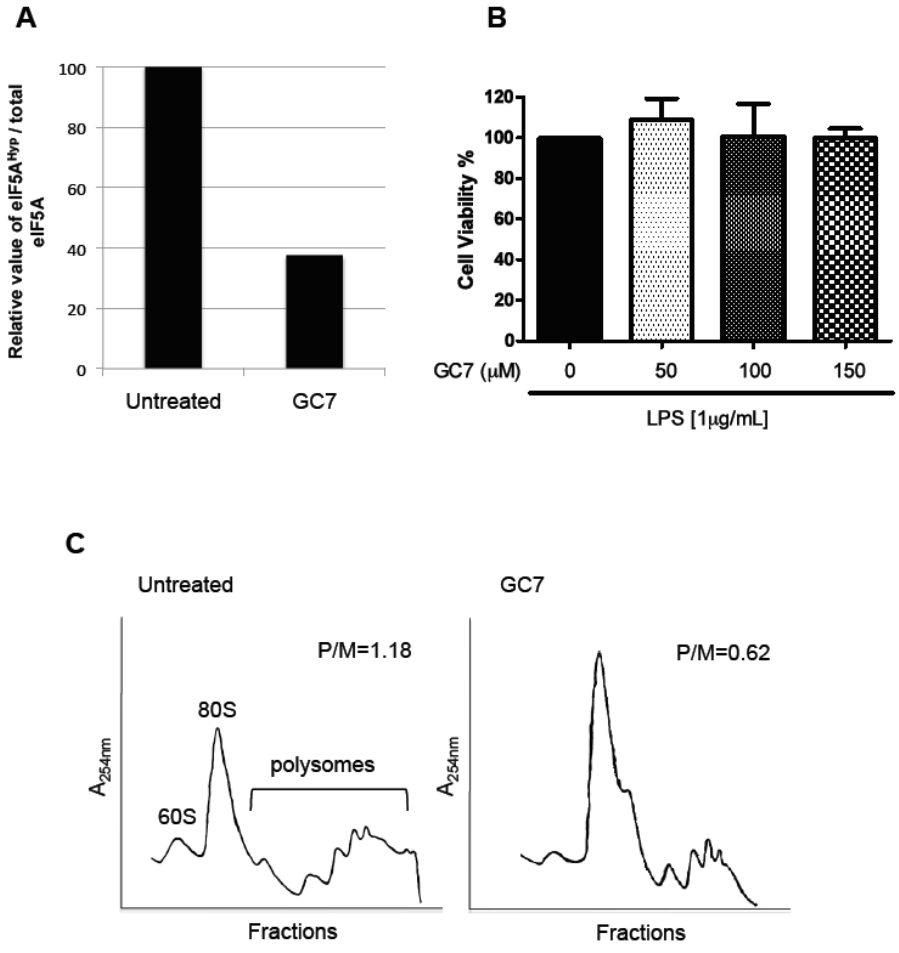


Fig. (2). (A) Inhibition of hypusine formation by GC7. Detection of hypusine-containing eIF5A of RAW264.7 cells incubated for 24 h with 2 μCi/mL [^{3}H]-spermidine and treated with 100 μM GC7. The total protein from cellular extracts obtained from untreated and GC7 treated cultures was precipitated and washed with 10% TCA and free cold spermidine. Hypusine-containing eIF5A (eIF5A^{Hyp}) was detected by scintillation counting of incorporated radiation and normalized relative to the content of total eIF5A in the cell. **(B) Cellular viability upon GC7 treatment.** Percent cell viability of cells after 16 h treatments with different concentrations of CG7 (50, 100 and 150 μM) and then LPS (1 μg/mL) for 4 h. **(C) Polysomal profile of RAW264.7 cells treated with GC7.** Polysomal profile of cells untreated or treated with 150 μM GC7. Cycloheximide was added to the growth medium shortly before harvesting. Whole cell extracts were prepared and resolved on sucrose gradients to visualize the indicated ribosomal species. 10 ODs of the lysate were loaded onto a sucrose gradient and fractionated. Optical scans (OD_{254nm}) of the gradients are shown. The areas of the 80S and polysome peaks were quantified using NIH Image J software and compared to calculate the P/M ratio.

production. We first confirmed that GC7 is able to cause a significant inhibition of hypusine formation in eIF5A in RAW264.7 cells using [^{3}H]-spermidine incorporation. As shown in (Fig. **2A**), GC7 treatment resulted in significant inhibition of eIF5A hypusination (to less than half of that observed in untreated cells). This decrease occurred after 24 h of incubation period with GC7, suggesting that, although the treatment is effective, the half-life of eIF5A in RAW264.7 cells must be as long as 15-24 h, as previously observed [19, 24, 36, 37]. On the other hand, published results have shown that, specifically in the case of INS-1 insulinoma cells, eIF5A has a short half-life (approximately 6 h) [24]. Because the eIF5A half-life may influence the effectiveness of treatment with blockers of hypusine formation, future work should address the eIF5A half-life and how this process is differentially controlled in a comprehensive number of cell lines.

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

Because eIF5A has been demonstrated to play a role in translation and to be a component of protein synthesis machinery, we also analyzed global protein synthesis using a polysome profile assay to verify the number of ribosomes associated with mRNAs in the cell. A single mRNA may associate with more than one 80S ribosome, generating a polysome. The average number of polysomes on cellular mRNAs indicates the rate of translation in the cell. Differences in polysome profiles obtained from untreated and treated cells can also distinguish whether the protein synthesis defect occurs at the initiation or elongation steps of translation. As observed in (Fig. **2C**), treatment with GC7 increased the 80S (monosome) peak and decreased the number of polysome peaks and the amount of mRNAs associated with 5 or more ribosomes (demonstrated by the area below the graph). We quantified the integrated area of the graph peaks and the polysome to monosome (P/M) ratio is clearly increased after treatment with GC7.

These results are indicative of defects in protein synthesis, particularly during the initiation step of translation. Although eIF5A has been associated with the elongation step of protein synthesis, our results agree with published data showing that in addition to blocking eIF5A function in the cell by inhibiting hypusine formation, GC7 also activates down-regulating factors of eIF2 and eIF4E as a secondary effect in the cell, resulting in the characteristic polysome profile of a defect at the initiation step of translation [28].

To further investigate the effects of GC7 on the global cell physiology, we analyzed differences in whole-cell proteome profiles between untreated cells and cells treated with GC7. To evaluate these differences in a qualitative and quantitative manner, 2D-PAGE proteome analysis was performed. The same amount of

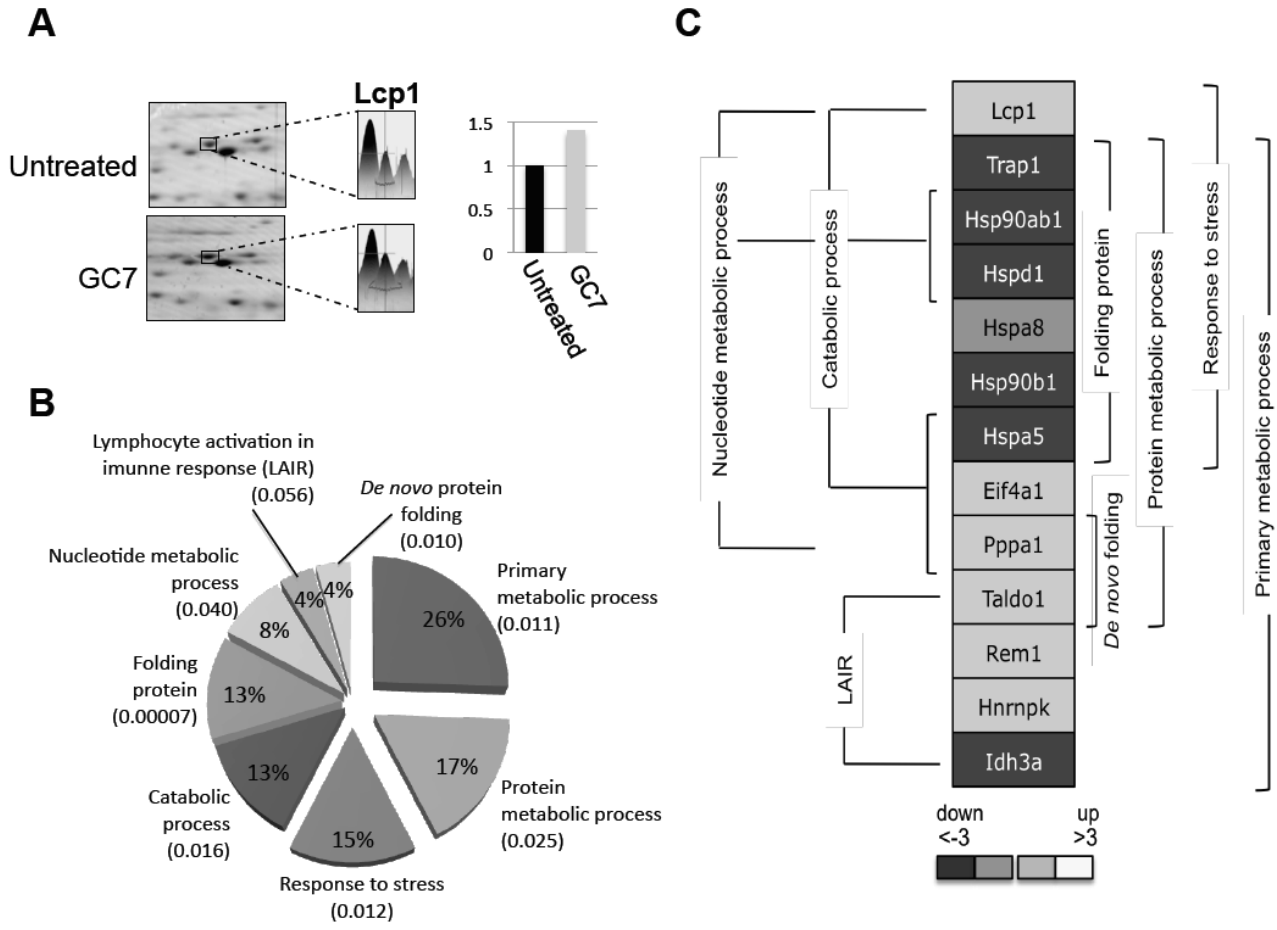


Fig. (3). Proteins identified to be up- or down-regulated in RAW264.7 cells after treatment with GC7. (A) Representative 2D electrophoresis analysis and close-up views of a regulated protein-spot, including a 3D view of spots from 2D gels of cells untreated (NT) or treated with (GC7). The protein fold-change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

whole-cell extract from RAW264.7 cells was prepared in triplicate for control (Untreated) and for GC7 treated (GC7) experiments. After performing 2D-PAGE in experimental triplicates, the images were analyzed, revealing the differential presence of 103 protein-spots after statistical validation ($p \leq 0.05$ as determined by Student's *t* test). The spots were then selected from preparative gels, and the proteins were identified by MS/MS. As an example, (Fig. **3A**) shows a close-up view of the protein-spot pair of lcp1 and a graph revealing an increase in this protein in treated cells compared to untreated cells. The functional correlation among the identified proteins was obtained by Genetic Ontology Analysis (GOA) (http: //omicslab.genetics.ac.cn/GOEAST/index.php). The GOA results reveal 13 proteins significantly correlated with GO terms, such as "metabolic process" (26%), "protein metabolic process" (17%) and "stress response" (15%), as shown in (Fig. **3B**). Figure **3C** shows the differentially expressed proteins according to their classification with regard to GOA terms. The results show no direct correlation between treatment with GC7 and specific pathways in the cell. In contrast, most proteins identified are involved in general metabolism and stress response(s) ("protein metabolism and folding", "catabolic process", "stress response"), for instance, chaperones (proteins from the Hsp90 family and Hsp70 family). It is possible to conclude from this analysis that despite causing some alterations in protein levels, GC7 does not affect specific pathways in RAW264.7 cells and has no significant physiological effect on macrophages. The data obtained so far have confirmed that GC7 is active in inhibiting eIF5A function and is not toxic to general cellular metabolism.

Finally, to address whether GC7 reproduces the anti-inflammatory effects of eIF5A-siRNA observed after administration of LPS [34], we analyzed the release of TNF-α from RAW264.7 macrophage cells following stimulation with LPS. As observed in (Fig. **4A**), at all concentrations tested, treatment with GC7 generated significant reductions in TNF-α release from macrophages challenged with LPS. These results demonstrate that GC7 is able to induce an anti-inflammatory effect in macrophages similar to the results obtained with eIF5A-siRNA in models of murine severe sepsis and acute lung injury [34]. These results are in agreement with the hypothesis that the secretion of TNF-α from macrophages is a very important factor during severe sepsis and acute lung injury. We next verified the mRNA levels for TNF-α in RAW264.7 cells stimulated with LPS and treated (or not treated) with GC7 (Fig. **4B** and **4C**). Interestingly, we observed a small but significant increase in TNF-α mRNA levels, ruling out the possibility that GC7 impairs the transcriptional induction of TNF-α gene upon LPS stimulation. The fact that there is no decrease in TNF-α mRNA levels in macrophage cells treated with GC7, while a large decrease in TNF-α protein release (into the medium) is observed, suggests that TNF-α production is posttranscriptionally regulated by eIF5A. This observation and previously published data correlating eIF5A and posttranscriptional regulation of gene expression are discussed below.

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

Although some recent studies have demonstrated proinflammatory effects of eIF5A in different models, the mechanism by which eIF5A promotes these effects remains elusive. Interestingly, as mentioned above, different studies correlating eIF5A with immune

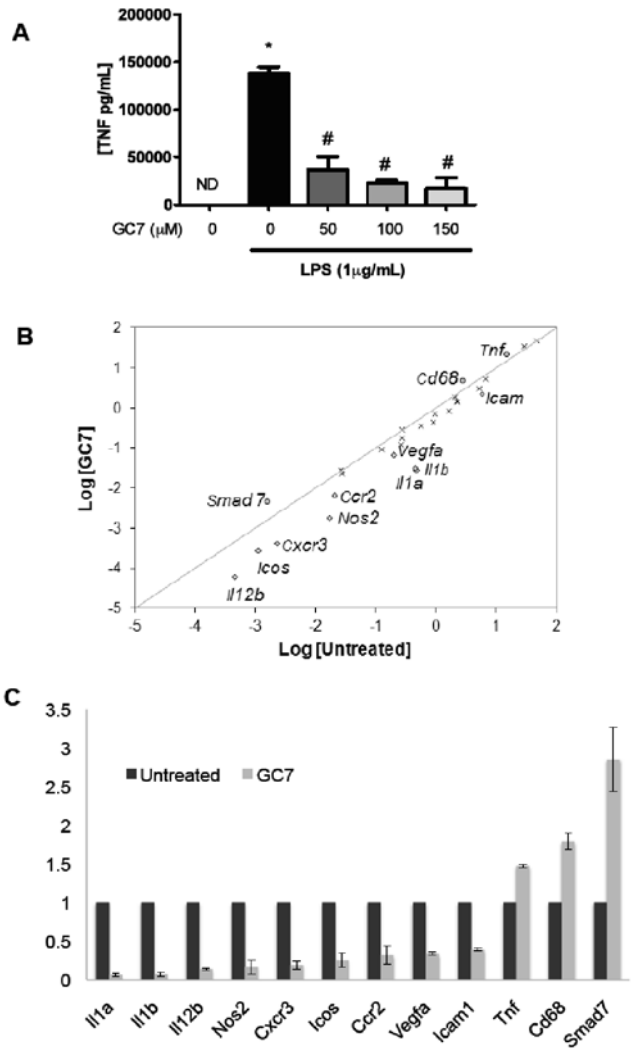


Fig. (4). Evaluation of TNF-α release and inflammatory markers mRNA levels. (A) Effect of treatment with different concentrations of GC7 for 16 h and LPS stimulation for 4 h on TNF-α release. The bar graph shows the levels of TNF-α release from RAW 264.7 cells after growth with no LPS stimulus, after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

cells or inflammation have suggested that eIF5A regulates a posttranscriptional step of gene expression [24-26]. Indeed, eIF5A has been shown to bind to RNA directly and has been implicated in the general and specific control of mRNA stability [15, 38]. On the other hand, no study has demonstrated the direct binding of eIF5A to endogenous mRNAs, and the biological relevance of such binding has not been demonstrated thus far. Because eIF5A binds to translationally active ribosomes [18], it is expected that eIF5A may be able to co-purify with cellular mRNAs from whole-cell extracts, as demonstrated for the iNOS mRNA [24]. It is also known that different populations of ribosomes co-exist in the cell [39] and it is possible that eIF5A may preferentially bind to a specific subset of these ribosomes. Moreover, we have demonstrated that eIF5A indi-

rectly affects mRNA degradation by acting at the elongation step of protein synthesis and that blocking the eIF5A function reproduces the effects caused by the small molecule cycloheximide [20], whose mechanism of action is to block translation elongation by binding to the E-site on the ribosome [40]. Therefore, eIF5A binding to ribosomes may impact the translation and the degradation rates of specific mRNAs in the cell.

CONCLUDING REMARKS AND PERSPECTIVES

Several genes involved in inflammation and immune responses harbor elements in their mRNAs that are responsible for posttranscriptional regulation of their expression through modulation of their localization and translation and degradation rates. The most studied of these mRNA consensus sequences are the AU-rich elements (AREs), which are present in mRNAs for genes such as *Il1b*, *Il6*, *Il8*, *Nos2* (iNOS), *Ptgs2* (COX-2) and *Tnfa*. In addition, the posttranscriptional regulatory element (PRE) is found in the CD83 mRNA. These elements are bound by proteins, such as tristetraprolin (TTP), BRF1, KSRP, AUF1, CUGBP2, HuR (ELAV1), TIA-1 and TIAR [41]. In the specific case of TNF-α mRNA, in addition to its tight transcriptional control, it exhibits posttranscriptional and posttranslational controls that guarantee rapid and transient production of TNF-α in response to stimuli, such as LPS and cytokines [42]. TNF-α mRNA is bound by the ARE-binding protein TTP, which renders it translationally repressed and unstable. Macrophage stimulation induces phosphorylation of HuR by both p38 and MK2, changing HuR subcellular localization from the nucleus to the cytoplasm, where it can compete with TTP for binding to TNF-α mRNA. In addition, the kinases MK2 and MK3 phosphorylate TTP, decreasing its ability to compete with HuR for binding to the mRNA ARE. HuR-bound TNF-α mRNA is translationally active, meaning that it can associate with ribosomes, initiate protein synthesis and attach to the ER (via signal recognition particle - SRP) to produce pro-TNF-α protein [43].

Given that eIF5A has been demonstrated to have a direct function in protein synthesis and is suggested to control the translation of a subset of mRNAs in the cell [44-46], it is likely that eIF5A may impact the translation or mRNA stability of these ARE-containing mRNAs. The results herein suggest that GC7 decreases the translation rates of TNF-α mRNA. Likewise, the anti-inflammatory small molecule CNI-1493 (also known as semapimod), has been also found to decrease translation of the TNF-α mRNA [47]. Interestingly, CNI-1493 has been found to be an inhibitor of the hypusine formation in eIF5A by blocking the deoxyhypusine synthase enzyme (DHS) [48], that is, acting in the same manner as GC7. Therefore, at least for the case of TNF-α mRNA, there is strong evidence that eIF5A controls specific translation. Further studies are required to determine whether eIF5A control of TNF-α mRNA translation is dependent on ARE and ARE-binding proteins or involves the direct binding of eIF5A to TNF-α mRNA. It is also important to note that the mRNAs for CD83 and iNOS genes, which have also been hypothesized to be posttranscriptionally/translationally regulated by eIF5A, harbor *cis* elements that are bound by HuR [41, 49]. Another important observation is that 3 out of 4 of the mRNAs demonstrated to have their translation regulated by eIF5A (*Chop*, *Cd83* and *Tnfa*) are translated in association with the ER. In addition, eIF5A has been shown to associate with the ER during an ER stress condition that induces CHOP mRNA translation in insulinoma INS-1 cells. Association of eIF5A with the ER has also been observed in other mammalian cell lines and in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in non-stress conditions [50, 51]. Moreover, using the yeast model, eIF5A was functionally related to Ypt1, an essential ER-to-Golgi Rab GTPase, and eIF5A association with ER membranes was found to be dependent on the translating ribosomes [19, 52]. To understand how eIF5A interferes with protein synthesis from specific mRNAs, future research should involve a more comprehensive approach to elucidate the translational control exerted by eIF5A, for instance, determining the translational or ribosomal profiles of cells treated with blockers of hypusine formation.

As mentioned earlier herein, the crystal structure of EF-P associated with the 70S and Met-tRNAi suggests that this factor has a direct role in the formation of the peptide bond [22]. To determine precisely how eIF5A is involved in translating specific mRNAs, we must work toward identifying the eIF5A binding site in the ribosome and clarifying how eIF5A and its hypusine residue affects the function of ribosomes. Our laboratory is now addressing this question for *Saccharomyces cerevisiae* and human eIF5A homologues and isoforms using several approaches, including directed hydroxyl radical probing of rRNA by eIF5A.

Finally, while this work was being prepared for publication, two studies demonstrated that EF-P is essential for the translation of poly-proline tract-containing proteins [53, 54]. Although it remains to be shown a similar function for eIF5A, this is very likely due to the structural similarities between EF-P and eIF5A. Hundreds of proteins containing poly-proline stretches are also present in the genome of eukaryotes and archaea, where eIF5A is present instead of EF-P. Interestingly, even though there are no poly-proline stretches in TNF-α protein, there are three of them in the protein tristetraprolin (TTP), which regulates TNF-α mRNA translation and stability and there is also a poly-proline stretch in TNF-α converting enzyme (TACE), which regulates shedding of mature TNF-α protein from the membrane-inserted trimeric pro-TNF-α complex [55]. Therefore, it is possible that eIF5A enhances the translation of TNF-α mRNA by directly interacting with ARE-binding proteins and the translation machinery, or eIF5A may influence the levels of TNF-α protein indirectly by determining the levels of other proteins containing poly-proline stretches that directly regulate TNF-α protein abundance. Future work will be necessary to test these possible mechanisms by which hypusine-containing eIF5A affects TNF-α production.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture

For all experiments, mouse RAW 264.7 cells were grown as adherent cells in DMEM (Life Technologies) with 10% fetal bovine serum (FBS) (Life Technologies) and gentamicin (Life Technologies) at 37°C in a humidified atmosphere of air containing 5% CO_2 for the time periods indicated in each experiment. For RNA isolation, ELISA, MTT and Polysomal Profile assays the cells were grown to 70% of confluence and treated with 1 mM aminoguanidine (Sigma) and 150 μM GC7 (N1-guanyl-1,7-diaminoheptane) (Biosearch Technologies) for 16 h and then stimulated with LPS 1 μg/mL (Sigma) for 4 h.

GC7 Cytotoxicity (MTT Assay)

Cytotoxicity of GC7 in the presence of LPS towards the RAW264.7 cells was determined using the colorimetric MTT (3-(4,5-dimethyl-thiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) as described previously [56]. Cytotoxicity was evaluated using spectrophotometry with a 595-nm interference filter.

Measurement of TNF-α Release

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

Measurement of Hypusination

RAW264.7 cells were grown to 70% confluence and treated with 1 mM of aminoguanidine, 2 μCi/mL [3H]-spermidine and 100 μM GC7 for 24 h. Then, the cells were harvested by scraping, transferred to centrifuge tubes and pelleted at 3000 rpm for 5 min at 4ºC.

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

Polysome Profile Analysis

The cultures were placed on ice and treated with 100 µg/mL cycloheximide for 10 min and then rinsed with 10 mL of ice-cold phosphate-buffered saline. Adherent cells were scraped off the plate with a plastic scraper and transferred to an RNase-free conical tube. Cells were pelleted at 4000 rpm for 4 min at 4°C. The tubes were immediately placed on ice, and the cells were lysed by gentle resuspension in 0.5 mL of cold RNase-free buffer A (50 mM NaCl, 15 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris-HCl pH7.4, and 30 U/mL RNase inhibitor RiboLock (Thermo Scientific)) containing 1% triton X-100. The lysate was cleared by centrifugation at 14,000 rpm at 4°C for 10 min and the supernatant was carefully removed and layered directly on top of a precooled 7–47% sucrose gradient in buffer A. The gradient tube was placed into a SW40Ti swinging bucket rotor (Beckman Instruments) and centrifuged at 39000 rpm for 3 h in a Beckman ultracentrifuge The gradients were then fractionated by upward displacement with 60% (w/v) sucrose using a gradient fractionator connected to a Control Unit UV-1 monitor (Amersham Pharmacia Biotech) for continuous measurement of the absorbance at 254 nm.

RNA Isolation and Quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted and purified using silica-based spin columns (Qiagen RNeasy Mini Kit), following the manufacturer's instructions. The isolated total RNA (5 µg) was reverse transcribed using a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was performed with Applied Biosystems 7500 Real Time PCR equipment, using the hydrolysis probe and SYBR Green methods. Selected target genes were measured in a 96-well TaqMan Array Immune Response plate (catalog number 4414210 - Applied Biosystems), as described by the manufacturer's protocol. The resulting data from two independent samples were analyzed based on the ΔΔCT method [57], using the geometric means of reference Gusb and Hprt1 as endogenous normalization genes. For the Il1b, Nos2 and Ptgs2 genes, specific primers were used in reaction mixtures containing the SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems). Gene expression levels were calculated based on Pfafll (2001), using the endogenous reference gene Gapdh message. Statistical significance was calculated using the two-tailed Student´s t test. P values of less than 0.05 were considered significant.

Proteomic Analysis

2D Electrophoresis. The cells were grown to 70% confluence and treated with 1 mM aminoguanidine and 150 µM GC7 for 24 h. Adhered RAW 264.7 cells were then washed with cold TBS buffer (pH 7.8), resuspended (using a cell scraper) and pelleted at 500 xg for 5 min. The cells were resuspended in 200 µL of lysis buffer (2 M thiourea, 7 M urea, 4% CHAPS, 0.5% Triton X-100, 1X PLAC, 20 mM PMSF, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM sodium orthovanadate), lysed in vortex for 1 min and clarified at 20,000 xg for 15 min. The supernatant was collected, and the total protein was quantified by Bradford assay (BioRad). Next, 300 µg of total protein were loaded onto an IPG strip (pH 4-7, 13 cm) (GE Healthcare) after mixing with 1.5% IPG buffer (pH 4-7) and DeStreak solution to a total volume of 250 µL. The strips were incubated at room temperature overnight for the rehydration step. The IPGphor 3 (GE Healthcare) running focalization conditions were as follows: 300 V for 12 h; grad – 1,000 V up to 1,000 V/h; grad – 8,000 V up to 8,000 V/h and step – 8,000 V up to 20,000 V/h. After the first dimension of electrophoresis, each strip was equilibrated in a buffer containing 50 mM Tris HCl (pH 8.8), 30% glycerol, 2% SDS, 6 M urea and 1% DTT for 20 min at room temperature. This incubation was followed by a second equilibration period of 20 min using the same buffer, except that DTT was replaced with 2.5% iodoacetamide to prevent thiol reoxidation. The second dimension electrophoresis was run in 12% SDS-PAGE on a GE Healthcare SE600 system.

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

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

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

CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that this article content has no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants to S.R.V. and A.I.M. from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and C.F.Z. from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). The authors would like to acknowledge to FAPESP and CNPq for the fellowships and the Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS) / Brazilian Biosciences National Laboratory (LNBio) for the Mass Spectrometry analysis.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material is available on the publishers Web site along with the published article.

REFERENCES

[1] Beutler BA. TLRs and innate immunity. Blood 2009; 113(7).
[2] Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. Nature 2007; 449(7164).
[3] Park BS, Song DH, Kim HM, Choi B-S, Lee H, Lee J-O. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. Nature 2009; 458(7242).

[4] Akira S. Toll-like receptor signaling. J Biological Chemistry 2003; 278(40).

[5] Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. Biochem Biophys Res Communications 2009; 388(4).

[6] Brock TG, McNish RW, Mancuso P, Coffey MJ, Peters-Golden M. Prolonged lipopolysaccharide inhibits leukotriene synthesis in peritoneal macrophages: mediation by nitric oxide and prostaglandins. Prostaglandins Other Lipid Mediators 2003; 71(3-4).

[7] Chang CF, Chau YP, Kung HN, Lu KS. The lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory response in RAW264.7 cells is attenuated by an unsaturated fatty acid-bovine serum albumin complex and enhanced by a saturated fatty acid-bovine serum albumin complex. Inflammation Res 2012; 61(2).

[8] Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. Nature Immunol 2010; 11(10).

[9] Miyamoto S, Kashiwagi K, Ito K, Watanabe S, Igarashi K. Estimation Of Polyamine Distribution And Polyamine Stimulation Of Protein-Synthesis In Escherichia-Coli. Archives of Biochemistry and Biophysics 1993; 300(1).

[10] Watanabe S, Kusamaeguchi K, Kobayashi H, Igarashi K. Estimation Of Polyamine Binding To Macromolecules And Atp In Bovine Lymphocytes And Rat-Liver. J Biological Chem 1991; 266(31).

[11] Perez-Leal O, Merali S. Regulation of polyamine metabolism by translational control. Amino Acids 2012; 42(2-3).

[12] Park MH, Nishimura K, Zanelli CF, Valentini SR. Functional significance of eIF5A and its hypusine modification in eukaryotes. Amino Acids 2010; 38(2): 491-500.

[13] Kemper WM, Merrick WC, Redfield B, Liu CK, Weissbach H. Purification And Properties of Rabbit Reticulocyte Elongation Factor-1. Archives of Biochemistry and Biophysics 1976; 174(2): 603-12.

[14] Acker MG, Kolitz SE, Mitchell SF, Nanda JS, Lorsch JR. Reconstitution of yeast translation initiation. Methods Enzymol 2007; 430: 111-45.

[15] Zanelli CF, Valentini S. Is there a role for eIF5A in translation? Amino Acids 2007; 33(2): 351-8.

[16] Caraglia M, Park M, Wolff E, Marra M, Abbruzzese A. eIF5A isoforms and cancer: two brothers for two functions? Amino Acids.1-7.

[17] Jao DLE, Chen KY. Tandem affinity purification revealed the hypusine-dependent binding of eukaryotic initiation factor 5A to the translating 80S ribosomal complex. J Cellular Biochemistry 2006; 97(3): 583-98.

[18] Zanelli CF, Maragno AL, Gregio AP, *et al*. eIF5A binds to translational machinery components and affects translation in yeast. Biochem Biophys Res Commun 2006; 348(4): 1358-66.

[19] Dias CA, Cano VS, Rangel SM, *et al*. Structural modeling and mutational analysis of yeast eukaryotic translation initiation factor 5A reveal new critical residues and reinforce its involvement in protein synthesis. Febs J 2008; 275(8): 1874-88.

[20] Gregio AP, Cano VP, Avaca JS, Valentini SR, Zanelli CF. eIF5A has a function in the elongation step of translation in yeast. Biochem Biophys Res Commun 2009; 380(4): 785-90.

[21] Saini P, Eyler DE, Green R, Dever TE. Hypusine-containing protein eIF5A promotes translation elongation. Nature 2009; 459(7243): 118-21.

[22] Blaha G, Stanley RE, Steitz TA. Formation of the first peptide bond: the structure of EF-P bound to the 70S ribosome. Science 2009; 325(5943): 966-70.

[23] Xu AG, Chen KY. Hypusine is required for a sequence-specific interaction of eukaryotic initiation factor 5A with postsystematic evolution of ligands by exponential enrichment RNA. J Biological Chem 2001; 276(4): 2555-61.

[24] Maier B, Ogihara T, Trace AP, *et al*. The unique hypusine modification of eIF5A promotes islet beta cell inflammation and dysfunction in mice. J Clin Investigation 2010; 120(6).

[25] Robbins RD, Tersey SA, Ogihara T, *et al*. Inhibition of Deoxyhypusine Synthase Enhances Islet beta Cell Function and Survival in the Setting of Endoplasmic Reticulum Stress and Type 2 Diabetes. J Biological Chem 2010; 285(51).

[26] Kruse M, Rosorius O, Kratzer F, *et al*. The inhibitor of hypusine formation, GC7, selectively inhibits CD83 expression of mature dendritic cells and affects their T cell stimulatory function. J Investigative Dermatol 2000; 114(1).

[27] Patel PH, Costa-Mattioli M, Schulze KL, Bellen HJ. The Drosophila deoxyhypusine hydroxylase homologue nero and its target eIF5A are required for cell growth and the regulation of autophagy. J Cell Biol 2009; 185(7).

[28] Landau G, Bercovich Z, Park MH, Kahana C. The Role of Polyamines in Supporting Growth of Mammalian Cells Is Mediated through Their Requirement for Translation Initiation and Elongation. J Biological Chem 2010; 285(17): 12474-81.

[29] Li CH, Ohn T, Ivanov P, Tisdale S, Anderson P. eIF5A Promotes Translation Elongation, Polysome Disassembly and Stress Granule Assembly. Plos One 2010; 5(3).

[30] Dias CAO, Borges Gregio AP, Rossi D, *et al*. eIF5A interacts functionally with eEF2. Amino Acids 2012; 42(2-3).

[31] Templin AT, Maier B, Nishiki Y, Tersey SA, Mirmira RG. Deoxyhypusine synthase haploinsufficiency attenuates acute cytokine signaling. Cell Cycle 2011; 10(7).

[32] Scheuner D, Kaufman RJ. The unfolded protein response: A pathway that links insulin demand with beta-cell failure and diabetes. Endocrine Reviews 2008; 29(3).

[33] Maier B, Tersey SA, Mirmira RG. Hypusine: a new target for therapeutic intervention in diabetic inflammation. Discov Med 2010; 10(50): 18-23.

[34] Moore CC, Martin EN, Lee G, *et al*. Eukaryotic translation initiation factor 5A small interference RNA-liposome complexes reduce inflammation and increase survival in murine models of severe sepsis and acute lung injury. J Infectious Diseases 2008; 198(9).

[35] Strand V, Kimberly R, Isaacs JD. Biologic therapies in rheumatology: lessons learned, future directions. Nat Rev Drug Discov 2007; 6(1).

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

[37] Gerner EW, Mamont PS, Bernhardt A, Siat M. Posttranslational Modification Of The Protein-Synthesis Initiation-Factor Eif-4d By Spermidine In Rat Hepatoma-Cells. Biochem J 1986; 239(2).

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

[39] Xue S, Barna M. Specialized ribosomes: a new frontier in gene regulation and organismal biology. Nat Rev Mol Cell Biol 2012; 13(6).

[40] Schneider-Poetsch T, Ju J, Eyler DE, *et al*. Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. Nat Chem Biol 2010; 6(3).

[41] Khabar KSA. Post-transcriptional control during chronic inflammation and cancer: a focus on AU-rich elements. Cellular Mol Life Sci 2010; 67(17).

[42] Gaestel M, Kotlyarov A, Kracht M. Targeting innate immunity protein kinase signalling in inflammation. Nat Rev Drug Discov 2009; 8(6).

[43] Tiedje C, Ronkina N, Tehrani M, *et al*. The p38/MK2-Driven Exchange between Tristetraprolin and HuR Regulates AU-Rich. PLoS Genet 2012; 8(9): e1002977.

[44] Park MH, Wolff EC, Folk JE. Hypusine: its post-translational formation in eukaryotic initiation factor 5A and its potential role in cellular regulation. Biofactors 1993; 4(2): 95-104.

[45] Kang HA, Hershey JW. Effect of initiation factor eIF-5A depletion on protein synthesis and proliferation of Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem 1994; 269(6): 3934-40.

[46] Zanelli CF, Valentini SR. Pkc1 acts through Zds1 and Gic1 to suppress growth and cell polarity defects of a yeast eIF5A mutant. Genetics 2005; 171(4): 1571-81.

[47] Cohen PS, Nakshatri H, Dennis J, *et al*. CNI-1493 inhibits monocyte/macrophage tumor necrosis factor by suppression of translation efficiency. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93(9): 3967-71.

[48] Sommer MN, Bevec D, Klebl B, *et al*. Screening assay for the identification of deoxyhypusine synthase inhibitors. J Biomolecular Screening 2004; 9(5): 434-8.

[49] Pieper D, Schirmer S, Prechtel AT, Kehlenbach RH, Hauber J, Chemnitz J. Functional Characterization of the HuR: CD83 mRNA Interaction. Plos One 2011; 6(8).

[50] Shi XP, Yin KC, Zimolo ZA, Stern AM, Waxman L. The subcellular distribution of eukaryotic translation initiation factor, eIF-5A, in cultured cells. Exp Cell Res 1996; 225(2): 348-56.

[51] Frigieri MC, Joao Luiz MV, Apponi LH, Zanelli CF, Valentini SR. Synthetic lethality between eIF5A and Ypt1 reveals a connection between translation and the secretory pathway in yeast. Mol Genet Genomics 2008; 280(3): 211-21.

[52] Frigieri MC, Thompson GM, Pandolfi JR, Zanelli CF, Valentini SR. Use of a synthetic lethal screen to identify genes related to TIF51A in Saccharomyces cerevisiae. Genetics Mol Res 2007; 6(1): 152-65.

[53] Ude S, Lassak J, Starosta AL, Kraxenberger T, Wilson DN, Jung K. Translation elongation factor EF-P alleviates ribosome stalling at polyproline stretches. Science. 339. United States2013;. p. 82-5.

[54] Doerfel LK, Wohlgemuth I, Kothe C, Peske F, Urlaub H, Rodnina MV. EF-P is essential for rapid synthesis of proteins containing consecutive proline residues. Science. 339. United States2013; p. 85-8.

[55] Scheller J, Chalaris A, Garbers C, Rose-John S. ADAM17: a molecular switch to control inflammation and tissue regeneration. Trends Immunol. 32. England: 2011 Elsevier Ltd 2011; p: 380-7.

[56] Mosmann T. Rapid Colorimetric Assay For Cellular Growth And Survival - Application To Proliferation And Cyto-Toxicity Assays. J Immunological Methods 1983; 65(1-2).

[57] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 2001; 25(4): 402-8.

Received: March 11, 2013 **Accepted: May 15, 2013**