

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 24/02/2025.

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

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO AMINOÁCIDO HIPUSINA

LETICIA TAMBORLIN

**Rio Claro - SP
2023**

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

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO AMINOÁCIDO HIPUSINA

LETICIA TAMBORLIN

Orientador: Prof. Dr. Augusto Ducati Luchessi

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

Rio Claro - SP

2023

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

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

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

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

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO AMINOÁCIDO HIPUSINA

AUTORA: LETICIA TAMBORLIN

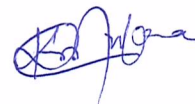
ORIENTADOR: AUGUSTO DUCATI LUCHESSI

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

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



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



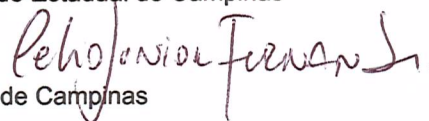
Prof. Dr. FERNANDO MOREIRA SIMABUCO (Participação Presencial)
Departamento de Bioquímica / Universidade Federal de São Paulo



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



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



Rio Claro, 24 de fevereiro de 2023

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Fernando Pessoa

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

LISTA DE FIGURAS

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

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

LISTA DE QUADROS

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

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

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

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

LISTA DE SÍMBOLOS

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

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

SUMÁRIO

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

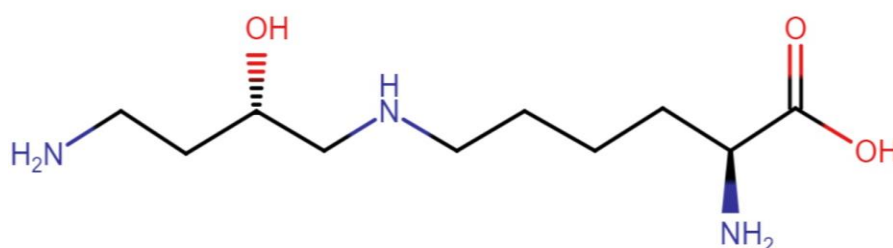
3.19 Dosagem de lactato	45
3.20 Sonda para avaliação da densidade mitocondrial: <i>MitoTracker™ Deep Red FM</i> (MTDR)	46
3.21 Sonda para avaliação do potencial de membrana mitocondrial: <i>Tetramethylrhodamine, Methyl Ester, Perchlorate</i> (TMRM).....	46
3.22 Análises estatísticas	47
4 RESULTADOS	48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

1 INTRODUÇÃO

1.1 A descoberta do aminoácido hipusina e dos dipeptídeos contendo hipusina

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

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

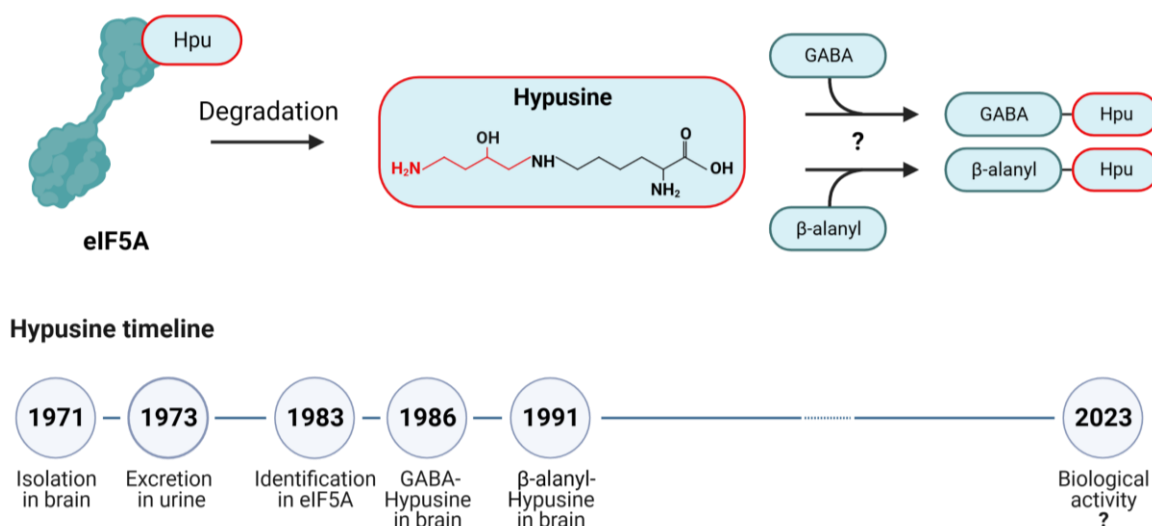


Fonte: Base de dados Reaxys® Copyright © 2022 Elsevier Life Sciences IP Limited. Reaxys é uma marca registrada da Elsevier Life Sciences IP Limited (Reaxys ID: 5737313). Disponível em: <https://www.reaxys.com/#/structure-editor>. Acessado em: 22/03/2022.

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

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

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



Fonte: Elaborada pela autora.

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

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

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

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

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

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

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

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

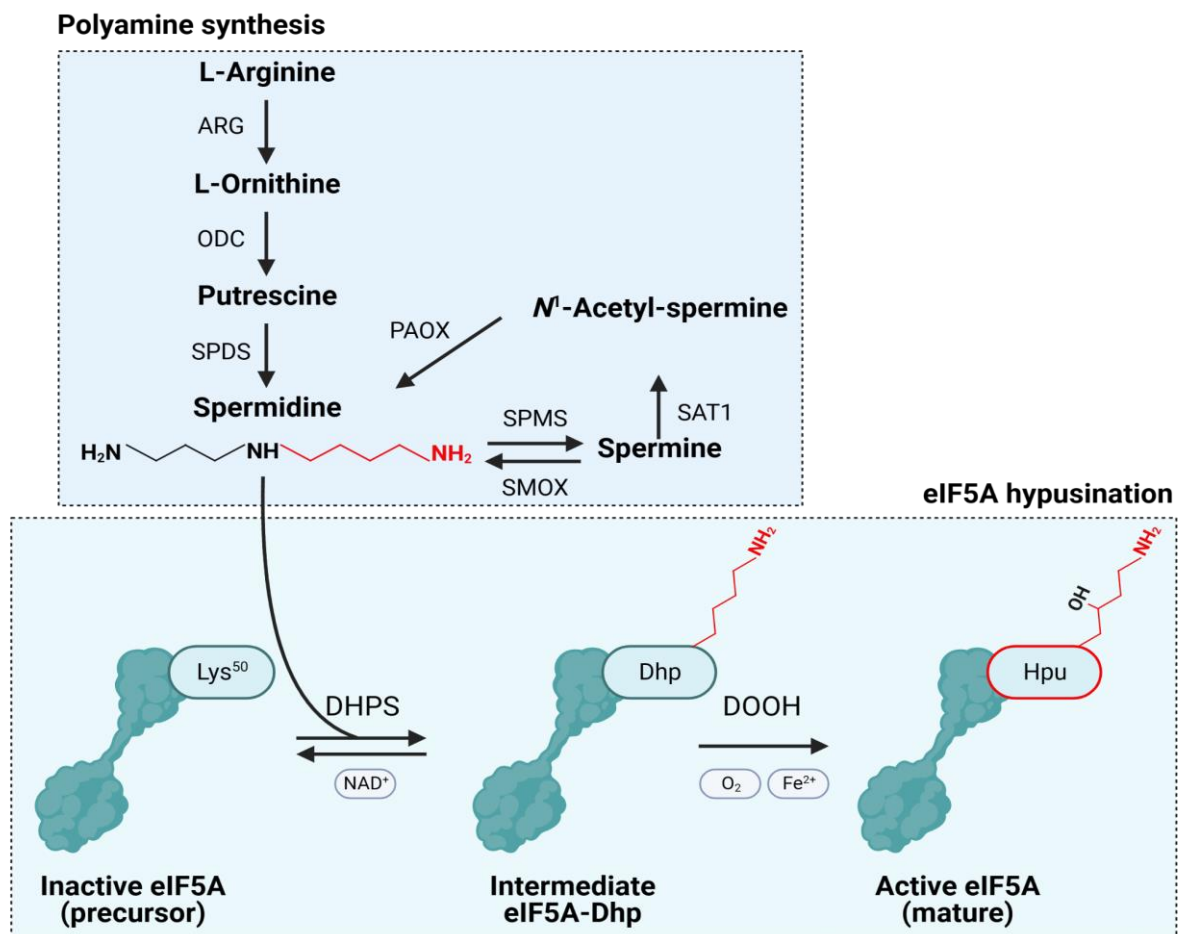
entre seus homólogos de *archaeas*, principalmente nas regiões flangeadoras ao resíduo do aminoácido hipusina (KLIER; CSONGA; JOÃO; ECKERSKORN *et al.*, 1995; KLIER; WOHL; ECKERSKORN; MAGDOLEN *et al.*, 1993; PARK; LEE; JOE, 1997; PARK; WOLFF; FOLK, 1993a). O padrão de conservação de eIF5A evidencia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

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

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

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

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



Fonte: Elaborada pela autora.

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

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

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

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

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

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

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

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

6 CONCLUSÃO

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

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

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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