UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia de Fermentações

Estudos estruturais e funcionais de Tsa1 de *Saccharomyces cerevisiae*: um modelo biológico para o estudo de inibidores de crescimento celular para leucemia linfóide aguda.

Melina Cardoso dos Santos

Dissertação para obtenção do título de Mestre

Orientadora: Gisele Monteiro

São Paulo

2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia de Fermentações

Estudos estruturais e funcionais de Tsa1 de *Saccharomyces cerevisiae*: um modelo biológico para o estudo de inibidores de crescimento celular para leucemia linfóide aguda.

Melina Cardoso dos Santos

Versão Original

Dissertação para obtenção do título de Mestre

Orientadora: Prof^a Dr^a Gisele Monteiro

São Paulo

2017

Nome: SANTOS, Melina Cardoso.

Título: Estudos estruturais e funcionais de Tsa1 de *Saccharomyces cerevisiae*: um modelo biológico para o estudo de inibidores de crescimento celular para leucemia linfóide aguda.

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Aprovada em :

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Julgamento: _____	Assinatura: _____

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Julgamento: _____	Assinatura: _____

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Julgamento: _____	Assinatura: _____

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Julgamento: _____	Assinatura: _____

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Julgamento: _____	Assinatura: _____

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

S237e	Santos, Melina Cardoso dos Estudos estruturais e funcionais de Tsal de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : um modelo biológico para o estudo de inibidores de crescimento celular para leucemia linfóide aguda / Melina Cardoso dos Santos. -- São Paulo, 2017. 64p. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica Orientador : Souza, Gisele Monteiro de Co-orientador : Oliveira, Marcos Antonio de 1. Enzima : Biotecnologia 2. Neoplasias 3. Antibióticos I. T. II. Souza, Gisele Monteiro de, orientador, III. Oliveira, Marcos Antonio de, co-orientador. 620.8 CDD
-------	--

RESUMO

Santos, M. C. **Estudos estruturais e funcionais de Tsa1 de *Saccharomyces cerevisiae*: um modelo biológico para o estudo de inibidores de crescimento celular para leucemia linfóide aguda**. 2017. 64f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

As peroxirredoxinas (Prx) são enzimas antioxidantes que se destacam pela capacidade de decompor uma grande variedade de hidroperóxidos com elevada eficiência (10^6 – $10^8 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$), mantendo essas moléculas em níveis adequados à homeostase celular. Entretanto, já foi demonstrado que em diversos tipos tumorais os níveis de Prx são extremamente aumentados e experimentos envolvendo sua inativação resultam na diferenciação ou apoptose de células tumorais. Recentemente, foi descoberto um diterpenóide denominado adenantina que seria o primeiro inibidor para as Prx1 e Prx2 de humanos e foi demonstrada que sua aplicação em células de leucemia mieloide aguda promoveu diferenciação ou apoptose dessas células. Nesse contexto, o presente trabalho apresenta duas vertentes: 1) A caracterização das alterações estruturais e funcionais promovidas pela ligação da adenantina ao sítio ativo das Prx utilizando Tsa1 de *Saccharomyces cerevisiae* como modelo biológico, em função da sua alta similaridade com Prx2 de humanos; 2) Avaliação da atividade antitumoral dose dependente de adenantina sobre as linhagens celulares REH e MOLT-4 de leucemia linfóide aguda. No que concerne à primeira linha de investigação, nossos resultados revelam que Tsa1 é suscetível à inibição por adenantina, uma vez que o tratamento reduziu em ~66 % a velocidade de decomposição de peróxido de hidrogênio. Adicionalmente, a mutação da Thr⁴⁴ de Tsa1, pertencente à chamada tríade catalítica, por uma Ser resultou em uma proteína mais suscetível a alterações na estrutura secundária e à inibição da atividade peroxidásica em função da ligação com adenantina, apresentando uma diminuição de ~85% na velocidade de reação. Características semelhantes foram observadas para a proteoforma Tsa2 de *S. cerevisiae*, que carrega naturalmente a substituição da Thr⁴⁴ pela Ser. Análises de sequências de Prx em bancos de dados revelaram que majoritariamente proteínas contendo Ser são encontradas em organismos procariotos, muitos deles patogênicos. Finalmente, demonstramos por meio de ensaios citotoxicidade que as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, que possuem uma Ser na tríade catalítica, têm seu crescimento inibido pelo tratamento com adenantina (IC_{50} de $460 \mu\text{M}$ e $77 \mu\text{M}$, respectivamente), enquanto que para *Escherichia coli*, que possui Thr nessa posição, a toxicidade da adenantina foi bastante baixa (não foi possível determinar o IC_{50} nas condições utilizadas). Dessa forma, os dados apresentados neste trabalho demonstram o potencial da utilização da adenantina tanto como antibiótico quanto como antileucêmico.

Palavras chave: Peroxirredoxinas. Adenantina. Inibição enzimática. Leucemia linfóide aguda. Antibiótico.

ABSTRACT

Santos, M. C. **Functional and structural evaluation of Tsa1 from *Saccharomyces cerevisiae*: a biological model for study of cellular growth inhibitors for acute lymphocytic leukemia**. 2017. 64f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Peroxiredoxins (Prx) are antioxidant enzymes which stand out due the ability to decompose a wide variety of hydroperoxides with high efficiency (10^6 – $10^8 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) maintaining these molecules at suitable levels to cellular homeostasis and participating in several signaling events. However, it has been shown that, in many tumor types, Prx levels are extremely increased and experiments involving its inactivation have resulted in differentiation or apoptosis of tumor cells. It was recently found a diterpenoid, called adenanthin, that would be the first human Prx1 and Prx2 inhibitor and it was demonstrated that its application in acute myeloid leukemia cells was able to promote differentiation or apoptosis. In this context, this work presents two lines of research: 1) Characterization of structural and functional changes promoted by adenanthin binding to Prx active site using Tsa1 from *Saccharomyces cerevisiae* as biological model, due to its high similarity to human Prx2. 2) Evaluation of adenanthin dose-dependent antitumor activity over the acute lymphoid leukemia cell lines REH and MOLT-4. As regards the first line of research, our result reveal that Tsa1 is susceptible to inhibition by adenanthin, since the treatment with this binder reduced the hydrogen peroxide decomposition velocity in ~ 66%. In addition, the replacement of Thr⁴⁴ from Tsa1, aminoacid belonging to the so-called catalytic triad, by a Ser resulted in a protein more susceptible to alterations in secondary structure and to peroxidase activity inhibition in function of adenanthin binding, presenting ~85% of decrease in reaction velocity. Similar characteristics were observed for Tsa2 proteoform from *S. cerevisiae*, which naturally carries the substitution of Thr⁴⁴ by Ser. Prx sequences analyzes in databases revealed that mostly Ser-containing proteins are found in prokaryotic organisms, many of them pathogenic ones. Finally, we demonstrate through cytotoxicity assays that the bacteria *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*, which have a Ser in catalytic triad, have their growth inhibited by adenanthin treatment (IC₅₀ of 460µM and 77µM, respectively), whereas for *Escherichia Coli*, which has Thr at that position, the toxicity of adenanthin was quite low (it was not possible to determine the IC₅₀ under the used conditions). Regarding the second line of investigation, we found that adenanthin is able to induce the death of leukemic cell lines REH and MOLT-4, and for the last one, there was an unexpected proliferation of cells treated by the longest incubation period (72 hours), characterizing a possible indication of differentiation process. In this sense, the data presented here demonstrate the potential of adenanthin use in both antibiotic and antileukemic treatments.

Keywords: Peroxiredoxins. Adenanthin. Enzyme inhibition. Acute lymphoid leukemia. Antibiotic.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hidroperóxidos: tipos e relevância em processos biológicos

Hidroperóxidos (HPx) constituem um grupo heterogêneo de moléculas presentes nos organismos vivos e são representados pela fórmula geral R-OOH. O grupo R pode ser um elemento químico, como no caso do peroxinitrito (NOOH) e peróxido de hidrogênio (HOOH ou H₂O₂), sendo o último o mais abundante nas células (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2010). Ainda, o grupo R também pode representar um grupo orgânico, como os HPx baseados em aminoácidos (AA-OOH), proteínas (P-OOH) e lipídeos (Lp-OOH), esses últimos representando os HPx orgânicos mais abundantes nos seres vivos (DAVIES, M J; FU; DEAN, 1995; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2010; SEIFRIED *et al.*, 2007). Em concentrações elevadas, os HPx são extremamente tóxicos para as células e estão relacionados com diversas doenças em humanos como hipertensão, diabetes, mal de Alzheimer, processos inflamatórios, câncer e processos de envelhecimento (DAVIES, MICHAEL J, 2005; FINKEL, 2003).

O H₂O₂ não é um radical livre, uma vez que não possui elétrons desemparelhados na última camada e é relativamente estável. Adicionalmente, diversos trabalhos apontam sua grande capacidade de difusão em membranas celulares, incluindo a membrana nuclear e a citoplasmática, podendo atingir todos os compartimentos celulares e até mesmo células ou tecidos vizinhos (DAVIES, M J; FU; DEAN, 1995; DAVIES, MICHAEL J, 2005; FINKEL, 2003; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2010; SEIFRIED *et al.*, 2007). Por sua vez, HPx como o NOOH e os Lp-OOH, podem promover uma reação em cadeia em membranas biológicas promovendo peroxidação lipídica, o que causa desorganização da membrana e perda de fluidez, podendo culminar em seu rompimento (DAVIES, M J; FU; DEAN, 1995; DAVIES, MICHAEL J, 2005; FINKEL, 2003; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2010; SEIFRIED *et al.*, 2007). Entretanto, a maior toxicidade dos HPx ocorre de modo indireto através de sua interação com metais de transição como o Fe²⁺, gerando espécies radicalares como o radical hidroxila ([•]OH) através de reações como as de Fenton e Haber-Weiss (DAVIES, M J; FU; DEAN, 1995; DAVIES, MICHAEL J, 2005; FINKEL, 2003; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2010; SEIFRIED *et al.*, 2007). O radical [•]OH é uma espécie altamente reativa, capaz de oxidar carboidratos, lipídios, proteínas e DNA, sendo extremamente tóxica uma vez que as células não dispõem de sistemas enzimáticos envolvidos em sua decomposição

(HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2010; ROUAULT, 2015). Dessa forma, seria favorável para a célula que os HPx fossem decompostos rapidamente.

Por outro lado, trabalhos recentes têm demonstrado que, em baixas concentrações, os HPx desempenham papéis fundamentais em processos celulares como ativação/repressão de fatores de transcrição, crescimento, eventos de sinalização, senescência e apoptose (FINKEL, 2003; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2010). Esses diferentes efeitos são o reflexo de variações sutis nas concentrações de HPx na célula ou do período de exposição a eles (FINKEL, 2003; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2010). Dessa forma, a homeostase celular é atingida graças ao balanço entre oxidantes e antioxidantes através de reações de oxido-redução envolvendo a transferência de elétrons entre doadores (oxidados) e receptores (reduzidos) (SEIFRIED *et al.*, 2007). Nesse sentido, apesar das funções celulares exercidas pelos HPx em baixos níveis celulares, seu excesso pode desequilibrar a homeostase celular causando um fenômeno conhecido como estresse oxidativo. Para manter o equilíbrio necessário e regular as atividades dos HPx, as células utilizam moléculas de baixo peso molecular como a glutathione e o ácido ascórbico, dentre outras, bem como de enzimas antioxidantes como as glutathione peroxidases (GPx), catalases (Cat) e peroxirredoxinas (Prx) (DAY *et al.*, 2012; KANG, S. W. *et al.*, 2005; MONTEIRO *et al.*, 2007; POWIS; KIRKPATRICK, 2007; SZABÓ *et al.*, 2009; THOMSEN; MILES, 1998) as quais serão discutidas em detalhe posteriormente.

1.2 Câncer e HPx

O câncer é a segunda maior causa de morte nos países ocidentais. Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), anualmente surgem 14,1 milhões de novos casos e ocorre um total de 8,2 milhões de mortes por câncer, em todo o mundo. Embora o diagnóstico precoce seja de extrema importância para o sucesso do tratamento desta doença, ele nem sempre significa a garantia de cura, pois os mecanismos pelos quais o câncer progride ainda são pouco elucidados e, muitas vezes, os tratamentos são inespecíficos, de baixa eficácia e com grande diversidade de efeitos colaterais (EREJUWA; SULAIMAN; WAHAB, 2013; HUSSAIN; HOFSETH; HARRIS, 2003).

Muitos pesquisadores consideram que o câncer é uma doença genética causada pela aquisição de múltiplas mutações em genes que controlam a proliferação celular, morte celular e instabilidade genômica. Esta hipótese, denominada de teoria da mutação somática, tem sido o paradigma predominante para explicar processos neoplásicos nas últimas décadas (LÓPEZ-

LÁZARO, 2007). No entanto, um número crescente de evidências experimentais contradizem esta hipótese e outras teorias estão sendo desenvolvidas ou revisadas. Muito recentemente, análises matemáticas robustas indicam baixa influência do ambiente sobre as neoplasias e as correlacionam com fatores genéticos baseados no número de divisões de células tronco levando em conta sua origem tecidual (LÓPEZ-LÁZARO, 2007). No entanto, é consenso que as células têm de desenvolver várias capacidades de modo a tornar-se um tumor maligno como: aumento da proliferação celular (causada, em parte, pela resistência à inibição do crescimento e independência da estimulação mitogênica), resistência à apoptose, imortalização celular, aumento da angiogênese e invasão/metástase. Considera-se que a instabilidade genômica é um evento chave que permite a aquisição destas capacidades.(EREJUWA; SULAIMAN; WAHAB, 2013; HUSSAIN; HOFSETH; HARRIS, 2003; LÓPEZ-LÁZARO, 2007)

Neste contexto, diversos trabalhos demonstram que o aumento nas concentrações celulares de HPx pode explicar todas estas características das células neoplásicas. Já foi demonstrado que os HPx estão associados com danos no DNA, mutações e instabilidade genômica pela geração do $\cdot\text{OH}$ e vários estudos demonstraram que o H_2O_2 pode induzir a proliferação de células, resistência à apoptose, aumento da angiogênese, invasão tecidual e metástase (DAVIES, M J; FU; DEAN, 1995; DAVIES, MICHAEL J, 2005; EREJUWA; SULAIMAN; WAHAB, 2013; FINKEL, 2003; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2010; HUSSAIN; HOFSETH; HARRIS, 2003; LÓPEZ-LÁZARO, 2007; SEIFRIED *et al.*, 2007). De fato, estes estudos mostram que o aumento nos níveis de expressão de peroxidases reduz proliferação celular, promove a apoptose, e é capaz de inibir a invasão, metástase e angiogênese.

O papel dos HPx na carcinogênese é apoiado por dados experimentais que demonstraram que as células cancerosas geralmente têm níveis elevados de H_2O_2 . Já foi demonstrado que várias linhagens de células tumorais, representando uma grande variedade de tecidos, produzem elevadas quantidades de H_2O_2 , comparáveis com às produzidas em neutrófilos (LÓPEZ-LÁZARO, 2007). Entretanto, trabalhos recentes demonstram que um aumento ainda maior dos níveis celulares de H_2O_2 , usando drogas geradoras de HPx, pode ser uma maneira eficiente de matar as células cancerosas. De fato, o efeito anticancerígeno de alguns agentes quimioterápicos correntemente utilizados no tratamento do câncer (Paclitaxel, Docetaxel e Trióxido de arsênio, por exemplo) é mediada, pelo menos em parte, por um aumento dos níveis celulares de HPx (ALEXANDRE *et al.*, 2006; SATO *et al.*, 2013; WOO *et al.*, 2002). Ainda não é bem compreendido por que concentrações específicas de H_2O_2

podem matar células cancerosas seletivamente. Tem sido proposto que, em células normais, os níveis de HPx são regulados por peroxidases e mantidos adequados à homeostase, enquanto que em células tumorais, esses níveis elevados de HPx se encontram no limiar de citotoxicidade (Figura 1) (FLOHE *et al.*, 2011; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2010; IMMENSCHUH; BAUMGART-VOGT, 2005; LÓPEZ-LÁZARO, 2007).

Figura 1: Diferentes efeitos biológicos em razão da concentração intracelular de HPx. Os baixos níveis de HPx desempenham papéis fisiológicos na sinalização celular. O aumento constitutivo dos níveis intracelulares de HPx tem sido associado com o processo de carcinogênese. Níveis mais elevados de H_2O_2 podem induzir a morte celular.

1.3 Diversidade e características de peroxidases

As principais peroxidases responsáveis por auxiliar na regulação dos níveis intracelulares de HPx são representadas pelas enzimas Cat, GPx e Prx. Diversos trabalhos utilizando RNA de interferência e *knockout* gênico tem demonstrado que a inativação destas enzimas interfere fortemente no estabelecimento, progressão e resistência a tratamentos por radio e quimioterapia de neoplasias (FLOHE *et al.*, 2011; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2010; IMMENSCHUH; BAUMGART-VOGT, 2005; KANG, D. H. *et al.*, 2013; LÓPEZ-LÁZARO, 2007).

Neste contexto, as Prx se destacam por aspectos como distribuição celular, abundância, reatividade sobre HPx e variedade de substratos. De fato, enquanto a Cat está normalmente presente no citosol e mitocôndria, foram descritas seis proteoformas de Prx em humanos e ratos (Prx1-Prx6), e cinco proteoformas em *Saccharomyces cerevisiae* (Tsa1, Tsa2, Ahp1, Prx1 e nTPx), as quais se encontram distribuídas pelo citoplasma, mitocôndria, peroxissomo, retículo endoplasmático e núcleo (JANG *et al.*, 2004; PARK *et al.*, 2000; WOOD, Z. A *et al.*, 2003). Adicionalmente, já foi demonstrado que, em eucariotos, as Prx estão entre as enzimas mais abundantes. Em *S. cerevisiae* somente a proteoforma citosólica Tsa1 possui 378.000 cópias por célula, muito superior às proteoformas de outras peroxidases somadas como as Cat (8.000 cópias/cél.) e as GPx (10.000 cópias/cél.) (GHAEMMAGHAMI *et al.*, 2003). Seu ortólogo em humanos, a proteoforma Prx2, está entre as dez enzimas mais

abundantes nos mais distintos tipos celulares (HALL; KARPLUS; POOLE, 2009; WOOD, Z. A *et al.*, 2003). Outro aspecto de elevada importância das Prx reside na variedade de substratos e reatividade sobre eles. Enquanto a Cat é capaz de decompor somente H_2O_2 com constante de $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, as Prx e as GPx apresentam constantes de segunda ordem de $10^{7-8} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ e são capazes de decompor uma grande variedade de HPx, incluindo H_2O_2 , Lp-OOH e NOOH (OGUSUCU *et al.*, 2007; TAIRUM *et al.*, 2012). No caso das Prx, também foi demonstrado que são capazes de decompor P-OOH e AA-OOH com eficiência moderada ($10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (PESKIN *et al.*, 2010).

1.4 Características funcionais e estruturais de Prx

Em contraste com outras peroxidases, como Cat e Gpx, as Prx não possuem grupamentos prostéticos ou resíduos de selenocisteína e a decomposição do HPx é efetuado por meio de um resíduo de cisteína altamente reativo, denominado de cisteína peroxidásica (C_P), localizado próximo a região N-terminal da enzima (HALL; KARPLUS; POOLE, 2009; TAIRUM *et al.*, 2012; WOOD, Z. A *et al.*, 2003). As Prx constituem uma família de enzimas bastante heterogênea e diversas classificações já foram propostas, sendo que a mais utilizada subdivide essas proteínas em três grandes grupos (Prx 1-Cys, Prx 2-Cys típicas e Prx 2-Cys atípicas) de acordo com a quantidade de resíduos de cisteína envolvidos no processo de redução do peróxido (WOOD, Z. A *et al.*, 2003). As Prx 1-Cys são proteínas homodiméricas que apresentam apenas um resíduo de cisteína (C_P) na região N-terminal. Já as Prx 2-Cys possuem dois resíduos de cisteína, um na região N-terminal (C_P) e um segundo na C-terminal, denominado de cisteína de resolução (C_R), que durante o ciclo catalítico forma um dissulfeto $\text{C}_\text{P} - \text{C}_\text{R}$, sendo que as Prx 2-Cys típicas apresentam-se em homodímeros e formam uma ligação dissulfeto intermolecular durante o ciclo catalítico, e as Prx 2-Cys atípicas apresentam-se como monômeros ou dímeros e formam uma ponte dissulfeto intramolecular. A partir daqui somente iremos nos referir às Prx 2-Cys típicas, que são alvo desta investigação.

Na decomposição de HPx as Prx 2-Cys típicas fazem uso de C_P , a qual é mantida na forma de tiolato ($\text{C}_\text{P}-\text{S}^-$) em razão do microambiente do sítio ativo, sendo posicionada entre um resíduo de Thr/Ser e uma Arg. A função tiól (SH) de C_P é fixada e polarizada pela ligação de hidrogênio do grupo hidroxila da Thr e a dissociação $\text{SH} \rightarrow \text{S}^-$ é forçada pelo grupo guanidina carregado positivamente da cadeia lateral da Arg. Os resíduos de C_P , Thr/Ser e Arg estão presentes em todas as Prx caracterizadas até o presente momento e coletivamente são

denominados de tríade catalítica (FLOHE *et al.*, 2011; GHAEMMAGHAMI *et al.*, 2003; HALL; KARPLUS; POOLE, 2009; IMMENSCHUH; BAUMGART-VOGT, 2005; JANG *et al.*, 2004; KANG, D. H. *et al.*, 2013; PARK *et al.*, 2000; WOOD, Z. A *et al.*, 2003). Neste microambiente, C_P é capaz de atacar a ligação O-O do HPx formando cisteína ácido sulfênico (C_P-SOH) que subsequentemente é condensada em um dissulfeto intermolecular com a cisteína de resolução (C_R). Para que a enzima seja capaz de decompor outra molécula de HPx, é necessária a redução do dissulfeto, uma tarefa frequentemente executada por uma proteína de baixa massa molar (11 kDa) denominada de tiorredoxina (Trx). A Trx, por sua vez, recebe equivalentes redutores do NADPH com o auxílio da proteína tiorredoxina redutase (TrxR) *via* uma molécula de FAD (HOLMGREN; LU, 2010; PESKIN *et al.*, 2010; TAIRUM *et al.*, 2012) (Figura 2).

Figura 2: Sistema redutor das Prx 2-Cys. A ligação dissulfeto da Prx oxidada é reduzida pela enzima Trx que, por sua vez, torna-se oxidada, sendo então reduzida pela enzima TrxR que utiliza elétrons provenientes do NADPH *via* uma molécula de FAD.

Normalmente, as Prx 2-Cys típicas são consideradas como homodímeros, entretanto, diversos trabalhos demonstram que estas enzimas podem se apresentar como dímeros α_2 e decâmeros $\alpha_2(5)$, através da associação de cinco dímeros (Figura 3) (PARSONAGE, DEREK *et al.*, 2005; TAIRUM *et al.*, 2012). A hipótese levantada para esta associação seria de uma interação cooperativa entre os dímeros de forma a aumentar a eficiência catalítica na decomposição de HPx (PARSONAGE, DEREK *et al.*, 2005).

Figura 3: Estruturas quaternárias apresentadas por Prx 2-Cys típicas. A) Dímero de Tsa1 de levedura representado em *cartoon*. Um monômero é colorizado em verde e o monômero adjacente em amarelo. B) Decâmero do tipo $\alpha 2[5]$, formado pela associação de cinco dímeros. A unidade dimérica superior está colorizada em verde e amarelo e o restante dos dímeros está representado em vermelho. As figuras foram geradas utilizando as coordenadas da Prx Tsa1 de *S. cerevisiae* (PDB: 3SBC) com o auxílio do programa Pymol (<http://www.pymol.org/>).

1.5 Envolvimento das Prx em eventos de crescimento celular e câncer

Já foi demonstrado que as Prx1 e Prx2, duas proteoformas citosólicas de Prx de mamíferos, são capazes de eliminar o H_2O_2 intracelular gerado como resultado de estimulação dos receptores de sinalização celular localizados na membrana plasmática (KANG, S. W. *et al.*, 2005). A superexpressão de Prx1 e Prx2 em células em cultura reduz drasticamente os níveis intracelulares de H_2O_2 gerados em resposta ao PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), EGF (fator de crescimento epidérmico), TSH (tirotropina) e TRAIL (ligantes indutores de apoptose relacionados à TNF (fator de necrose tumoral)) (KANG, S. W. *et al.*, 2005). Adicionalmente, foi observado que a expressão destas proteínas também levou ao bloqueio da atividade do ativador de transcrição NF κ B (fator nuclear kappa B). Esse ativador é induzido pela adição extracelular de H_2O_2 , permitindo a apoptose de células de câncer cervical pela atividade de membros da família TNF (LEE, J. Y. *et al.*, 2009; MIKI; FUNATO, 2012). Também já foi evidenciado que Prx2 regula MAPK distintas. Sob estimulação de TNF, na qual a atividade de Prx2 foi bloqueada ou parcialmente abolida (*knockout* ou RNA de interferência), a atividade de JNK (c-Jun N-terminal quinase) e P38 MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno) foi aumentada (KANG, S. W. *et al.*, 2005). Na tentativa de relacionar Prx1 e Prx2 com eventos de crescimento celular, vários trabalhos demonstraram que essas proteoformas apresentam níveis elevados em tipos distintos de cânceres em diferentes órgãos e tecidos como esôfago, pâncreas, tireoide, pulmão e mama (KANG, S. W. *et al.*, 2005; LEE, J. Y. *et al.*, 2009; MIKI; FUNATO, 2012). A elevada expressão também relaciona Prx1/Prx2

a um fenótipo mais agressivo de células cancerosas, em razão de uma maior resistência à quimioterapia e à radioterapia (KANG, S. W. *et al.*, 2005; LEE, J. Y. *et al.*, 2009; MIKI; FUNATO, 2012).

Em adição aos tumores sólidos descritos acima, também já foi demonstrado o envolvimento de Prx em neoplasias de células sanguíneas, coletivamente denominadas de leucemias. As leucemias as ser subdivididas de acordo com o tipo celular de origem como leucemia linfóide ou leucemia mieloide, ambas podendo apresentar-se como agudas ou crônicas. Diversos resultados experimentais indicam que o sinal promovido por HPx desempenha um papel importante nos sistemas hematopoiéticos, que convergem para o conceito de que a modulação da abundância de HPx é crítico na regulação do equilíbrio entre auto-renovação e diferenciação das células tronco hematopoiéticas (ZHOU; SHAO; SPITZ, 2015). De fato, já foi proposto o aumento do nível de H_2O_2 como um fator intracelular fundamental para a diferenciação das células mielóides e linfóides e várias investigações demonstram que os mecanismos de sinalização dependentes de HPx contribuem para a interrupção do crescimento e/ou indução de diferenciação de linhagens de células leucêmicas. Neste contexto, já foi demonstrado que a Prx2 se encontra significativamente aumentada em quase todos os subtipos de leucemia mieloide aguda (LMA) sendo considerada um alvo potencial para fármacos antitumorais (LIU *et al.*, 2012, 2013; LUDIN *et al.*, 2014; TOTHOVA *et al.*, 2007).

1.6 Inibição de Prx2-Cys típicas por adenantina e efeito em células tumorais

Os compostos extraídos de plantas despertam um interesse especial da indústria farmacêutica em função de sua potencialidade para o desenvolvimento de novas drogas. Entre esses compostos naturais encontram-se os diterpenóides, uma ampla classe de metabólitos secundários com significativa atividade biológica que vem sendo investigada quanto à sua eficácia no tratamento de diversas doenças como câncer, doenças cardiovasculares e inflamatórias (TIRAPELLI *et al.*, 2008). Recentemente, foi demonstrado que a adenantina, um diterpenóide extraído das folhas de *Isodon adenantha*, possui propriedades antitumorais (LIU *et al.*, 2012, 2013). Liu e colaboradores (2012) observaram que a adenantina possui a capacidade de induzir a diferenciação de células de LMA, a forma de leucemia aguda mais comum entre adultos (LIU *et al.*, 2012). Na LMA ocorre um bloqueio da diferenciação de células sanguíneas em estágios específicos de maturação, impedindo a especialização celular

e levando a proliferação descontrolada de células leucêmicas. Acredita-se que essa diferenciação seja mediada por HPx, em especial o H_2O_2 , e portanto, regulada por peroxidases (LIU *et al.*, 2012).

Através de análises bioquímicas e de biologia molecular foi demonstrado que os alvos biológicos da adenantina eram as proteoformas citosólicas Prx1 e Prx2, as quais são evolutivamente relacionadas e possuem homologia na sequência de aminoácidos (78% de identidade e 91% de similaridade) (LEE, W. *et al.*, 2007). Apesar de Prx1 e Prx2 apresentarem similaridades com outras proteoformas de Prx humanas (Prx3, Prx4, Prx5 e Prx6), não foi detectada a ligação de adenantina a nenhuma delas (LIU *et al.*, 2012, 2013). Adicionalmente, utilizando mutantes tanto para a cisteína peroxidásica (C_P) quanto para a de resolução (C_R), foi demonstrado que a ligação da adenantina ocorria especificamente com C_R , onde esta molécula atuaria como um aceptor de Michael em uma reação de adição entre o C17 da adenantina e a C_R da cadeia de Prx1 e Prx2 de células de LMA originando um aduto e impedindo a formação do dissulfeto intermolecular (Figura 4A). Após a formação do aduto entre adenantina e Prx1/Prx2, foi observado um aumento nos níveis intracelulares de HPx (HOU *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2012).

Assim, foi proposto um modelo de ligação em que a adenantina interagiria com outros aminoácidos na região do sítio ativo, incluindo os resíduos Thr⁴⁹ e Arg¹²⁸ da tríade catalítica. A natureza dessas ligações seria hidrofóbica para a Thr⁴⁹ e polar para a Arg¹²⁸, e seriam estabilizadas por meio de interações de caráter hidrofóbico com outros aminoácidos próximos ao sítio ativo da enzima (Leu⁴⁶, Phe⁵⁰, Val⁵¹, Ile¹²⁵, Pro¹⁴⁸ e Cys_P) (Figura 4B). Consequentemente, ocorreria a inibição da atividade peroxidásica dessas proteínas, permitindo então o acúmulo de H_2O_2 intracelular em níveis suficientes para a ativação das quinases reguladoras de sinal extracelular ERK1 e ERK2, levando ao aumento da expressão de proteínas β estimuladoras de ligação CCAAT (C/EBP β), as quais conduziriam a diferenciação celular e consequente repressão do tumor (LIU *et al.*, 2012, 2013). Entretanto, cabe ressaltar que estudos detalhados são necessários para entendimento da interação molécula – enzima. Recentemente foi demonstrado que a administração de adenantina juntamente com o antitumoral de VD3 (1,25-dihydroxyvitamin D3) é capaz de aumentar significativamente a diferenciação e atividade apoptótica em células de leucemia promilelocítica aguda (APL).⁵³

Figura 4: Ligação da adenantina ao sítio ativo de Prx1/Prx2 de humano. (A) Interação da adenantina com C_R de Prx1/Prx2 de humano, impedindo a formação do dissulfeto intermolecular. Adaptado de Liu e colaboradores, 2013 (LIU *et al.*, 2013). (B) A adenantina estaria realizando uma interação de Michael com a C_R da cadeia A (em lilás) e interações polares e apolares com a cadeia B (em ciano) de Prx1 de humano. As linhas pontilhadas em magenta representam as ligações de hidrogênio entre a adenantina (em verde) e a Prx1. Além disso, a adenantina estaria realizando interações apolares com os resíduos de Ile¹²⁵, Leu⁴⁶, Pro¹⁴⁸, Thr⁴⁹, Cys⁵², Val⁵¹ e Phe⁵⁰ da cadeia B. Compilado de Liu e colaboradores, 2012 (LIU *et al.*, 2012).

Apesar dos resultados obtidos com adenantina em células de LMA serem animadores e importantes, até o presente momento nenhum trabalho atentou para os efeitos da adenantina em células neoplásicas linfoides, na qual se enquadra a leucemia linfóide aguda (LLA). A LLA é a forma de câncer mais comum em crianças, representando 25% de todos os casos de câncer infantil (BHOJWANI; YANG; PUI, 2015). A taxa de sobrevivência é de aproximadamente 80%, sendo resultado dos avanços obtidos, principalmente, nos últimos 50 anos (BHOJWANI; YANG; PUI, 2015; COOPER; BROWN, 2015). Os protocolos para o tratamento de LLA empregados atualmente variam de acordo com a classificação do grupo de risco do paciente, mas no geral empregam a combinação de vários quimioterápicos como asparaginase, clofarabina, corticosteróides, ciclofosfamida, citarabina, doxorrubicina/daunorrubicina, etoposídeo, metotrexato e vincristina (COOPER; BROWN, 2015). Entretanto, o tratamento com esses quimioterápicos pode provocar uma série de efeitos colaterais, como pancreatite, trombose, nefrotoxicidade, hipertensão, hiperglicemia, neuropatias, entre outros, inviabilizando o uso de algumas drogas em pacientes com maior sensibilidade (COOPER; BROWN, 2015). Nesse sentido, o desenvolvimento de novas terapias que aumentem a taxa de sobrevivência de pacientes, mas que apresentem efeitos colaterais mais brandos seria de grande importância para o tratamento e bem estar dos pacientes com LLA.

A utilização de adenantina em células LLA pode ser uma possibilidade de grande importância em razão dos efeitos observados em células LMA. Embora LMA e LLA apresentem tipos celulares distintos, o que poderia lançar dúvidas sobre a eficácia da adenantina em células LLA, resultados obtidos em trabalhos recentes apontam que a

utilização deste composto em outros tipos tumorais é factível. Recentemente, Hou e colaboradores observaram que a inibição de Prx1 e Prx2 por adenantina foi capaz de induzir a morte de células de hepatocarcinoma (CHC) com mais eficiência do que em células normais imortalizadas, além de inibir significativamente o crescimento de tumores xenográficos sem efeitos tóxicos relevantes (HOU *et al.*, 2014). Foi observado pelos autores que células tratadas com adenantina tiveram seus níveis de HPx aumentados de duas a três vezes em relação às células que não receberam o tratamento. Isso corrobora a possibilidade da utilização destes compostos em processos de morte/diferenciação celular induzida por HPx e espécies geradas através de reações como a de Fenton e Harber-Weiss, sendo portanto, um potencial agente terapêutico para pacientes com CHC.(HOU *et al.*, 2014)

1.7 Tsa1 de *Saccharomyces cerevisiae* como modelo para estudo da interação de adenantina com as Prx

S. cerevisiae é considerada um importante modelo para o estudo de processos bioquímicos, genéticos e epigenéticos de eucariotos como controle da expressão gênica, controle do ciclo celular, reparo de DNA, envelhecimento, e vias moleculares e celulares de doenças humanas, incluindo o câncer (MATUO *et al.*, 2012; QADDOURI *et al.*, 2011; SIMON; YEN, 2003). Adicionalmente, em função da homologia presente entre as proteínas de humanos e de *S. cerevisiae*, é possível utilizar proteínas dessa levedura como modelo para as humanas em análises de caracterização de enzimas, superexpressão proteica, deleções gênicas ou obtenção de mutantes contendo substituições pontuais com elevada facilidade (MATUO *et al.*, 2012; QADDOURI *et al.*, 2011; SIMON; YEN, 2003).

A Prx Tsa1 de *S. cerevisiae* representa um importante modelo para o estudo de Prx de humanos. De fato, a Tsa1 de *S. cerevisiae* foi a primeira Prx caracterizada funcionalmente, seguida pelas Prx humanas Prx1 e Prx2 (CHAE *et al.*, 1999; CHAE; CHUNG; RHEE, 1994). Tsa1 apresenta elevada semelhança com Prx2 (67% identidade e 77% similaridade), sendo que essas duas enzimas são consideradas ortólogas. Além disso, Tsa1 e Prx2 possuem um padrão de expressão altamente similar, estando entre as proteínas mais abundantes das células, e apresentam semelhanças no que concerne a atividade peroxidásica sobre os seus substratos. Análises cristalográficas revelam que as estruturas tridimensionais de Tsa1 e Prx2 apresentam grande identidade na sua organização global, seja na forma de dímeros (Figura 5A) ou decâmero (Figura 5B). Adicionalmente, todos os aminoácidos do bolsão do sitio ativo e suas interações polares são conservados entre Tsa1 e Prx2 (Figura 5C e 5D).

Figura 5: Estruturas quaternárias de Tsa1 e Prx2 de humanos e detalhe da conservação de interações e aminoácidos do sítio ativo. Sobreposição do dímero de Tsa1 (azul, código de pdb = 3SBC) com Prx2 de *H. sapiens* (vermelho, 1QMV) (A) e do decâmero (B). Detalhe dos sítios ativos de Tsa1 de *S. cerevisiae* (C) e Prx2 de *H. sapiens* (D), mostrando a grande conservação dos resíduos de aminoácidos e das interações polares existentes entre eles. Os modelos das proteínas estão representados em *cartoon* (A, B, C e D) e os resíduos de aminoácidos envolvidos em interações polares são representados em *ball e stick* (C e D). Os átomos estão colorizados da seguinte forma: átomos de O estão representados em vermelho, de N em azul escuro e S em laranja claro. Átomos de C estão colorizados em cor semelhante ao restante de cada estrutura.

1.8 Utilização de mutantes de Tsa1 para a compreensão dos fenômenos envolvendo a ligação da adenantina ao sítio ativo das Prx 2-Cys típicas

Recentemente, nosso grupo de pesquisa realizou análises envolvendo o truncamento do prolongamento C-terminal de Tsa1 (compreendendo os aminoácidos 176-196). Este prolongamento está presente apenas em Prx 2-Cys de eucariotos e estaria relacionado à suscetibilidade dessas enzimas à inativação por superoxidação (PARSONAGE, DEREK *et al.*, 2005). Nossos resultados demonstraram que a remoção da cauda C-terminal foi capaz de alterar as propriedades oligoméricas da enzima, interferindo fortemente em sua atividade catalítica, indicando que tais elementos estruturais adicionais estão relacionados com a oligomerização e atividade sobre substratos (manuscrito em fase de preparação). Adicionalmente, outros estudos realizados também pelo nosso grupo de pesquisa revelaram que a Thr⁴⁴ da tríade catalítica está localizada na interface dos decâmeros e interage diretamente por meio do O γ com a cadeia lateral do resíduo de Tyr⁷⁷ do dímero adjacente

(Figura 6C e 6D). Esta interação teria grande importância para a formação de um sítio ativo apto para a decomposição de HPx e, portanto, poderia estar relacionado com a transição dímero $\rightarrow$ decâmero, uma vez que a oxidação dos resíduos leva a desestabilização dos decâmeros e formação de dímeros (TAIRUM-JR *et al.*, 2016).

Figura 6: Estrutura tridimensional de Tsa1 de *S. cerevisiae* revelando as interações moleculares responsáveis pela estabilização do decâmero. (A) Representação em *cartoon* do homodímero de Tsa1 com um monômero colorizado em vermelho e o monômero adjacente em verde. (B) Representação em *cartoon* da estrutura decamérica de Tsa1 com os monômeros de cada dímero colorizados em verde e vermelho. (C) Representação em esferas dos aminoácidos presentes na interface dos dímeros, colorizados de acordo com o padrão CPK: N = azul, O = vermelho e S = laranja. Os monômeros estão representados em *cartoon* e colorizados em verde e vermelho, sendo que os átomos C de cada monômero possuem a mesma cor da cadeia polipeptídica a qual pertencem. (D) Interação hidrofóbica entre o C γ da Thr⁴⁴ e o anel aromático da Tyr⁷⁷ do dímero adjacente, que por sua vez é estabilizado pelo grupamento guanidina da Arg¹²³ da tríade catalítica. Os resíduos de aminoácidos estão representados em esferas e colorizados de acordo com o padrão: C = verde, N = azul, O = vermelho e S = laranja. Os átomos da Tyr⁷⁷ estão colorizados em vermelho. Compilado de Tairum e colaboradores (2016) (TAIRUM-JR *et al.*, 2016).

Para investigar este processo foram produzidos mutantes por meio de mutagênese sítio dirigida em que o resíduo de Thr da tríade catalítica foi substituído por um resíduo de Ser (Tsa1^{T44S}), alteração que mantém a interação polar com C β por meio do O γ mas aumenta o volume da cavidade do sítio ativo. Além disso, esse mutante impede reações históricas com Tyr⁷⁷ do dímero adjacente (ligação do tipo CH-- π), uma vez que a Ser não possui o C γ presente no resíduo de Thr. Adicionalmente, também substituímos o resíduo de Tyr⁷⁷ por Ala, para avaliar a importância da ligação CH-- π . Nossos resultados revelaram que a substituição Tyr⁷⁷ $\rightarrow$ Ala⁷⁷ impediu a formação do decâmero e só foram registradas espécies diméricas com baixa atividade peroxidásica, enquanto que a Thr⁴⁴ $\rightarrow$ Ser⁴⁴, estabilizou a proteínas na forma

decamérica e manteve a atividade alta. Os resultados foram publicados recentemente em periódico de circulação internacional (TAIRUM-JR *et al.*, 2016).

É importante ressaltar que, para algumas Prx, o resíduo de Thr da tríade catalítica é naturalmente substituído por um resíduo de Ser, como em Tsa2 de *S. cerevisiae*. Embora não ocorram alterações significativas na eficiência catalítica em relação à Tsa1, como mencionado acima, também demonstramos que Tsa2 é muito mais resistente ao processo de superoxidação por Hpx orgânicos (manuscrito em fase de elaboração). Portanto, a diferença detectada de resistência por HPx orgânicos, os quais são mais volumosos que o H₂O₂, podem indicar diferenças em interações com substratos, incluindo inibidores como adenantina. Neste contexto, trabalhos que visem a avaliação de inibidores com Prx 2-Cys mutantes pode dar importantes informações sobre a interação entre proteína e substrato, embora nenhum trabalho metódico com essa abordagem tenha sido conduzido até o presente momento.

2. CONCLUSÕES

Apesar dos resultados animadores obtidos recentemente quanto à utilização da adenantina sobre células tumorais, seus mecanismos de interação com as Prx e as modificações provocadas no sítio ativo dessas proteínas ainda são pouco elucidadas (HOU *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2012). Utilizando Tsa1 de *S. cerevisiae* como modelo biológico, avaliamos a possibilidade da adenantina se ligar em Tsa1, o que foi comprovado através de abordagens estruturais funcionais. Nossos resultados demonstram que a inibição mais severa ocorreu quando o resíduo de Thr de Tsa1 foi substituído por uma Ser (Tsa1^{T44S}). Para confirmar estes resultados utilizamos também Tsa2, uma proteoforma de *S. cerevisiae* que carrega naturalmente a substituição de Thr por Ser, e os resultados revelaram que os efeitos estruturais e a inibição da atividade peroxidásica foram semelhantes aos apresentados por Tsa1^{T44S}. Esses dados sugerem que a presença da Ser na tríade catalítica das Prx as torna mais suscetíveis à inibição por adenantina. Análises em banco de dados revelaram que esta substituição ocorre majoritariamente em bactérias, sendo que diversas delas são agentes etiológicos em doenças em mamíferos. Para avaliar se existe diferenças na citotoxicidade de adenantina sobre bactérias contendo Ser (*S. aureus* e *S. epidermidis*) ou Thr (*E. coli*) na tríade catalítica, foram efetuados ensaios de viabilidade celular que revelaram que as bactérias contendo Ser são muito mais sensíveis à ação da adenantina do que a que contém Thr. Uma vez que a maioria dos organismos que apresentam essa substituição é constituída por procariotos, muitos deles patogênicos, demonstramos pela primeira vez a possibilidade da utilização da adenantina como antibióticos em determinadas infecções bacterianas. Por fim, também demonstramos que adenantina é tóxica para células LLA ASNS⁺ (ASNS positiva - REH) ou ASNS⁻ (ASNS negativa - MOLT-4) o que também abre a perspectiva da utilização desta molécula no tratamento da LLA.

REFERÊNCIAS¹

- ALEXANDRE, J. *et al.* Accumulation of hydrogen peroxide is an early and crucial step for paclitaxel-induced cancer cell death both in vitro and in vivo. *International Journal of Cancer*, v. 119, n. 1, p. 41–48, 2006.
- BHOJWANI, D.; YANG, J. J.; PUI, C.-H. Biology of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pediatric clinics of North America*, v. 62, n. 1, p. 47–60, fev. 2015.
- CHAE, H. Z. *et al.* Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin. *Diabetes. Res. Clin. Pract.*, v. 45, p. 101–112, 1999.
- CHAE, H. Z.; CHUNG, S. J.; RHEE, S. G. Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *The Journal of biological chemistry*, v. 269, n. 44, p. 27670–8, 4 nov. 1994.
- COOPER, S. L.; BROWN, P. A. Treatment of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pediatric clinics of North America*, v. 62, n. 1, p. 61–73, fev. 2015.
- COSTA, I. M. *et al.* Recombinant L-asparaginase 1 from *Saccharomyces cerevisiae*: an allosteric enzyme with antineoplastic activity. *Scientific Reports*, v. 6, n. April, p. 36239, 2016.
- DAVIES, M. J. The oxidative environment and protein damage. *Biochimica et biophysica acta*, v. 1703, n. 2, p. 93–109, 17 jan. 2005.
- DAVIES, M. J.; FU, S.; DEAN, R. T. Protein hydroperoxides can give rise to reactive free radicals. *The Biochemical journal*, v. 305 (Pt 2, p. 643–9, 15 jan. 1995.
- DAY, A. M. *et al.* Inactivation of a peroxiredoxin by hydrogen peroxide is critical for thioredoxin-mediated repair of oxidized proteins and cell survival. *Molecular cell*, v. 45, n. 3, p. 398–408, 10 fev. 2012.
- EREJUWA, O. O.; SULAIMAN, S. A.; WAHAB, M. S. A. Evidence in Support of Potential Applications of Lipid Peroxidation Products in Cancer Treatment. v. 2013, 2013.
- FINKEL, T. Oxidant signals and oxidative stress. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 15, n. 2, p. 247–254, abr. 2003..
- FLOHE, L. *et al.* A Comparison of Thiol Peroxidase Mechanisms. v. 15, n. 3, p. 763–780, 2011.
- FRITZ-WOLF, K.; URIG, S.; BECKER, K. The structure of human thioredoxin reductase 1 provides insights into C-terminal rearrangements during catalysis. *Journal of molecular biology*, v. 370, n. 1, p. 116–127, 2007.
- GHAEMMAGHAMI, S. *et al.* Global analysis of protein expression in yeast. *Nature*, v. 425, n. 6959, p. 737–41, 16 out. 2003.
- HALL, A.; KARPLUS, P. A.; POOLE, L. B. Typical 2-Cys Peroxiredoxins: Structures, mechanisms and functions. *FEBS letters*, v. 276, n. 9, p. 2469–2477, 2009.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4. ed. [S.l.]: Oxford University Press, 2010.
- HERMANOVA, I. *et al.* Low expression of asparagine synthetase in lymphoid blasts precludes its role in sensitivity to L-asparaginase. *Experimental Hematology*, v. 40, n. 8, p. 657–665, 2012.
- HOLMGREN, A.; LU, J. Thioredoxin and thioredoxin reductase: current research with special reference to human disease. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 396, n. 1, p. 120–4, 21 maio 2010.
- HOU, J.-K. *et al.* Adenanthin targets peroxiredoxin I/II to kill hepatocellular carcinoma cells. *Cell death &*

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023)

disease, v. 5, p. e1400, jan. 2014.

HUSSAIN, S. P.; HOFSETH, L. J.; HARRIS, C. C. Radical causes of cancer. *Nature reviews. Cancer*, v. 3, n. 4, p. 276–85, abr. 2003.

IMMENSCHUH, S.; BAUMGART-VOGT, E. Peroxiredoxins, Oxidative Stress, and Cell Proliferation. *Antioxidants & redox signaling*, v. 7, n. 5, p. 768–777, 2005.

JANG, H. H. *et al.* Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. *Cell*, v. 117, n. 5, p. 625–35, 28 maio 2004.

KANG, D. H. *et al.* Vascular Injury Involves the Overoxidation of Peroxiredoxin Type II and is Recovered by the Peroxiredoxin-Activity Mimetic that Induces Reendothelialization. *Circulation*, 2 jul. 2013.

KANG, S. W. *et al.* 2-Cys peroxiredoxin function in intracellular signal transduction: therapeutic implications. *Trends in molecular medicine*, v. 11, n. 12, p. 571–8, dez. 2005.

LEE, J. Y. *et al.* Protective role of cytosolic 2-cys peroxiredoxin in the TNF- α -induced apoptotic death of human cancer cells. *Free radical biology & medicine*, v. 47, n. 8, p. 1162–71, 15 out. 2009.

LEE, W. *et al.* Human peroxiredoxin 1 and 2 are not duplicate proteins: the unique presence of CYS83 in Prx1 underscores the structural and functional differences between Prx1 and Prx2. *The Journal of biological chemistry*, v. 282, n. 30, p. 22011–22, 27 jul. 2007.

LIU, C.-X. *et al.* Adenanthin targets peroxiredoxin I and II to induce differentiation of leukemic cells. *Nature chemical biology*, v. 8, n. 5, p. 486–93, maio 2012.

LIU, C.-X. *et al.* Targeting peroxiredoxins against leukemia. *Experimental cell research*, v. 319, n. 2, p. 170–6, 15 jan. 2013.

LOPES, A. M. *et al.* Therapeutic l-asparaginase: upstream, downstream and beyond. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 35, n. 4, p. 1–18, December, 2015.

LÓPEZ-LÁZARO, M. Dual role of hydrogen peroxide in cancer: possible relevance to cancer chemoprevention and therapy. *Cancer letters*, v. 252, n. 1, p. 1–8, 8 jul. 2007.

LUDIN, A. *et al.* Reactive Oxygen Species Regulate Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal, Migration and Development, As Well As Their Bone Marrow Microenvironment. *Antioxidants & redox signaling*, v. 21, n. 11, p. 1605–1619, 2014.

MATUO, R. *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* as a model system to study the response to anticancer agents. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, v. 70, n. 4, p. 491–502, out. 2012.

MIKI, H.; FUNATO, Y. Regulation of intracellular signalling through cysteine oxidation by reactive oxygen species. *Journal of biochemistry*, v. 151, n. 3, p. 255–61, mar. 2012.

MONTEIRO, G. *et al.* Reduction of 1-Cys peroxiredoxins by ascorbate changes the thiol-specific antioxidant paradigm, revealing another function of vitamin C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 104, n. 12, p. 4886–91, 20 mar. 2007.

NETTO, L. E. S.; ANTUNES, F. The Roles of Peroxiredoxin and Thioredoxin in Hydrogen Peroxide Sensing and in Signal Transduction. *Molecules and cells*, v. 39, n. 1, p. 65–71, 2016.

OGUSUCU, R. *et al.* Reactions of yeast thioredoxin peroxidases I and II with hydrogen peroxide and peroxynitrite: rate constants by competitive kinetics. *Free Radicals in Biology and Medicine*, v. 42, n. 3, p. 324–334, 2007.

OLIVEIRA, M. A. *et al.* Insights into the specificity of thioredoxin reductase-thioredoxin interactions. A structural and functional investigation of the yeast thioredoxin system. *Biochemistry*, v. 49, n. 15, p. 3317–26, 20 abr. 2010.

OTEO, J.; BELÉN ARACIL, M. Molecular characterization of resistance mechanisms: methicillin resistance *Staphylococcus aureus*, extended spectrum β -lactamases and carbapenemases. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, v. 2, p. 27–33, 2015.

PARK, S. G. *et al.* Distinct physiological functions of thiol peroxidase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*, v. 275, n. 8, p. 5723–32, 25 fev. 2000.

PARSONAGE, D. *et al.* Analysis of the Link between Enzymatic Activity and Oligomeric State in AhpC , a Bacterial Peroxiredoxin. *Biochemistry*, v. 44, n. 31, p. 10583–10592, 2005.

PARSONAGE, D. *et al.* X-ray structures of thioredoxin and thioredoxin reductase from *Entamoeba histolytica* and prevailing hypothesis of the mechanism of Auranofin action. *Journal of structural biology*, v. 194, n. 2, p. 180–190, 2016.

PESKIN, A. V *et al.* Removal of amino acid, peptide and protein hydroperoxides by reaction with peroxiredoxins 2 and 3. *The Biochemical journal*, v. 432, n. 2, p. 313–21, 1 dez. 2010.

PORQUE, P.; BALDSTEN, A.; RICHARD, P. . Purification of a thioredoxin system from yeast. *The Journal of biological chemistry*, v. 245, p. 2363–2370, 1970.

POWIS, G.; KIRKPATRICK, D. L. Thioredoxin signaling as a target for cancer therapy. *Current opinion in pharmacology*, v. 7, n. 4, p. 392–7, ago. 2007.

PURRELLO, S. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: A review of the currently available treatment options. *Journal of global antimicrobial resistance*, v. 7, p. 178–186, 2016.

QADDOURI, B. *et al.* The Budding Yeast “*Saccharomyces cerevisiae*” as a Drug Discovery Tool to Identify Plant-Derived Natural Products with Anti-Proliferative Properties. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, v. 2011, p. 954140, jan. 2011.

ROUAULT, T. A. Mammalian iron-sulphur proteins: novel insights into biogenesis and function. *Nature reviews. Molecular cell biology*, v. 16, n. 1, p. 45–55, jan. 2015.

SATO, A. *et al.* Magnetic nanoparticles of Fe₃O₄ enhance docetaxel-induced prostate cancer cell death. *International Journal of Nanomedicine*, v. 8, p. 3151–3160, 2013.

SEIFRIED, H. E. *et al.* A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *The Journal of nutritional biochemistry*, v. 18, n. 9, p. 567–79, set. 2007.

SIMON, J. A.; YEN, T. J. Novel approaches to screen for anticancer drugs using *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in Molecular Biology*, v. 223, p. 555–576, 2003.

SOETHOUDT, M. *et al.* Interaction of adenanthin with glutathione and thiol enzymes: Selectivity for thioredoxin reductase and inhibition of peroxiredoxin recycling. *Free radical biology & medicine*, v. 77C, p. 331–339, dez. 2014.

SZABÓ, K. *et al.* Redox control in human disease with a special emphasis on the peroxiredoxin-based antioxidant system. *Redox Signaling and regulation in biology and medicine*. [S.l: s.n.], 2009. p. 481.

TAIRUM-JR, C. A. *et al.* Catalytic Thr or Ser residue modulates structural switches in 2-Cys peroxiredoxin by distinct mechanisms. *Submetido ao periódico Naure Scientific Reports.*, n. August, p. 1–12, 2016.

TAIRUM, C. A *et al.* Disulfide biochemistry in 2-cys peroxiredoxin: requirement of Glu50 and Arg146 for the reduction of yeast Tsa1 by thioredoxin. *Journal of molecular biology*, v. 424, p. 28–41, 23 nov. 2012.

THOMSEN, L.; MILES, W. Role of nitric oxide in tumour progression: lessons from human tumours. *Cancer and Metastasis Reviews*, v. 17, p. 107–118, 1998.

TIRAPELLI, C. R. *et al.* Diterpenes : A Therapeutic Promise for Cardiovascular Diseases. p. 1–8, 2008.

TOTHOVA, Z. *et al.* FoxOs Are Critical Mediators of Hematopoietic Stem Cell Resistance to Physiologic Oxidative Stress. p. 325–339, 2007.

WOO, S. H. *et al.* Arsenic trioxide induces apoptosis through a reactive oxygen species-dependent pathway and loss of mitochondrial membrane potential in HeLa cells. *International Journal of Oncology*, v. 21, n. 1, p. 57–63, 2002.

WOOD, Z. A *et al.* Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends in biochemical sciences*, v. 28, n. 1, p. 32–40, jan. 2003.

WOOD, Z. A.; POOLE, L. B.; KARPLUS, P. A. Structure of intact AhpF reveals a mirrored thioredoxin-like active site and implies large domain rotations during catalysis. *Biochemistry*, v. 40, n. 13, p. 3900–3911, 2001.

ZHOU, D.; SHAO, L.; SPITZ, D. R. Reactive Oxygen Species in Normal and Tumor Stem Cells. *Advances in Cancer Research*, v. 122, p. 1–58, 2015.

ANEXOS**Anexo A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa ou da Comissão de Ética no Uso de Animais** **UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO****FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**
Departamento de Tecnologia Bioquímico-
Farmacêutica

São Paulo, 04 de março de 2016.

DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que o presente projeto de pesquisa dispensa análise do Comitê de Ética em Pesquisa e/ou Comitê de Ética em Experimentação Animal e/ou da Comissão Interna de Biossegurança – CIBio.

Cordialmente

Melina Cardoso dos Santos

Profa Dra Gisele Monteiro de Souza
Depto de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
FCF/USP

Anexo B - Ficha do Aluno

UNESP - Sistema Administrativo de Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9134 - 9259245/1 - Melina Cardoso dos Santos

Email: santos_mc@usp.br
Data de Nascimento: 23/09/1985
Cédula de Identidade: RG - 34.498.858-1 - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Bacharel em Ciências Biológicas - habilitação em Gerenciamento Costeiro - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - São Paulo - Brasil - 2014

Curso: Mestrado
Programa: Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área: Tecnologia de Fermentações
Data de Matrícula: 09/03/2015
Início da Contagem de Prazo: 09/03/2015
Data Limite para o Depósito: 09/03/2017
Orientador: Prof(a). Dr(a). Gisela Monteiro de Souza - 09/03/2015 até o presente. Email: smgisele@usp.br
Co-orientador: Prof(a). Dr(a). Marcos Antonio de Oliveira - 14/09/2016 até o presente. Email: mao@dp.unesp.br
Proficiência em Línguas: Inglês. Aprovado em 09/03/2015
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 27/04/2016

Data do Depósito do Trabalho:

Título do Trabalho:

Data Máxima para Aprovação da Banca:

Data de Aprovação da Banca:

Data Máxima para Defesa:

Data da Defesa:

Resultado da Defesa:

Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 09/03/2015

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor a partir de 2004/2013)

Última ocorrência: Matrícula Regular em 12/07/2016

Impresso em: 01/02/2017 17:27:24

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
PBT5713-2/1	Biologia Molecular Aplicada à Biotecnologia Farmacêutica Industrial	09/03/2015	22/03/2015	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5752-3/1	Danos em Bionúcleos e o seu Papel no Monitoramento da Exposição a Agentes Tóxicos	11/06/2015	16/07/2015	45	3	100	A	N	Concluída
PBT5773-7/6	Tópicos Especiais em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica	03/08/2015	19/10/2015	30	0	-	-	N	Pré-matrícula recusada
PBT5736-1/2	Tópicos Especiais em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica II	03/08/2015	19/10/2015	30	0	-	-	N	Pré-matrícula recusada
FBC5803-3/6	Sistemas de Garantia da Qualidade em Laboratórios de Ensaio	18/08/2015	31/08/2015	30	2	100	A	N	Concluída
BTC5818-1/2	Utilização de Saccharomyces cerevisiae como Organismo Modelo em Biologia Molecular (Curso Interinstitucional: Biotecnologia - Universidade de São Paulo)	26/08/2015	31/10/2015	90	6	90	A	N	Concluída
Crédito Externo	Biologia Molecular Estrutural de Proteínas e Aplicações Biotecnológicas (1)	19/11/2015	27/11/2015	-	6	100	T	-	-
PBT5773-7/7	Tópicos Especiais em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica	07/03/2016	15/05/2016	30	2	90	A	N	Concluída
PBA5726-4/3	Aprendizado Pedagógico	16/08/2016	12/09/2016	60	4	100	A	N	Concluída
BIO5141-6/1	Ensaios Pedagógicos para o Ensino de Biologia (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	22/08/2016	30/10/2016	30	0	-	-	N	Matrícula cancelada

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	27
Estágios:			
Total:	0	25	27

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Observações:

1) Disciplinas cursadas na(o) Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Atribuição de créditos aprovada pelo(a) Comissão de Pós-Graduação em Sessão de 09/03/2016.

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência. Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula Regular em 12/07/2016

Impresso em: 01/02/2017 17:27:24