

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: 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.

Santos, Melina Cardoso dos
S237e Estudos estruturais e funcionais de Tsal de *Saccharomyces cerevisiae* : 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. 58f. 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 (IC₅₀ de 460µM e 77µM, respectivamente), enquanto que para *Escherichia coli*, que possui Thr nessa posição, a toxicidade da adenantina foi bastante baixa (não foi possível determinar o IC₅₀ 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 *S. cerevisiae*: a biological model for study of cellular growth inhibitors for acute lymphocytic leukemia.** 2017. 58f. 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 460 μM and 77 μM , respectively), whereas for *Escherichia Coli*, which has Thr at that position, the tocyxicity 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.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diferentes efeitos biológicos em razão da concentração intracelular de HPx.	17
Figura 2: Sistema redutor das Prx 2-Cys..	19
Figura 3: Estruturas quaternárias apresentadas por Prx 2-Cys típicas.....	20
Figura 4: Ligação da adenantina ao sítio ativo de Prx1/Prx2 de humano.	23
Figura 5: Estruturas quaternárias de Tsa1 e Prx2 de humanos e detalhe da conservação de interações e aminoácidos do sítio ativo.	25
Figura 6: Estrutura tridimensional de Tsa1 de <i>S. cerevisiae</i> revelando as interações moleculares responsáveis pela estabilização do decâmero.....	26
Figura 7: Ensaio de oxidação em SDS-PAGE de Tsa1 ^{WT} , Tsa1 ^{T44S} , Tsa1 ^{175ΔCT} e Tsa1 ^{Y77A} tratadas com adenantina.	35
Figura 8: Espectroscopia de dicroísmo circular (CD) de Tsa1 selvagem e seus mutantes tratados com adenantina.....	36
Figura 9: Cromatografia de exclusão molecular (SEC) de Tsa1 selvagem e seus mutantes tratadas com adenantina.....	38
Figura 10: Ensaio de inibição da atividade peroxidásica de Tsa1 ^{WT} , Tsa1 ^{T44S} , Tsa1 ^{175ΔCT} e Tsa1 ^{Y77A} por adenantina.....	39
Figura 11: Ensaio de oxidação de NADPH com o sistema Trx pré-tratado com adenantina...	41
Figura 12: Análise comparativa das estruturas tridimensionais de Tsa1 e Tsa2.....	42
Figura 13: Efeitos estruturais e funcionais da ligação de adenantina sobre Tsa2.	43
Figura 14: Comparação entre estruturas de TrxR de fungo, protozoário e humanos e AhpF de bactérias.	45
Figura 15: Alinhamento das sequências de aminoácidos de Prx 2-Cys típicas. Alinhamento de Prx 2-Cys	46
Figura 16: Viabilidade celular de <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> e <i>E. coli</i> tratadas com adenantina.	47
Figura 17: Viabilidade celular das linhagens REH e MOLT-4 após tratamento com adenantina.	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Análise comparativa dos dados de espectroscopia de CD para estimativa da composição da estrutura secundária de Tsa1 ^{WT} , Tsa1 ^{T44S} , Tsa1 ^{175ΔCT} e Tsa1 ^{Y77A} tratadas ou não com adenantina.	37
Tabela 2: Velocidade das reações contendo Tsa1 ^{WT} , Tsa1 ^{T44S} , Tsa1 ^{175ΔCT} , Tsa1 ^{Y77A} , Trx1 e TrxR1 tratadas e não tratadas com adenantina.....	40
Tabela 3: Análise dos dados de espectroscopia de CD para estimativa da composição da estrutura secundária de Tsa2 tratada ou não com adenantina.	44
Tabela 4: Valores de IC ₅₀ de adenantina contra células REH e MOLT-4 calculados com o auxílio do <i>software</i> GraphPad Prim 5.....	49

LISTA DE ABREVIACOES

AA-OOH	Hidroperóxido de aminoácidos
Ade	Adenantina
Ahp1/AhpC/AhpF	Alquil hidroperóxido redutase subunidade 1/ C/ F
APL	Leucemia promielocítica aguda
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
ASNS	Asparagina sintetase
BCRJ	Banco de células do Rio de Janeiro
BHI	Meio de cultura <i>Brain Heart Infusion</i>
Cat	Catalase
CD	Dicroísmo circular
CHC	Carcinoma hepatocelular
C _p	Cisteína peroxidásica
C _p -S ⁻	Cisteína peroxidásica na forma de tiolato
C _p -SOH	Cisteína peroxidásica na forma de ácido sulfnico
C _R	Cisteína de resolução
Cys	Cisteína
DNA	cido desoxirribonucleico
DTPA	cido dietilentriaminopentaactico
DTT	Ditiotreitol
EGF	Fator de crescimento epidérmico

ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
GPx	Glutaciona peroxidase
H ₂ O ₂ /HOOH	Peróxido de hidrogênio
HEPES	Ácido 4-2-hidroxietil-1-piperazinil-etanosulfônico
Hpx	Hidroperóxido
Ile	Isoleucina
IMAC	Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados
IPTG	Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo
JNK	Quinase c-Jun N-terminal
KCl	Cloreto de potássio
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
Leu	Leucina
LLA	Leucemia linfoide aguda
LMA	Leucemia mieloide aguda
Lp-OOH	Hidroperóxido de lipídeos
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidado
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NFκB	Fator nuclear kappa B
NOOH	Peroxinitrito
nTpx	Tiol peroxidase nuclear

OD	Densidade óptica
$\cdot\text{OH}$	Radical hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
P-OOH	Hidroperóxido de proteínas
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
Phe	Fenilalanina
Pro	Prolina
Prx	Peroxirredoxina
RNA	Ácido ribonucleico
RPMI	Meio de cultura <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SEC	Cromatografia de exclusão molecular
Ser	Serina
SOC	Meio de cultura <i>Super Optimal Broth</i>
Thr	Treonina
TNF	Fator de necrose tumoral
TRAIL	Ligantes indutores de apoptose relacionados à TNF (fator de necrose tumoral)
Trx	Tiorredoxina
TrxR	Tiorredoxina redutase
Tsa	Proteína antioxidante específica para tióis
TSH	Tirotropina

Tyr	Tirosina
Val	Valina
VD3	1,25-dihidroxitamina D3
YE	Extrato de levedura

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Hidroperóxidos: tipos e relevância em processos biológicos	14
1.2 Câncer e HPx.....	15
1.3 Diversidade e características de peroxidases	17
1.4 Características funcionais e estruturais de Prx	18
1.5 Envolvimento das Prx em eventos de crescimento celular e câncer	20
1.6 Inibição de Prx2-Cys típicas por adenantina e efeito em células tumorais.....	21
1.7 Tsa1 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo para estudo da interação de adenantina com as Prx	24
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	25
2 OBJETIVOS	28
2.1 Objetivo Geral	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 Reagentes	29
3.2 Meios de cultura para bactérias para expressão heteróloga de proteínas.....	29
3.3 Linhagens de <i>Escherichia coli</i>	29
3.4 Plasmídeos.....	29
3.5 Expressão e purificação em bactérias de proteínas selvagens e mutantes	30
3.6 Quantificação de proteínas.....	30
3.7 Análise da ligação de adenantina a Tsa1 por SDS-PAGE.....	30
3.8 Espectroscopia de dicroísmo circular	31
3.9 Cromatografia de exclusão molecular (SEC).....	31
3.10 Determinação da atividade peroxidásica através de ensaio de oxidação de NADPH	32
3.11 Análise do efeito citotóxico de adenantina sobre bactérias.	33
3.12 Ensaio de citotoxicidade de adenantina sobre células de LLA	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1 Expressão e purificação das proteínas recombinantes.....	34
4.2 A ligação com adenantina é capaz de inibir a formação do dissulfeto intermolecular de Tsa1 ^{WT} e seus mutantes.....	34
4.3 A substituição da Thr ⁴⁴ por uma Ser torna a estrutura secundária de Tsa1 mais suscetível a alterações em função da ligação com adenantina.	36
4.4 A interação com adenantina é capaz de afetar a estrutura quaternária de Tsa1 ^{WT}	37
4.5 A presença de um resíduo de Ser na tríade catalítica aumenta a eficiência da inibição de Tsa1 por adenantina.	38
4.6 Efeitos estruturais e funcionais da ligação de adenantina ao sítio ativo de Tsa2.....	41
4.7 Atividade antimicrobiana de adenantina.....	44
5. CONCLUSÕES.....	50
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	51
REFERÊNCIAS	52

ANEXOS	56
Anexo A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa ou da Comissão de Ética no Uso de Animais	56
Anexo B - Ficha do Aluno	57

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 radiculares como o radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) 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 $\cdot\text{OH}$ 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 glutatona e o ácido ascórbico, dentre outras, bem como de enzimas antioxidantes como as glutatona 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).

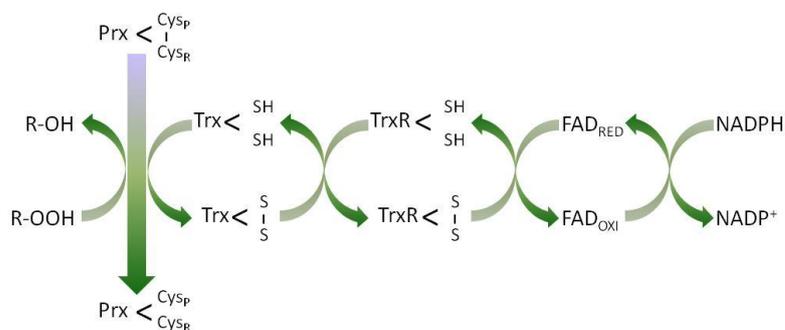


Figura 2: Sistema redutor das Prx 2-Cys. A ligação dissulfeto da Prx oxidada é reduzida pela enzima Trx que, por sua vez, torna-se oxidada, sendo então reduzida pela enzima TrxR que utiliza elétrons provenientes do NADPH *via* uma molécula de FAD.

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).

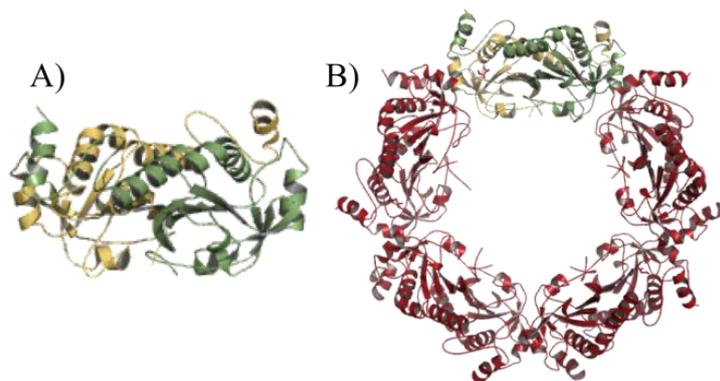


Figura 3: Estruturas quaternárias apresentadas por Prx 2-Cys típicas. **A)** Dímero de Tsa1 de levedura representado em *cartoon*. Um monômero é colorizado em verde e o monômero adjacente em amarelo. **B)** Decâmero do tipo $\alpha 2[5]$, formado pela associação de cinco dímeros. A unidade dimerica superior 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

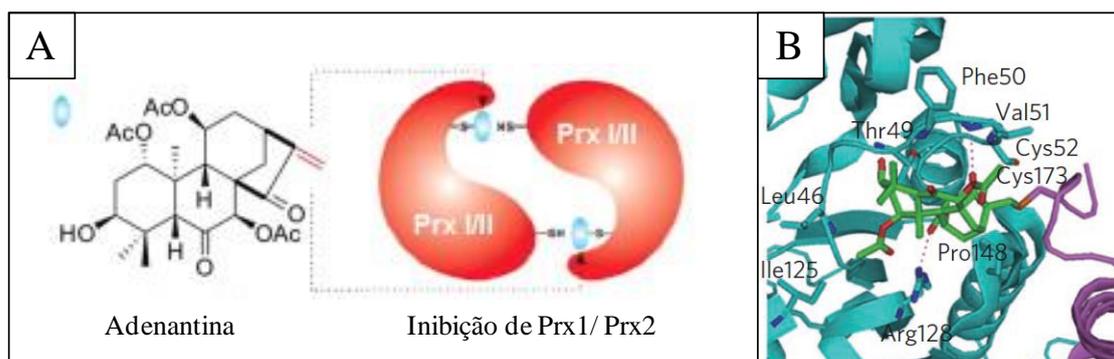


Figura 4: Ligação da adenantina ao sítio ativo de Prx1/Prx2 de humano. (A) Interação da adenantina com C_R de Prx1/Prx2 de humano, impedindo a formação do dissulfeto intermolecular. Adaptado de Liu e colaboradores, 2013 (LIU *et al.*, 2013). (B) A adenantina estaria realizando uma interação de Michael 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, doxorubicina/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).

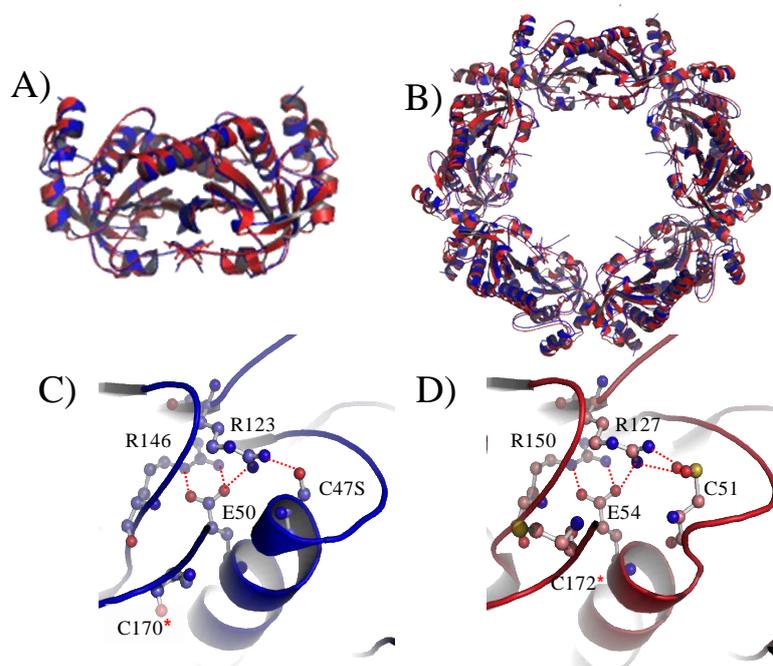


Figura 5: Estruturas quaternárias de Tsa1 e Prx2 de humanos e detalhe da conservação de interações e aminoácidos do sítio ativo. Sobreposição do dímero de Tsa1 (azul, código de pdb = 3SBC) com Prx2 de *H. sapiens* (vermelho, 1QMV) (A) e do decâmero (B). Detalhe dos sítios ativos de Tsa1 de *S. cerevisiae* (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).

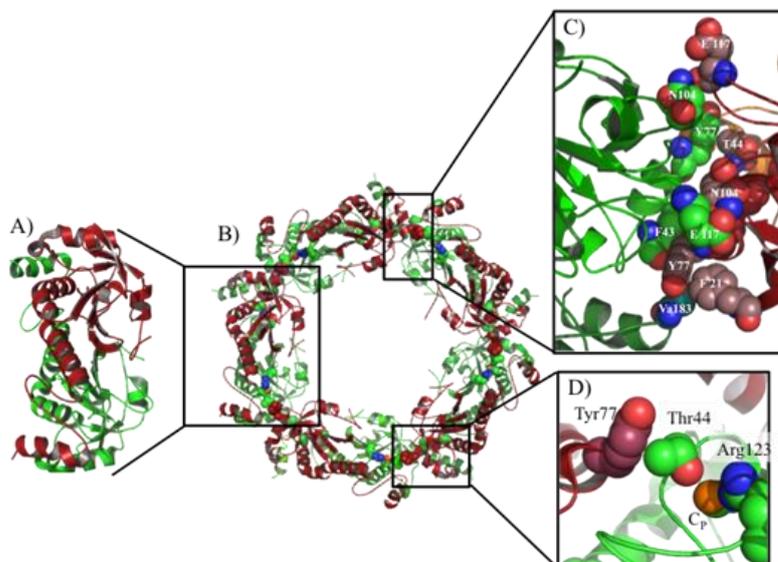


Figura 6: Estrutura tridimensional de Tsa1 de *S. cerevisiae* revelando as interações moleculares responsáveis pela estabilização do decâmero. (A) Representação em *cartoon* do homodímero de Tsa1 com um monômero colorizado em vermelho e o monômero adjacente em verde. (B) Representação em *cartoon* da 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 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo utilizar a Prx 2-Cys de Tsa1 *S. cerevisiae* e os mutantes Tsa1^{T44S}, Tsa1^{175ΔCT} e Tsa1^{Y77A} como modelos biológicos visando uma melhor compreensão dos mecanismos de inibição de adenantina. Adicionalmente também foi objetivo deste trabalho avaliar o efeito citotóxico da adenantina sobre células de LLA.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Os reagentes utilizados nesse trabalho foram adquiridos junto a Merck Millipore, Sigma Aldrich, Invitrogen, Thermo Scientific e GE Healthcare. Adenantina foi adquirida junto a ChemFaces. As células REH e MOLT-4 foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) (RJ/Brazil).

3.2 Meios de cultura para bactérias para expressão heteróloga de proteínas

Meio de cultura Luria-Bertani (LB): (1% triptona; 0,5% extrato de levedura (YE); 0,5% NaCl); meio de cultura *Super Optimal Broth* (SOC): (2% triptona; 0,5% YE; 0,058% NaCl; 0,018% KCl; [glicose] final de 20mM; pH7); ampicilina 100 µg/ml.

3.3 Linhagens de *Escherichia coli*

DH5αF' - F' (Z80dlacZ₂(lacZ)M15)₂(lacZYA-argF)U169 *recA1 endA1 hsdR17* (*r_k⁻*, *m_k⁺*); DH10B - F *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) *f80dlacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araΔ139 D* (*ara, leu*) 7697 *galK1⁻ rpsLnupG*.

BL21(DE3) - [F' , *amp^r T, hsdS_b (r_B⁻m_b⁻)*, *gal, dcm (DE3)* (Novagen); B84 DE3 [F' , *metamp^r T, hsdS_b (r_B⁻m_b⁻)*, *gal, dcm (DE3)*.

3.4 Plasmídeos

Os plasmídeos de expressão de bactérias utilizados foram pET15b para Tsa1^{WT}, Tsa1^{175ΔCT}, Tsa1^{Y77A}, Tsa1^{T44S} e TrxR1, pPROEX para Tsa2 e pET17b para Trx (Invitrogen). Os mutantes Tsa1^{175ΔCT}, Tsa1^{Y77A} e Tsa1^{T44S} foram construídos em trabalhos anteriores do nosso grupo e pesquisa (TAIRUM-JR *et al.*, 2016).

3.5 Expressão e purificação em bactérias de proteínas selvagens e mutantes

Inicialmente, linhagens de *E. coli* B121 (DE3) contendo plasmídeos com os genes de Tsa1^{WT}, Tsa1^{175ΔCT}, Tsa1^{Y77A}, Tsa1^{T44S}, Tsa2, Trx1 e TrxR1, foram inoculadas em 30 ml de meio LB contendo 100 µg/ml de ampicilina e cultivadas por 16 h/37°C/250 RPM em agitador orbital. Após este período, a cultura foi transferida para 1 litro de meio LB/Ampicilina, cultivada até OD₆₀₀ ~ 0,6 e, neste momento, foi adicionado IPTG (Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo) na concentração final de 1 mM. Após 3h de indução a 37°C/250 RPM, as células foram decantadas por meio de centrifugação por 30 min/4°C/2000 × g e ressuspendidas em tampão fosfato 20 mM, pH 7,4. O rompimento das células foi realizado por sonicação (30% amplitude) e os ácidos nucleicos foram removidos por meio de tratamento com sulfato de estreptomicina (concentração final = 1%) por 20 minutos. Após este período, o extrato foi centrifugado por 45 min/4°C/18500 × g, o precipitado descartado e o extrato proteico coletado. Uma vez que as proteínas foram expressas utilizando vetores que as fusionam a uma cauda de histidina, com exceção de Trx1, a purificação foi feita por cromatografia de afinidade por metais (IMAC) em colunas HisTrap (GE Healthcare) em gradiente de imidazol. Para a purificação da proteína Trx1, foi utilizado o *boiling method* descrito por Porque e col.(PORQUE; BALDSTEN; RICHARD, 1970) A qualidade da purificação das proteínas foi constatada por SDS-PAGE em condições redutoras. Após estes procedimentos, as proteínas foram dessalinizadas através de cromatografia de filtração em gel utilizando a coluna PD10 (GE Healthcare) e concentradas por centrifugação (2000 × g/4°C) utilizando concentradores Ultracel YM-30 (Millipore).

3.6 Quantificação de proteínas

As proteínas purificadas foram quantificadas espectrofotometricamente, a 280 nm, utilizando o coeficiente de extinção molar específico de cada uma obtido através da ferramenta ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>).

3.7 Análise da ligação de adenantina a Tsa1 por SDS-PAGE

A ligação de adenantina à Tsa1^{WT}, Tsa1^{175ΔCT}, Tsa1^{Y77A}, Tsa1^{T44S} e Tsa2 foi avaliada através de análise em SDS-PAGE. Para isso, as proteínas foram inicialmente reduzidas com 20 mM de DTT por 30 minutos a temperatura ambiente. A seguir, o excesso de DTT foi retirado através de dessalinização em coluna PD-10 (GE Healthcare) e as proteínas foram quantificadas a 280nm. Posteriormente, 10 μM de cada proteína foi incubada com concentrações crescentes de adenantina (1 μM, 5 μM, 10 μM, 25 μM, 50 μM, 100 μM e 300 μM) por 1 hora a temperatura ambiente e tratada com 12 μM de H₂O₂ por mais 30 minutos. Para avaliar a ligação de adenantina às proteínas em função do tempo, 10 μM de cada uma delas foram tratadas com 50 μM de adenantina por 1, 5, 10, 30, 60, 90 e 120 minutos antes de serem adicionados 12 μM de H₂O₂ por mais 30 minutos. As reações foram paralisadas pela adição de *stop buffer* (50 mM N-etilmaleimida em solução 4% SDS; glicerol 10%; 62,5 mM tris-HCl pH 6,8) e aplicadas em SDS-PAGE.

3.8 Espectroscopia de dicroísmo circular

Tsa1^{WT}, Tsa1^{175ΔCT}, Tsa1^{Y77A}, Tsa1^{T44S} e Tsa2, a uma concentração de 5 μM em tampão Tris-HCl 10 mM (pH 7,4), reduzidas e dessalinizadas, foram tratadas com cinco equivalentes molares de adenantina por uma hora a temperatura ambiente. A seguir, as amostras foram adicionadas de 1,2 equivalentes molares de H₂O₂ por 30 minutos antes de serem submetidas à análise. Como controle, foram utilizadas as proteínas sem o tratamento com adenantina. Os espectros de CD foram obtidos a uma temperatura de 25°C, utilizando cubetas com caminho óptico de 0,1 cm, em um espectropolarímetro Jasco J-810 (Jasco Inc.). Os espectros foram apresentados como uma média de 8 varreduras registradas de 190 a 160 nm. Os componentes da estrutura secundária foram estimados com o auxílio do *software* CDNN 2.1.

3.9 Cromatografia de exclusão molecular (SEC)

Tsa1^{WT}, Tsa1^{175ΔCT}, Tsa1^{Y77A}, Tsa1^{T44S} e Tsa2, a uma concentração de 10 μM em tampão Tris-HCl 100 mM (pH 7,4) e NaCl 100 mM, reduzidas e dessalinizadas, foram tratadas com 30 equivalentes molares de adenantina por uma hora a temperatura ambiente. A seguir, as amostras foram adicionadas de 1,2 equivalentes molares de H₂O₂ por 30 minutos

antes de serem submetidas à análise. Como controle, foram utilizadas as proteínas sem o tratamento com adenantina. A análise por SEC foi realizada utilizando um HPLC analítico (Jasco LC-2000 Plus) equipado com injetor PU 2880 Plus e detector PDA MD 2018 (Jasco). As amostras foram separadas pelo sistema contendo uma coluna BioSep-SEC-S3000 (7,8×300mm, 5µm, intervalo de resolução de 15 to 2000 kDa, Phenomenex, Inc., Torrance, California, EUA) com um fluxo de 1,0 mL/min em tampão Tris-HCl 100 mM (pH 7,4) e NaCl 100 mM. Os perfis de eluição foram monitorados pela absorbância ($\lambda = 280\text{nm}$). Os padrões de massa molecular utilizados foram tiroglobulina bovina (670 kDa), gama globulina bovina (158 kDa), ovalbumina (44 kDa), mioglobulina (17 kDa) e vitamina B12 (1,35 kDa), adquiridos da Bio-Rad). Os cromatogramas foram analisados utilizando o software Jasco BORWIN versão 1.50 (Jasco)

3.10 Determinação da atividade peroxidásica através de ensaio de oxidação de NADPH

A atividade peroxidásica após tratamento de Tsa1^{WT}, Tsa1^{175ΔCT}, Tsa1^{Y77A}, Tsa1^{T44S} e Tsa2 com adenantina foi avaliada pelo ensaio acoplado de oxidação do NADPH.(OLIVEIRA *et al.*, 2010) Inicialmente, as proteínas foram reduzidas com 20 mM de DTT por 30 minutos, em temperatura ambiente, e em seguida dessalinizadas e tratadas com 30 equivalentes molares de adenantina por mais 1 hora, também em temperatura ambiente. As proteínas foram então dessalinizadas novamente para a retirada do excesso de adenantina e quantificadas. 1 µM de Tsa1^{WT}, Tsa1^{175ΔCT}, Tsa1^{Y77A} ou Tsa2 foi adicionado a um *mix* contendo 2 µM de Trx1, 0,3 µM de TrxR1, 150 µM de NADPH, em tampão 50 mM HEPES pH 7,4, 1mM DTPA e 100 µM azida sódica, sendo então incubado por 5 minutos a 30°C. As reações foram então iniciadas pela adição de 200 µM de H₂O₂ e monitoradas espectrofotometricamente a 340nm. Como controles, foram utilizadas reações em que as proteínas não receberam o pré-tratamento com adenantina ou não foram adicionadas. Para avaliar o efeito da ligação de adenantina ao sistema Trx, as proteínas Trx1 e TrxR1 reduzidas e dessalinizadas foram tratadas com 30 equivalentes molares de adenantina por uma hora, a temperatura ambiente e dessalinizadas novamente. Em seguida, a atividade peroxidásica das proteínas foi avaliada individualmente, conforme descrito acima, utilizando Tsa1^{WT} não tratada como controle positivo da decomposição de HPx.

3.11 Análise do efeito citotóxico de adenantina sobre bactérias.

Bactérias das espécies *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* (isoladas da Baía do Araça, São Sebastião – SP pela pesquisadora Bruna Del Busso Zampieri durante seu mestrado) e *Escherichia coli* (ATCC: PTA5073) foram inoculadas em caldo BHI (*brain heart infusion*) e cresceram a 37°C e 250 RPM até OD₆₂₅ ~ 1. A seguir, os inóculos foram diluídos até OD₆₂₅=0,1, distribuídos em microplacas (96 poços) e expostos a tratamento com crescentes de adenantina (1µM, 10µM, 100µM e 1000µM) por 24 horas a 37°C. O volume final de cada poço foi igual a 200µl. Por fim, a densidade celular foi medida espectrofotometricamente a 625nm.

3.12 Ensaio de citotoxicidade de adenantina sobre células de LLA

Os experimentos foram conduzidos em colaboração com a Prof^a. Dra. Sandra Farsky (FCF, USP-SP), pesquisadora colaboradora do projeto temático (FAPESP, Proc. n°2013/08617-7) e com o auxílio do Dr. Christiano Barbosa. As linhagens celulares MOLT-4 e REH foram inoculadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e incubadas a 37°C em atmosfera contendo CO₂ 5%. Após atingirem uma densidade satisfatória aos ensaios, comprovada por contagem utilizando azul de tripano, as células foram transferidas para placas estéreis de 96 poços, sendo que cada poço continha 3×10^5 células em um volume final de 150 µl. As células foram tratadas com concentrações crescentes de adenantina (0,1µM, 1µM, 5µM, 10µM, 50µM e 100µM) e incubadas por 24, 48 e 72 horas, nas mesmas condições de crescimento. Após a incubação, as células foram tratadas com 0,3mg/ml de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio) por quatro horas e, a seguir, com SDS (dodecil sulfato de sódio) 10% 0,01N HCl *overnight* para a solubilização dos cristais de formazana. As placas estão foram analisadas espectrofotometricamente a 570 nm com o auxílio do *software* SoftMax Pro. Os experimentos foram realizados em triplicata experimental.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Expressão e purificação das proteínas recombinantes.

As proteínas Tsa1^{WT}, Tsa1^{175ΔCT}, Tsa1^{Y77A}, Tsa1^{T44S}, Tsa2, Trx1 e TrxR1 foram expressas conforme os procedimentos descritos na seção *Materiais e Métodos*, que se mostraram bastante eficazes, sendo possível obter proteínas com alto grau de pureza e com um rendimento por litro de cultura de até 3mg para Tsa1^{WT}, Tsa1^{175ΔCT}, Tsa1^{Y77A}, Tsa1^{T44S} e Tsa2, 13mg para TrxR1 e 2 mg para Trx1. A pureza das proteínas poderá ser constatada nas análises em SDS-PAGE (Figura 7).

4.2 A ligação com adenantina é capaz de inibir a formação do dissulfeto intermolecular de Tsa1^{WT} e seus mutantes.

Uma vez que a adenantina é capaz de ligar-se ao sítio ativo das Prx 2-Cys de humanos, prevenindo a formação do dissulfeto intermolecular, foram realizadas análises em SDS-PAGE não redutor para avaliar sua capacidade de ligar-se às enzimas de levedura Tsa1^{WT}, Tsa1^{T44S}, Tsa1^{175ΔCT} e Tsa1^{Y77A}. Apesar de Tsa1^{WT} apresentar-se predominantemente como decâmeros, a associação entre os protômeros é realizada por interações fracas, como ligações de Van Der Waals, ponte salinas e interações polares e apolares. Essas interações fracas são rompidas pelas condições denaturantes do SDS-PAGE e as proteínas passam a ser detectadas no gel apenas como monômeros de ~25 kDa ou, quando oxidadas, como dímeros unidos por dissulfetos com ~50 kDa, uma vez que ligações covalentes não são afetadas nesta metodologia. As bandas diméricas podem ainda apresentar-se com uma ou duas ligações dissulfeto, exibindo um padrão de migração mais lento (um dissulfeto) ou mais rápido no gel (dois dissulfetos), respectivamente. Para estes ensaios, as proteínas reduzidas foram expostas a concentrações crescentes de adenantina por uma hora ou a uma concentração fixa de adenantina por diferentes períodos de tempo (Figura 7), seguido pelo tratamento com H₂O₂ para induzir a formação do dissulfeto intermolecular. Observando a figura 7, podemos notar que há uma diminuição da forma dimérica da proteína e um aumento da forma monomérica, conforme aumenta-se a concentração de adenantina ou o tempo de reação, até que um limite seja atingido e, a partir de então, as quantidade de dímeros e monômeros permanecem

estáveis. Esses resultados indicam que a ligação de adenantina no sítio ativo de Tsa1^{WT} e mutantes impede a formação do dissulfeto intermolecular de forma similar, e que, portanto, os resíduos Thr⁴⁴, Tyr⁷⁷ e os pertencentes à cauda C-terminal não são fundamentais para a interação deste ligante com o sítio ativo de Tsa1. Adicionalmente, os resultados confirmam a viabilidade da utilização de Tsa1 como modelo de estudo para a ligação de inibidores.

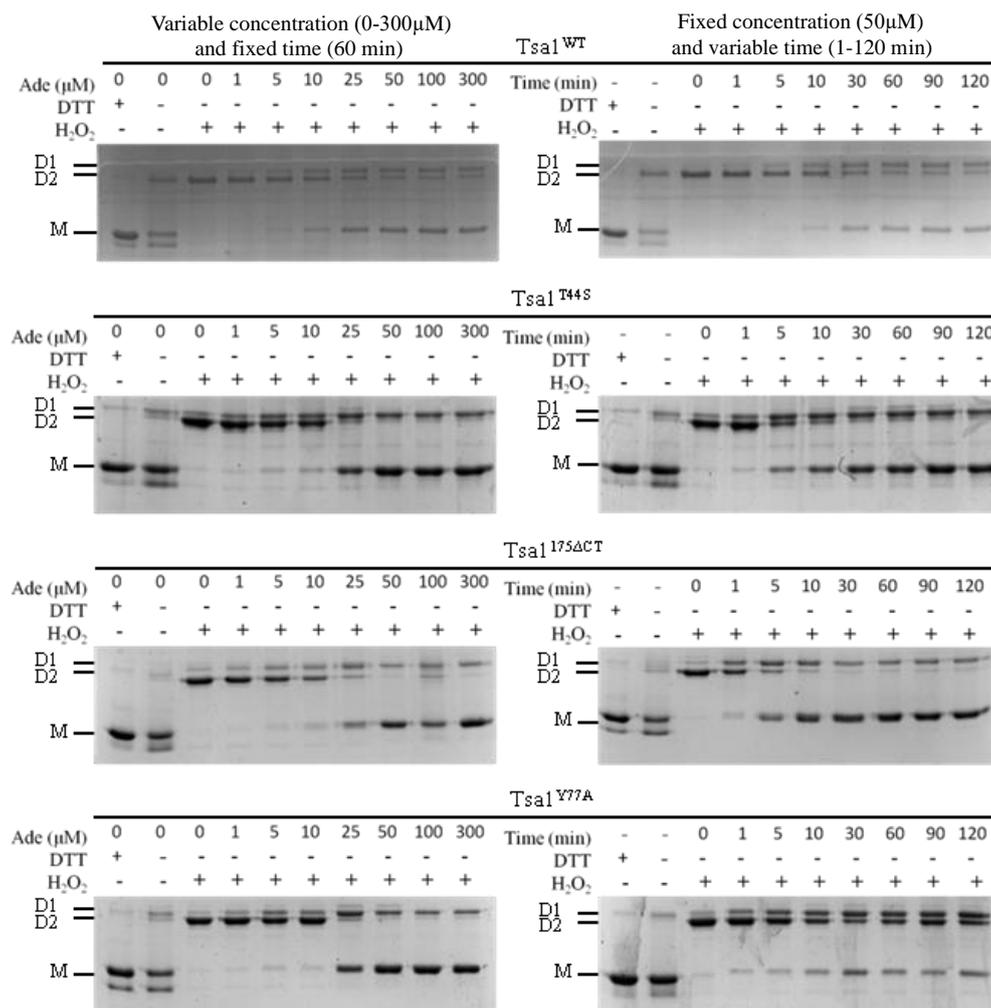


Figura 7: Ensaio de oxidação em SDS-PAGE de Tsa1^{WT}, Tsa1^{T44S}, Tsa1^{175ΔCT} e Tsa1^{Y77A} tratadas com adenantina. As proteínas reduzidas, em concentração final de 10 μM, foram tratadas com 1, 5, 10, 25, 50, 100 e 300 μM de adenantina por uma hora (coluna à direita) ou tratadas com 50 μM de adenantina por 0, 1, 5, 10, 30, 60, 90 e 120 minutos (coluna à esquerda) antes de serem oxidadas com 12 μM de H₂O₂ por 30 minutos. As reações foram então paralisadas com adição de *stop buffer* e submetidas a análise em SDS-PAGE 12% não redutor. As primeiras e segundas *lanes* de cada gel representam os controles em que foram adicionadas apenas as proteínas reduzidas, antes e após a dessalinização, respectivamente. D1 = dímeros unidos por um dissulfeto intermolecular; D2 = dímeros unidos por dois dissulfetos intermoleculares; M = monômeros.

4.3 A substituição da Thr⁴⁴ por uma Ser torna a estrutura secundária de Tsa1 mais suscetível a alterações em função da ligação com adenantina.

Uma vez determinado que a ligação da adenantina ao sítio ativo de Tsa1 interfere na formação do dissulfeto intermolecular na proteína oxidada, foram realizados ensaios de espectroscopia de dicroísmo circular (CD) com Tsa1^{WT}, Tsa1^{T44S}, Tsa1^{175ΔCT} e Tsa1^{Y77A} a fim de avaliar possíveis alterações na estrutura secundária dessas proteínas em função da ligação com adenantina. Conforme observa-se na figura 8, não ocorreram alterações significativas na estrutura secundária de Tsa1^{WT}, Tsa1^{175ΔCT} e Tsa1^{Y77A} em função da ligação com adenantina, mas apenas um discreto aumento na proporção de α -hélices e diminuição de folhas β de aproximadamente 2% (Figura 8A, C e D; Tabela 1). Por outro lado, Tsa1^{T44S} apresentou um aumento acentuado na proporção de α -hélices (de 20,83% para 27,7%) sobre folhas β (de 26,54% para 19,59%) após o tratamento com adenantina (Figura 8B; Tabela 1).

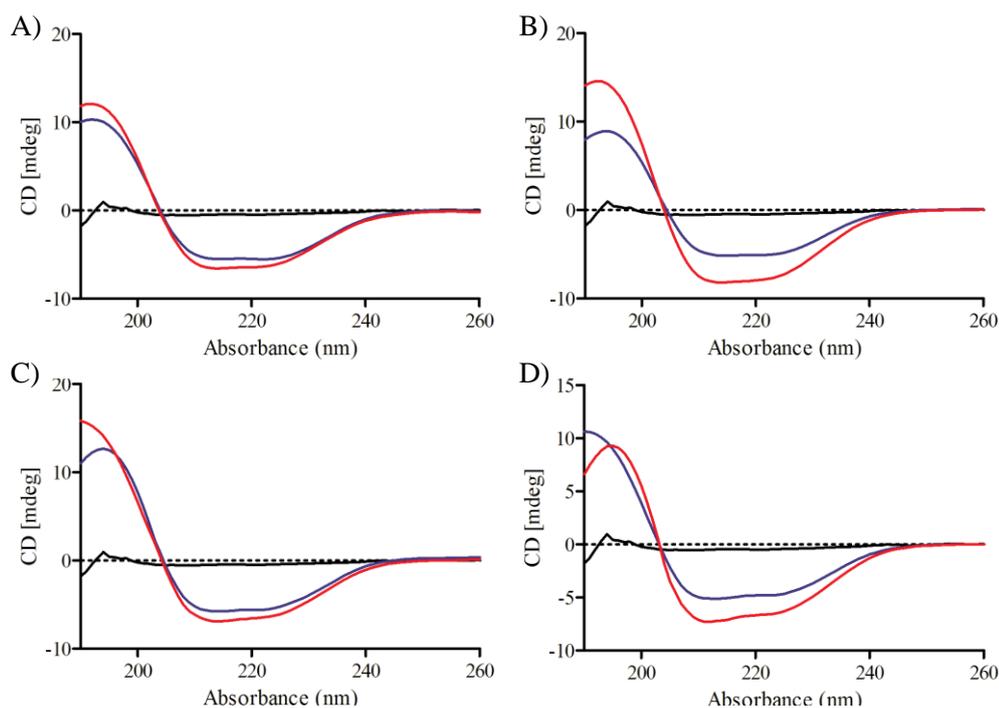


Figura 8: Espectroscopia de dicroísmo circular (CD) de Tsa1 selvagem e seus mutantes tratados com adenantina. Tsa1^{WT} (A), Tsa1^{T44S} (B), Tsa1^{175ΔCT} (C) e Tsa1^{Y77A} (D) reduzidas, em concentração final de 5 μ M, foram tratadas com 25 μ M de adenantina por uma hora a temperatura ambiente (linhas vermelhas). A seguir, as amostras foram oxidadas com 6 μ M de H₂O₂ por 30 minutos e então submetidas à análise de CD. Como controle, foram utilizadas as proteínas sem o tratamento com adenantina (linhas azuis) e amostras sem proteína, apenas com adenantina em tampão (linhas pretas).

Tabela 1: Análise comparativa dos dados de espectroscopia de CD para estimativa da composição da estrutura secundária de Tsa1^{WT}, Tsa1^{T44S}, Tsa1^{175ΔCT} e Tsa1^{Y77A} tratadas ou não com adenantina. As porcentagens foram estimadas utilizando o software CDNN 2.1

	Tsa1 ^{WT}		Tsa1 ^{T44S}		Tsa1 ^{175ΔCT}		Tsa1 ^{Y77A}	
	Ade -	Ade +	Ade -	Ade +	Ade -	Ade +	Ade -	Ade +
α helix	21,09%	23,01%	20,83%	27,76%	23,13%	25,07%	21,15%	23,72%
β strand	26,30%	24,18%	26,54%	19,59%	23,22%	21,56%	26,90%	24,36%
β turn	16,42%	16,49%	16,34%	16,44%	16,26%	16,37%	16,55%	16,76%
Random coil	36,19%	36,23%	36,38%	36,22%	37,49%	37,00%	35,4%	35,07%

4.4 A interação com adenantina é capaz de afetar a estrutura quaternária de Tsa1^{WT}

Segundo a proposta de Liu e col. (LIU *et al.*, 2012, 2013), a molécula de adenantina estaria interagindo não apenas com C_R, mas também com diversos resíduos de aminoácidos da região do sítio ativo (Figura 4B). Adicionalmente, esses resíduos de aminoácidos estariam envolvidos em uma série de interações polares e apolares que seriam responsáveis pela manutenção da estrutura decamérica de Tsa1 (Figura 6). Dessa forma, com o objetivo de verificar se a ligação com a adenantina comprometeria a estabilidade da estrutura decamérica de Tsa1 selvagem e mutantes, foram realizados ensaios de cromatografia de exclusão molecular (SEC) com as proteínas tratadas (Figura 9 – linha vermelha) e não tratadas (Figura 9 – linha azul) com adenantina. Os resultados revelaram que, sem o tratamento com adenantina, Tsa1^{WT} apresentou um padrão de eluição em que é possível observar dois picos com massas moleculares bastante similares, possivelmente representando a proteína em estrutura decamérica com dois diferentes graus de compactação, (Figura 9A- linha azul). Este fenômeno já era esperado pois uma leve oxidação pode levar ao aparecimento de outras espécies oligoméricas na proteína selvagem, como demonstrado em trabalho anterior (TAIRUM *et al.*, 2012). Após o tratamento com adenantina, Tsa1^{WT} passou a eluir em um único pico (Figura 9A- linha vermelha), indicando que a presença do ligante no sítio ativo da proteína foi capaz de estabilizar a estrutura do decâmero. Entretanto, é possível perceber que existe assimetria no pico o que pode indicar que a ligação não foi homogênea (Figura 9A- linha azul). Por outro lado, Tsa1^{T44S}, Tsa1^{175ΔCT} e Tsa1^{Y77A} não apresentaram alterações na estrutura quaternária detectáveis nas condições utilizadas nesses ensaios (Figura 9B-D). É possível observar um ligeiro deslocamento dos picos relativos ao dímero em Tsa1^{Y77A}, que é uma proteína dimérica constitutiva, e, sobretudo, dos picos relativos aos decâmeros em Tsa1^{T44S}. Entretanto, a resolução dos dados obtidos com coluna utilizada neste ensaio não é

suficiente para afirmar que tais resultados indiquem alterações estruturais em função da ligação dessas proteínas com a adenantina.

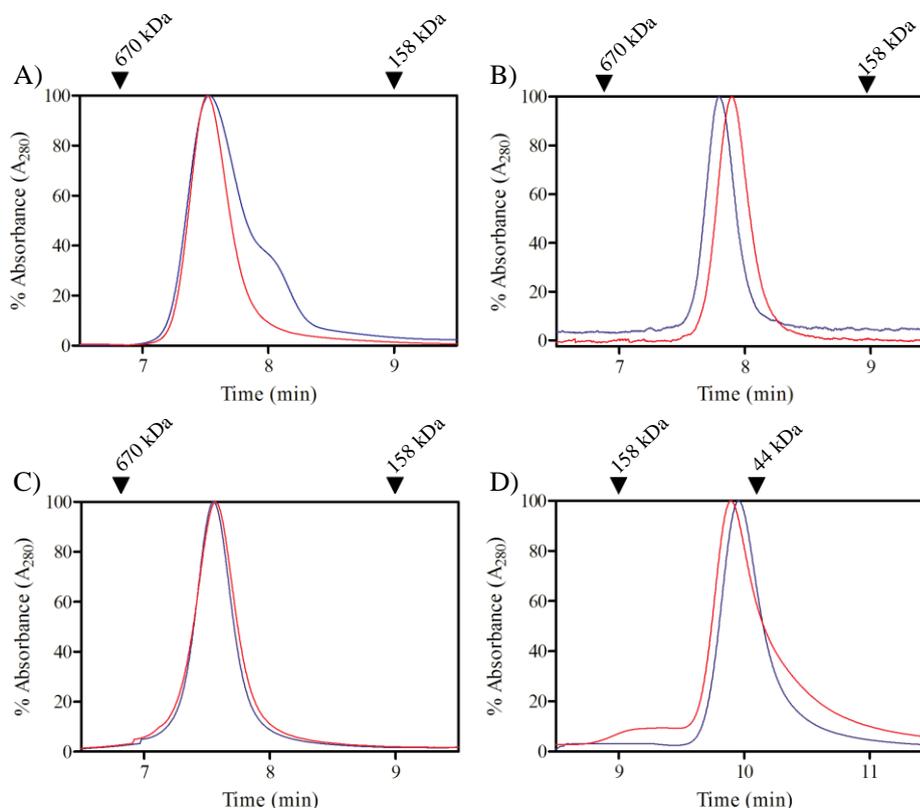


Figura 9: Cromatografia de exclusão molecular (SEC) de Tsa1 selvagem e seus mutantes tratadas com adenantina. Tsa1^{WT} (A), Tsa1^{T44S} (B), Tsa1^{I75ΔCT} (C) e Tsa1^{Y77A} (D) reduzidas, em concentração final de 10 μM, foram tratadas com 300 μM de adenantina por uma hora a temperatura ambiente (linhas vermelhas). A seguir, as amostras foram oxidadas com 12 μM de H₂O₂ por 30 minutos e então submetidas à análise de SEC. Como controle, foram utilizadas as proteínas sem o tratamento com adenantina (linhas azuis). Os padrões de eluição foram monitorados a um comprimento de onda de 280 nm. Tiroglobulina bovina (670kDa), gamaglobulina bovina (158 kDa), ovalbumina (44 kDa) e mioglobulina (17 kDa) foram utilizados como marcadores de peso molecular (Bio-Rad).

4.5 A presença de um resíduo de Ser na tríade catalítica aumenta a eficiência da inibição de Tsa1 por adenantina.

Com o objetivo de determinar a influência da ligação da adenantina ao sítio catalítico de Tsa1 em sua atividade peroxidásica, foram realizados ensaios de oxidação de NADPH ($\epsilon_{340\text{nm}} = 6200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (CHAE; CHUNG; RHEE, 1994). Este ensaio avalia a oxidação das moléculas de NADPH, que representa um sistema acoplado com o sistema Trx. Dessa forma, após Tsa1 decompor moléculas de HPx, suas cisteínas são regeneradas a sulfidrilas pelo sistema Trx através de elétrons oriundos do NADPH, que se oxida a NADP⁺ e deixa de

absorver a 340nm, permitindo o acompanhamento da reação ao longo do tempo por espectrofotometria. Como é possível observar na figura 10, houve um menor decaimento da concentração de NADPH quando as proteínas Tsa1^{WT} e Tsa1^{175ΔCT} foram tratadas com adenantina, indicando uma inibição parcial da atividade peroxidásica destas enzimas (~66% e ~60%, respectivamente - Figura 10A e 10C; Tabela 2). Adicionalmente, é possível observar que a mutante Tsa1^{Y77A} apresenta uma velocidade de reação menor do que as demais proteínas, conforme já havia sido observado em trabalho anterior (TAIRUM-JR *et al.*, 2016), o que pode ser explicado pelo fato desta proteína ser dimérica constitutiva e, portanto, incapaz de realizar as interações interdiméricas responsáveis por tornar o sítio ativo mais apto ao ataque às moléculas de HPx (Figura 10D). A redução da velocidade da reação em função da ligação com adenantina, contudo, foi proporcional às observadas para Tsa1^{WT} e Tsa1^{175ΔCT} (~67%). Por outro lado, a velocidade da reação de Tsa1^{T44S} apresentou uma queda mais acentuada após o tratamento com adenantina (~85%), indicando que a presença da Ser na tríade catalítica favoreceu a atividade inibitória deste ligante (Figura 10B).

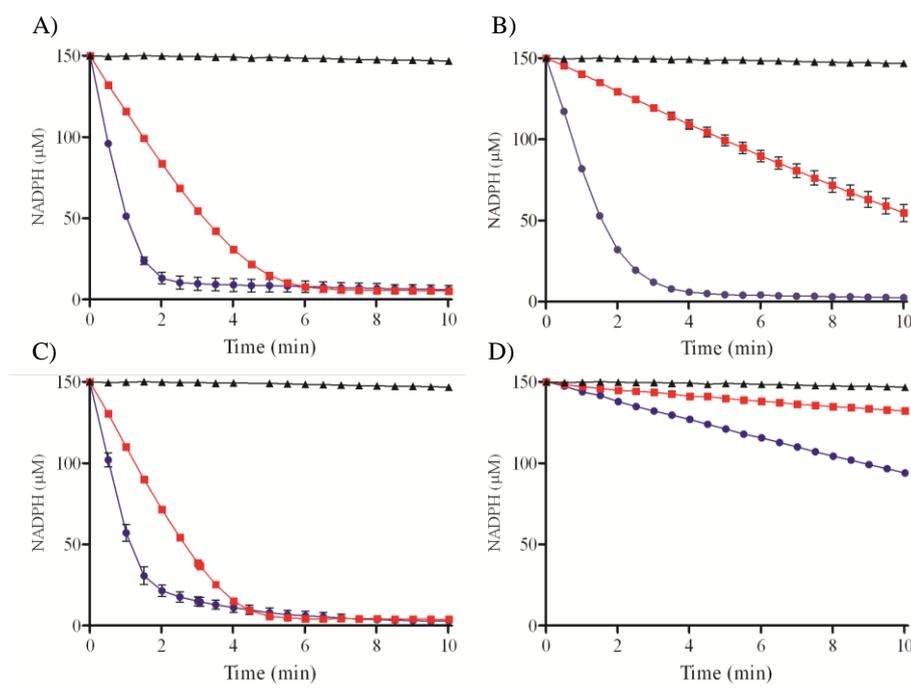


Figura 10: Ensaio de inibição da atividade peroxidásica de Tsa1^{WT}, Tsa1^{T44S}, Tsa1^{175ΔCT} e Tsa1^{Y77A} por adenantina. A inibição da atividade peroxidásica de Tsa1 selvagem e mutantes por adenantina foi analisada através de ensaio de oxidação de NADPH. Tsa1^{WT} (A), Tsa1^{T44S} (B), Tsa1^{175ΔCT} (C) e Tsa1^{Y77A} (D) reduzidas foram tratadas com 30 equivalentes molares de adenantina por uma hora e, posteriormente, dessalinizadas para a remoção do excesso de ligante. A seguir, foram montadas as reações contendo 1 µM de Tsa1 com e sem o tratamento com adenantina (■ e ● respectivamente), 2 µM de Trx1, 0,3 µM de TrxR1 e 150 µM de NADPH, que foram então iniciadas pela adição de 200 µM de H₂O₂ e monitoradas espectrofotometricamente a 340nm. Como controle, foram utilizadas reações sem a adição de Tsa1^{WT} (▲).

Tabela 2: Velocidade das reações contendo Tsa1^{WT}, Tsa1^{T44S}, Tsa1^{175ΔCT}, Tsa1^{Y77A}, Trx1 e TrxR1 tratadas e não tratadas com adenantina.

	Velocidade (μM/s)	
Tsa1 ^{WT}	1,74	0,58
Tsa1 ^{T44S}	1,08	0,16
Tsa1 ^{175ΔCT}	1,55	0,61
Tsa1 ^{Y77A}	$9,3 \times 10^{-2}$	$3,0 \times 10^{-2}$
Trx1	1,74	0,49
TrxR1	1,74	0,34
	Ade-	Ade+

Embora Liu e colaboradores (2012) (LIU *et al.*, 2012) tivessem inicialmente proposto que a adenantina fosse um inibidor específico para as Prx, Soethoudt e colaboradores (2014) (SOETHOUDT *et al.*, 2014) demonstraram que essa molécula seria capaz de ligar-se também a Trx e TrxR de humanos. Nesse caso, a queda na atividade peroxidásica seria resultado da inibição do sistema redutor e não necessariamente das Prx. Frente a essa controvérsia, nos pareceu interessante avaliar a ligação da adenantina ao sistema Trx de *S. cerevisiae*. Para isso, Trx1 e TrxR1 reduzidas foram individualmente tratadas com adenantina e utilizadas em ensaio de oxidação de NADPH com Tsa1^{WT} (não tratada). Assim como demonstrado anteriormente para as enzimas de humanos, a adenantina foi capaz de inibir a atividade peroxidásica de Tsa1 em função do bloqueio de seu sistema redutor (Figura 11). No caso do sistema Trx de *S. cerevisiae*, a redução na velocidade da reação foi de ~72% e ~80% após o pré-tratamento de Trx1 e TrxR1, respectivamente, com adenantina (Tabela 2). Esses dados contrastam com os resultados apresentados por Liu e corroboram o trabalho de Soethoudt, deixando claro que a adenantina não apresenta especificidade pelas Prx. Esse fato é de total relevância, pois o sistema Trx participa de diversos processos celulares além da redução do dissulfeto das Prx (NETTO; ANTUNES, 2016) e, portanto, os efeitos do tratamento com adenantina sobre os diferentes tipos celulares devem ser minuciosamente estudados.

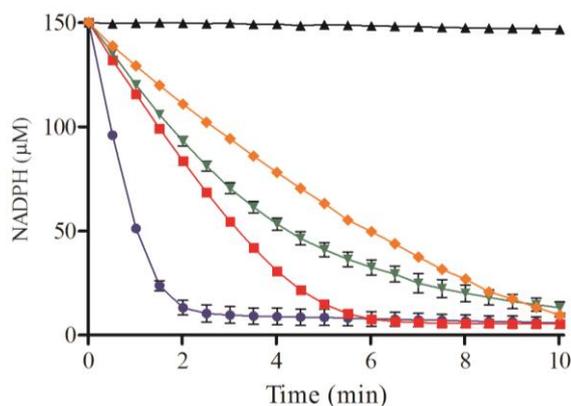


Figura 11: Ensaio de oxidação de NADPH com o sistema Trx pré-tratado com adenantina. Trx1 e TrxR1 reduzidas foram tratadas com 30 equivalentes molares de adenantina por uma hora, a temperatura ambiente, e posteriormente dessalinizadas para a retirada do excesso do ligante. A seguir, 2 μ M de Trx1 pré-tratada com adenantina foi incubada com 1 μ M de Tsa1^{WT}, 0,3 μ M de TrxR1 (não tratada) e 150 μ M de NADPH (linha verde) e 0,3 μ M de TrxR1 pré-tratada com adenantina foi incubada com 1 μ M de Tsa1^{WT}, 2 μ M de Trx1 (não-tratada) e 150 μ M de NADPH (linha laranja). As reações foram iniciadas pela adição de 200 μ M de H₂O₂ e a oxidação do NADPH foi monitorada espectrofotometricamente a 340nm, a 30°C. Como controle positivo foram utilizadas reações em que nenhuma proteína foi tratada com adenantina (linha azul) e, como controle negativo, reações sem a adição de Trx1 ou TrxR1 (linha preta). Como comparativo, foi utilizada reação em que apenas Tsa1^{WT} foi tratada com adenantina (linha vermelha).

4.6 Efeitos estruturais e funcionais da ligação de adenantina ao sítio ativo de Tsa2

Diante dos resultados obtidos nos experimentos de CD e oxidação de NADPH, em que a mutante Tsa1^{T44S} apresentou alterações na estrutura secundária e taxa de inibição da atividade peroxidásica em função do tratamento com adenantina significativamente maiores dos que as demais enzimas avaliadas, resolvemos submeter a proteoforma selvagem Tsa2 de *S. cerevisiae* aos mesmos ensaios realizados anteriormente. Tsa1 e Tsa2 possuem homologia entre si (~87% de identidade e ~96% de similaridade), eficiência catalítica bastante similar e ambas são enzimas constitutivamente decaméricas pelo arranjo $\alpha_2(5)$ (Figura 12A e B) (TAIRUM-JR *et al.*, 2016). Entretanto, existem diferenças relevantes entre essas duas enzimas como a substituição da Thr da tríade catalítica por uma Ser em Tsa2 e a organização da região do sítio catalítico, que é mais compacta em Tsa1 (Figura 12C, D, E e F). Conforme é possível observar na figura 12, o bolsão do sítio ativo de Tsa1, que contém uma Thr, é bastante abarrotado, enquanto que em Tsa2 ele é mais espaçoso, permitindo a movimentação dos resíduos de Ser e da C_p. Adicionalmente, a modelagem de uma molécula de adenantina no sítio ativo de Tsa1/Tsa2 (Figura 12E e F) revela que o tamanho do bolsão do sítio ativo pode influenciar significativamente a ligação do inibidor.

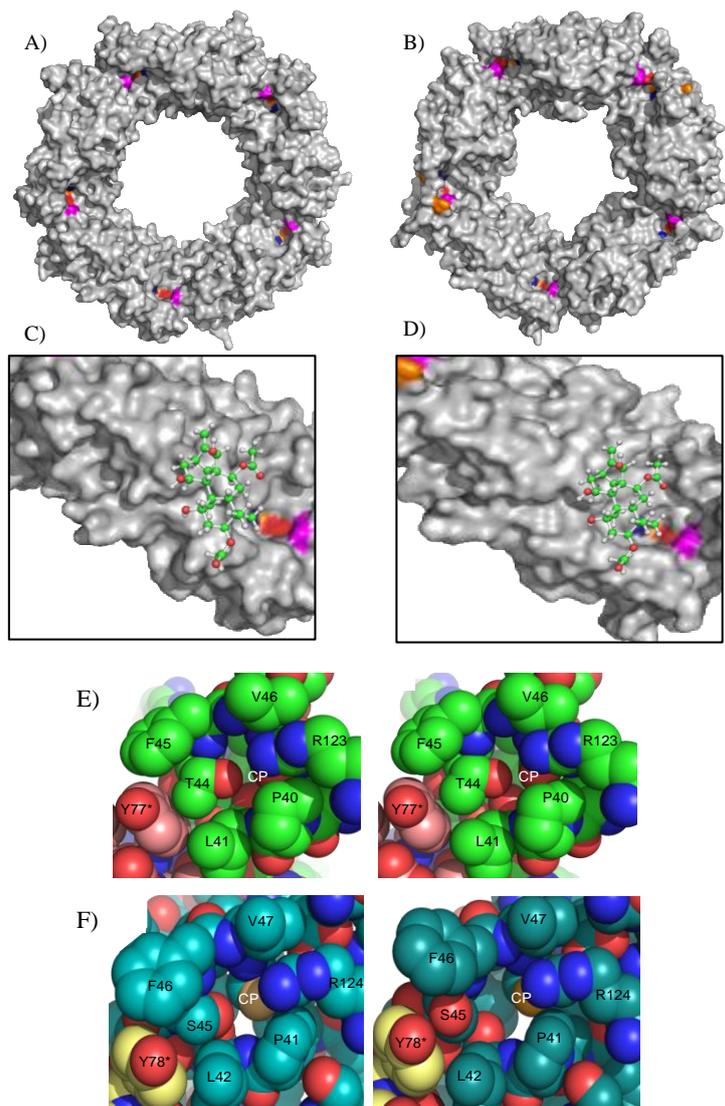


Figura 12: Análise comparativa das estruturas tridimensionais de Tsa1 e Tsa2. Superfície molecular de Tsa1 (A) e Tsa2 (B) na forma decamérica. Para ambas as enzimas, as estruturas são representadas em cinza e os resíduos do sítio ativo, localizados na interface dos dímeros e que apresentam importância à catálise são colorizados da seguinte forma: Thr/Ser⁴⁴, vermelho, C_p, laranja; Tyr⁷⁷, magenta; Arg¹²³, azul. Detalhes do sítio ativo de Tsa1 (C) e de Tsa2 (D) modelados com uma molécula de adenantina considerando a possibilidade da adição de Michael com C_p e a cavidade do sítio ativo. Microambiente do sítio ativo de Tsa1 (E) e de Tsa2 (F) em estrutura decamérica e carreando a substituição de C_p por uma Ser. Ambas as estruturas estão apresentadas em dois rotâmeros diferentes. Em Tsa1, os átomos de carbono estão colorizados em verde/rosa e em Tsa2 em ciano/amarelo. Tanto para Tsa1 quanto para Tsa2, os átomos de nitrogênio estão colorizados em azul, os de oxigênio em vermelho e o átomo gama da Ser48 em laranja,. Todas as figuras foram elaboradas utilizando as estruturas pdb=3SBC para Tsa1 e pdb=5DVB para Tsa2, com o auxílio do *software* Pymol.

A avaliação da atividade peroxidásica sobre H₂O₂ revelou que Tsa2 tem sua velocidade de reação reduzida em ~75% ($V_{Tsa2}=1,21\mu\text{M/s}$; $V_{Tsa2_Ade}=3,01 \times 10^{-1}\mu\text{M/s}$), um pouco menor do que a observada para a mutante Tsa1^{T44S} (~85%) (Figura 13A). Adicionalmente, a formação do dissulfeto de Tsa2 tratada com adenantina revelou que, quando a reação ocorreu em altas concentrações de inibidor ou por longos períodos de tempo,

ocorreram espécies monoméricas e diméricas com um ou dois dissulfetos. Apesar da presença de H_2O_2 em concentração superior à da proteína (1,2 equivalentes molares), nenhuma amostra apresentou espécies com apenas dois dissulfetos, indicando a possível ligação de adenantina nas moléculas com apenas um dissulfeto (Figura 13B). As análises de CD revelaram que a ligação com adenantina é capaz de interferir na estrutura secundária da proteína, sendo que o tratamento resultou em um aumento na quantidade de α -hélices (de 21,3% para 27,4%) e diminuição de folhas- β (de 26,0% para 20,5%) (Figura 13C; Tabela 3). Finalmente, as análises da SEC não revelaram alterações na estrutura quaternária em função da ligação com adenantina, assim como havia sido observado para Tsa1^{T44S} (Figura 13D). Coletivamente, esses resultados demonstram que a substituição da Thr⁴⁴ de Tsa1 por uma Ser fez com que essa proteína mutante apresentasse comportamento semelhante ao de Tsa2, além de sugerir fortemente que a presença da Ser na tríade catalítica torna as Prx 2-Cys mais suscetíveis à inibição por adenantina.

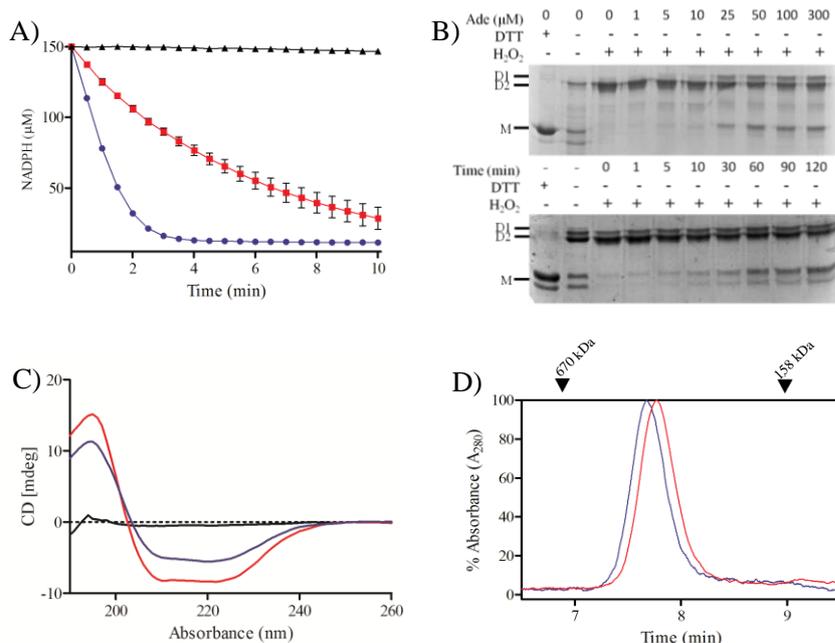


Figura 13: Efeitos estruturais e funcionais da ligação de adenantina sobre Tsa2. **A)** Avaliação da atividade peroxidásica através de ensaio de oxidação de NADPH de Tsa2 não tratada (linha azul) e tratada (linha vermelha) com adenantina. As condições experimentais foram as mesmas descritas anteriormente para as demais enzimas (figuras 8, 9, 10 e 11). As linhas pretas referem-se ao controle negativo, sem adição de Tsa2. **B)** SDS-PAGE não redutor da oxidação de Tsa2 após tratamento com adenantina. As condições experimentais foram idênticas às adotadas nos ensaios anteriores. As primeiras e segundas *lanes* referem-se ao controle com Tsa2 reduzida antes e após a dessalinização, respectivamente. D1= dímero contendo um dissulfeto; D2= dímero contendo dois dissulfetos; M= monômero. **C)** e **D)** Avaliação dos efeitos da ligação de adenantina sobre a estrutura secundária e quaternária de Tsa2, respectivamente. As condições experimentais foram idênticas as adotadas nos ensaios anteriores com as demais enzimas. Linhas vermelhas referem-se a Tsa2 tratada com adenantina e linhas azuis a Tsa2 não tratada.

Tabela 3: Análise dos dados de espectroscopia de CD para estimativa da composição da estrutura secundária de Tsa2 tratada ou não com adenantina.

	Ade -	Ade +
α helix	17,45%	25,31%
β strand	24,28%	20,21%
β turn	17,99%	17,52%
Random coil	40,29%	36,86%

4.7 Atividade antimicrobiana de adenantina

Os dados obtidos neste trabalho demonstram que a adenantina é capaz de ligar-se ao sistema Trx de *S. cerevisiae* e bloquear a reciclagem de Tsa1 oxidada e estão de acordo com os resultados observados em proteínas de humanos (SOETHOUDT *et al.*, 2014). Entretanto, os sistemas redutores de eucariotos inferiores e de bactérias são bastante distintos dos de humanos. Em relação aos primeiros, a TrxR é uma molécula de baixo peso molecular, sendo o dímero com ~70kDa a sua unidade biológica e cuja atividade se dá graças a um resíduo de Cys reativo. Por outro lado, a TrxR de eucariotos superiores possuem dímeros de alto peso molecular (~100 kDa) e, em muitos casos, a Cys reativa é substituída por uma selenocisteína. Já as bactérias possuem o sistema redutor para Prx representado pelas AhpF (Alquil hidroperóxido redutase subunidade F) que consiste em uma molécula de TrxR fusionada a duas moléculas de Trx contíguas, que é capaz de reduzir Prx 2-Cys típicas bacterianas, denominadas AhpC (Alquil hidroperóxido redutase C), com alta especificidade.(FRITZWOLF; URIG; BECKER, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2010; PARSONAGE, D *et al.*, 2016; WOOD, Z. A.; POOLE; KARPLUS, 2001) As diferentes classes de TrxR e AhpF estão representadas na figura 14. Nesse contexto, é possível que a adenantina consiga inibir a atividade catalítica dos sistemas redutores de eucariotos inferiores e procariotos em graus diferentes dos de eucariotos superiores, o que pode ser vantajoso no tratamento de determinadas doenças infecciosas cujos os agentes etiológicos sejam bactérias, fungos e protozoários. Entretanto, estudos adicionais comparativos são necessários para lançar luz a esta temática.

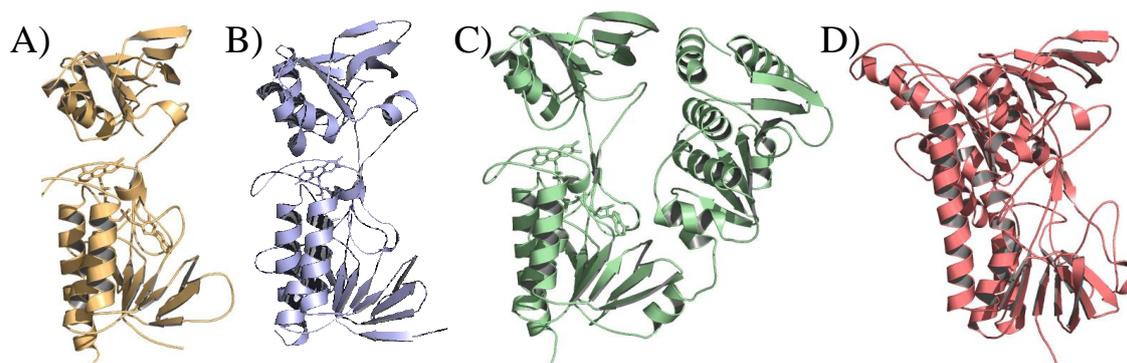


Figura 14: Comparação entre estruturas de TrxR de fungo, protozoário e humanos e AhpF de bactérias. Todas as estruturas estão apresentadas em *cartoon* como monômeros. **A)** *S. cerevisiae* TrxR1 (pdb: 3ITJ). **B)** *Entamoeba histolytica* TrxR (pdb: 4CCR); **C)** *Salmonella typhimurium* AhpF (pdb: 1HYU). **D)** *H. sapiens* TrxR1 (pdb: 2J3N). As representações gráficas foram geradas com auxílio do software Pymol.

Adicionalmente, todos os estudos publicados até o momento descrevem a atividade inibitória da adenantina sobre Prx 2-Cys que possuem um resíduo de Thr como parte da tríade catalítica e, dessa forma, esse foi o primeiro trabalho abordando uma Prx 2-Cys com uma Ser nessa posição. Utilizando ferramentas de bioinformática, analisamos o banco de dados GenBank do NCBI (National Center for Biotechnology Information) a fim de avaliar as sequências de Prx contendo a substituição natural da Thr da tríade catalítica por uma Ser. Nossos resultados revelaram que a vasta maioria dos organismos eucariotos sequenciados até o momento possuem Prx 2-Cys com uma Thr na tríade catalítica. Por outro lado, a tríade catalítica contendo uma Ser é um evento mais comum em procariotos, especialmente em bactérias. A figura 15 mostra o alinhamento de Prx 2-Cys típicas contendo Thr (Figura 15A) e Ser (Figura 15B) como parte da tríade catalítica.

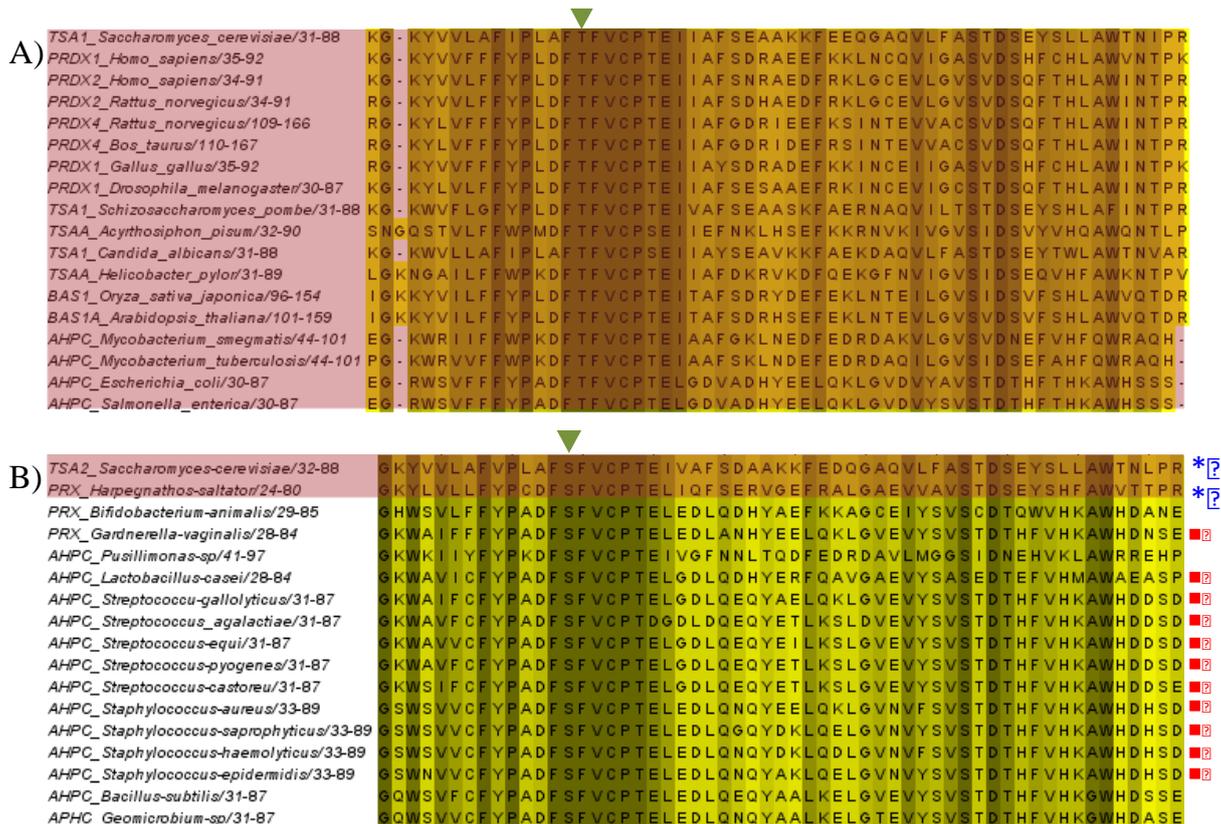


Figura 15: Alinhamento das seqüências de aminoácidos de Prx 2-Cys típicas. Alinhamento de Prx 2-Cys contendo Thr (A) ou Ser (B) na tríade catalítica. Os resíduos idênticos estão sombreados em verde escuro e seqüências similares são indicadas pelo gradiente de verde com base na conservação das características físicoquímicas. A caixa sombreada em vermelho indica os organismos eucariotos, o triângulo invertido aponta o resíduo de Thr ou Ser da tríade catalítica e o asterisco azul os organismos eucariotos que apresentam Ser na tríade catalítica. O quadrados vermelhos marcam espécies de bactérias patogênicas. O alinhamento da seqüência de aminoácidos foi realizado utilizando a ferramenta Clustal σ e as figuras foram geradas com a ferramenta Jalview

No grupo dos organismos que possuem uma Ser como parte da tríade catalítica das Prx, existe uma série de bactérias Gram positivas do gênero *Staphylococcus* como *S. agalactiae*, *S. castoreus*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. gallolyticus*, *S. equi* e *S. pyogenes* que são agentes etiológicos de várias doenças humanas como endocardite, septicemia, periodontite, infecções agudas do trato urinário, infecções de pele, dentre outros. Algumas dessas doenças constituem um sério problema de saúde pública uma vez que ocorrem geralmente em ambiente hospitalar, podendo acometer pacientes imunocomprometidos e, em alguns casos os antibióticos atuais não são efetivos em matar determinadas cepas dessas bactérias (OTEO; BELÉN ARACIL, 2015; PURRELLO *et al.*, 2016). Neste contexto, tanto as características específicas do sistema redutor bacteriano quanto a presença da Ser na tríade catalítica das Prx 2-Cys de determinadas espécies de

bactérias colocam a adenantina como uma candidata promissora no desenvolvimento de um novo tratamento antibiótico.

A fim de investigar a possível atividade bactericida da adenantina, realizamos ensaios de avaliação de citotoxicidade utilizando cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli*. Nossos resultados indicam que a morte celular foi mais acentuada para *S. aureus* e para *S. epidermidis*, ambas apresentando a Ser na tríade catalítica das Prx, enquanto *E. coli*, que possui uma Thr nessa posição, apresentou a maior viabilidade celular (Figura 16). O IC₅₀ para *S. aureus* e *S. epidermidis* foi determinado na ordem de 460 e 77µM, respectivamente. Dessa forma, este trabalho apresenta a primeira abordagem acerca do potencial da utilização da adenantina como um antimicrobiano, bem como a estreita relação entre a presença do resíduo de Thr/Ser na tríade catalítica e a intensidade da inibição da sua atividade peroxidásica pela adenantina.

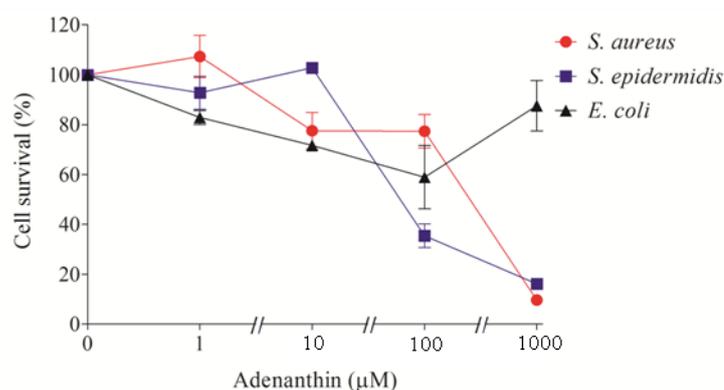


Figura 16: Viabilidade celular de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli* tratadas com adenantina. As células de *S. aureus* (●), *S. epidermidis* (■) e *E. coli* (▲) foram cultivadas em caldo BHI até OD₆₂₅=0,1 e tratadas com crescentes de adenantina (1µM, 10µM, 100µM e 1000µM) por 24 horas, a 37°C, sendo então quantificadas espectrofotometricamente a 625nm.

4.8 Avaliação do efeito citotóxico da adenantina sobre células LLA

Outro objetivo deste trabalho foi avaliar a citotoxicidade da adenantina sobre células de LLA e, para isso, utilizamos as linhagens de células leucêmicas REH e MOLT-4. A escolha destas linhagens foi em decorrência da ação de uma droga utilizada em todos os protocolos clínicos para o tratamento da LLA denominada L-asparaginase. A L-asparaginase é uma enzima que, geralmente, é isolada de bactérias como *E. coli* e *Erwinia chrysanthemi* e sua atuação reside na depleção do aminoácido asparagina (Asn) da corrente sanguínea. Por

motivos desconhecidos, as células de LLA deixam de expressar ou expressam de forma insignificante a enzima asparagina sintetase (ASNS), responsável pela síntese de Asn, tornando-se, portanto, dependentes da Asn extracelular para sobreviver. Uma vez que a grande maioria das células normais é capaz de sintetizar Asn, sua depleção da corrente sanguínea pela L-asparaginase mata seletivamente as células tumorais (LOPES *et al.*, 2015). A linhagem MOLT-4 apresenta essa característica padrão de células de LLA, ou seja, não é capaz de sintetizar Asn e, portanto, é sensível à ação da L-asparaginase. Entretanto, algumas linhagens de células de LLA, como a REH, possuem a enzima ASNS ativa, o que torna a célula tumoral resistente à L-asparaginase (COSTA *et al.*, 2016; HERMANOVA *et al.*, 2012). Atualmente, toda a L-asparaginase utilizada no Brasil é importada e nosso grupo de pesquisa está trabalhando na identificação e produção de novas L-asparaginases oriundas de microrganismos e, neste contexto, nos parece importante a caracterização de um novo quimioterápico possa ser utilizado juntamente com L-asparaginases, o que poderá levar a novas abordagens terapêuticas para o tratamento da LLA.

Para as análises de viabilidade celular, as células REH e MOLT-4 foram tratadas com concentrações crescentes de adenantina durante 24, 48 e 72 horas. Conforme é possível observar na figura 17 e tabela 4, a adenantina mostrou-se tóxica para ambas as linhagens, porém sua toxicidade foi maior para MOLT-4. Curiosamente, MOLT-4, apresentou maior viabilidade celular após o tratamento com adenantina por 72 horas do que após o tratamento por 48 horas. Uma possível explicação para esse fenômeno seria a promoção da proliferação celular, possivelmente causada por diferenciação celular mediada pelo tratamento com a adenantina, fenômeno este que já havia sido observado em 2012 por Liu e colaboradores para células de LMA (LIU *et al.*, 2012). Segundo os autores, no caso das células de LMA, a diferenciação de células da linhagem NB4 ocorreria em função do aumento dos níveis de HPx decorrentes da inibição da atividade peroxidásica de Prx1 e Prx2, favorecendo a ativação de ERK1, ERK2 e p38 e diminuindo a expressão de c-Jun, o que elevaria a expressão de C/EBP β , responsável pela maturação das células mieloides. Embora sejam necessárias análises adicionais a fim de compreender as causas da proliferação apresentada pelas células MOLT-4 após o tratamento por 72 horas com adenantina, os resultados obtidos constituem os primeiros indícios de diferenciação celular observados em células de LLA mediados pela ação da adenantina.

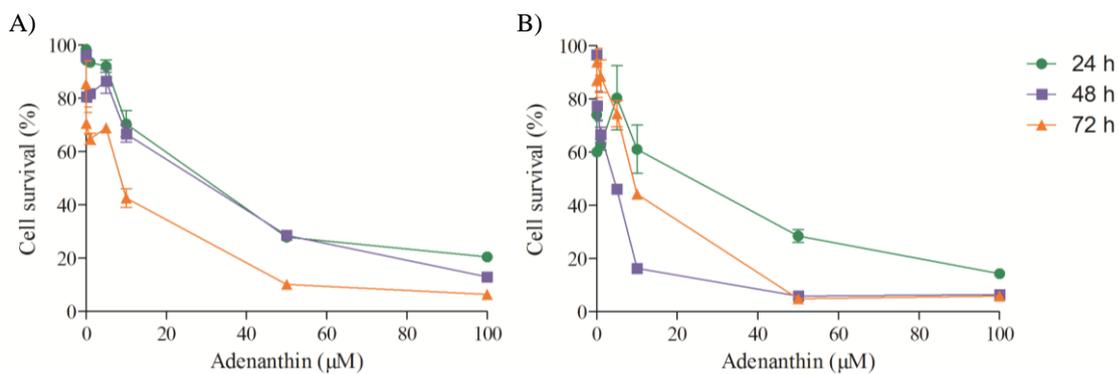


Figura 17: Viabilidade celular das linhagens REH e MOLT-4 após tratamento com adenantina. As células REH (A) e MOLT-4 (B) foram tratadas com concentrações crescentes de adenantina (0,1µM, 1µM, 5µM, 10µM, 50µM e 100µM) por 24 (●), 48 (■) e 72 horas (▲) e sua viabilidade foi avaliada através de ensaio de redução de MTT.

Tabela 4: Valores de IC_{50} de adenantina contra células REH e MOLT-4 calculados com o auxílio do *software* GraphPad Prim 5.

	IC_{50} (µM)	
	REH	MOLT-4
24 horas	30,3	23,7
48 horas	26,3	3,0
72 horas	8,4	9,1

5. 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.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

O presente trabalho demonstrou o potencial da utilização da adenantina tanto como antibiótico quanto como antileucêmico para LLA e abre perspectivas para investigações futuras as quais destacamos:

- a) Análises funcionais e estruturais, semelhantes às realizadas neste trabalho, envolvendo o mutante Tsa2^{S44T} para investigar se ocorre diminuição da ação inibitória de adenantina ao substituir a Ser da tríade catalítica desta enzima por uma Thr, corroborando assim os dados apresentados até o momento;
- b) Avaliar a citotoxicidade de adenantina sobre linhagens bacterianas na presença de HPx, uma vez que o estresse oxidativo constitui uma das defesas do hospedeiro durante a invasão do patógeno;
- c) Avaliar a citotoxicidade de adenantina utilizando linhagens bacterianas carreando deleção do gene de Prx 2-Cys ($\Delta ahpc$) e linhagens transformadas com plasmídeos carreando o gene para *ahpc* contendo Ser ou Thr na tríade catalítica;
- d) Caracterização comparativa dos níveis de inibição de adenantina sobre sistemas redutores de Prx 2-Cys de eucariotos (Trx e TrxR) e bactérias (AhpF);
- e) Verificar o efeito citotóxico da adenantina sobre outros procariotos patogênicos que apresentem o resíduo de Ser ou Thr na tríade catalítica, bem como calcular o IC₅₀ de adenantina para esses organismos;
- f) Avaliação da citotoxicidade de adenantina sobre linfócitos não leucêmicos a fim de determinar se a baixa toxicidade apresentada em mielócitos, demonstrada na literatura (HOU *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2012), ocorre também nessas células. Esses dados auxiliarão a avaliação da viabilidade da utilização de adenantina como um fármaco;
- g) Investigar o efeito sinérgico da administração de adenantina com as L-asparaginases caracterizadas no âmbito do projeto temático “Produção de L-Asparaginase extracelular: da bioprospecção à engenharia de biofármacos antileucêmicos” sobre as linhagens REH e MOLT4.

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.

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

- HOU, J.-K. *et al.* Adenanthin targets peroxiredoxin I/II to kill hepatocellular carcinoma cells. *Cell death & 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-alpha-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. 12, 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

Janus - Sistema Administrativo da 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 - 34.498.656-1 - 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). Gisele 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@clp.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 20/04/2013).

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
FBT5713-2/1	Biologia Molecular Aplicada à Biotecnologia Farmacêutica Industrial	09/03/2015	22/03/2015	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5752-3/1	Danos em Biomoléculas e o seu Papel no Monitoramento da Exposição a Agentes Tóxicos	11/06/2015	16/07/2015	45	3	100	A	N	Concluída
FBT5773-7/6	Tópicos Especiais em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica	03/08/2015	19/10/2015	30	0	-	-	N	Pré-matrícula recusada
FBT5738-1/2	Tópicos Especiais em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica III	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
BTC5819-1/2	Utilização de Saccharomyces cerevisiae como Organismo Modelo em Biologia Molecular (Curso Interunidades: Biotecnologia - Universidade de São Paulo)	28/08/2015	31/10/2015	90	6	90	A	N	Concluída
Crédito Externo	Biologia Molecular Estrutural de Proteínas e Aplicações Biotecnológicas (1)	16/11/2015	27/11/2015	-	6	100	T	-	-
FBT5773-7/7	Tópicos Especiais em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica	07/03/2016	15/05/2016	30	2	90	A	N	Concluída
FBA5728-4/3	Aprimoramento Pedagógico	16/08/2016	12/09/2016	60	4	100	A	N	Concluída
BIO5741-6/1	Ensaio Pedagógico 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(s) cursada(s) 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