



instituto de **química**
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências Matemáticas e da Natureza
Instituto de Química

Investigação da função da proteína Pdp3 no metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae*

Projeto Final de Curso
IQWX01

Orientadora: Profa Elis Cristina Araújo Eleuthério
Coorientadores – Prof^o Anderson Pinheiro e Pós-graduanda do
PPGBq/IQ/UFRJ Germana Rona

- 2017-

Natália Pinto de Almeida

**Investigação da função da proteína Pdp3 no metabolismo
de *Saccharomyces cerevisiae***

Projeto final de curso submetido ao corpo docente do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários para obtenção de grau de Químico com Atribuições Tecnológicas.

Orientador: Elis Cristina Araújo Eleuthério
Coorientadores: Anderson de Sá Pinheiro; Germana Breves Rona

Rio de Janeiro
2017

Investigação da função da proteína Pdp3 no metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae*

Natália Pinto de Almeida

Projeto final de curso submetido ao corpo docente do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Químico com Atribuições Tecnológicas.

Aprovado por:

Prof.^a Elis Cristina Araújo Eleuthério, D.Sc
Instituto de Química - UFRJ

Prof. Anderson Pinheiro, D.Sc
Instituto de Química - UFRJ

Germana Breves Rona, M.Sc
Instituto de Química – UFRJ

Prof. Marcos Dias Pereira, D.Sc
Instituto de Química – UFRJ

Prof.^a Tatiana Kelly da Silva Fidalgo, D.Sc
Faculdade de Odontologia - UERJ

À minha família, Márcia Almeida, Ivan Almeida e Victor Almeida.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente aos meus pais, Márcia Pinto de Almeida e Ivan Bulção de Almeida por todo carinho e apoio em todos os momentos da minha vida e por fazer de tudo para que isso fosse possível;

Ao meu irmão, por estar sempre do meu lado em todos os momentos e pela força para seguir em frente;

Aos meus avós, tios e primos pelo carinho recebido durante toda esse tempo;

Aos meus amigos pelo carinho de sempre;

Aos membros do Laboratório de Investigação de Fatores de Estresse (LIFE) pela ajuda diária, discussões e companheirismo;

À professora Elis Eleuthério pela orientação neste trabalho e por acreditar no meu potencial;

Ao professor Anderson Pinheiro pela orientação e ensinamentos durante esse período;

À Germana Rona, pela orientação, paciência, companheirismo;

Ao Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear, principalmente ao professor Fabio Almeida, pela disponibilização do laboratório e equipamentos para realização dos experimentos;

Ao Instituto de Química pelo conhecimento e oportunidades obtidos durante toda a graduação, que me fizeram crescer profissionalmente e pessoalmente;

À Deus, pela força e saúde para atingir todos os meus objetivos.

RESUMO

PROJETO DE CURSO – IQWX01

TÍTULO: INVESTIGAÇÃO DA FUNÇÃO DA PROTEÍNA PDP3 NO METABOLISMO DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

ALUNO: Natália Pinto de Almeida

ORIENTADOR: Elis Cristina Araújo Eleuthério, DBQ – Instituto de Química – UFRJ

COLABORADORES: Anderson de Sá Pinheiro, DBQ – Instituto de Química – UFRJ
Germana Breves Rona, PPGBq – Instituto de Química - UFRJ

Atualmente, o câncer é uma grande preocupação visto que a incidência dos diversos tipos da doença aumentam a cada ano. O câncer de mama é o tipo mais frequente e de maior mortalidade entre as mulheres no mundo todo, com exceção do câncer de pele não melanoma. A NSD3 é uma proteína encontrada superexpressa em 15% dos casos de câncer de mama. Esta proteína tem papel importante no processo de transcrição gênica. A isoforma curta desta proteína, obtida devido ao processo de *splicing* alternativo, NSD3c, possui um domínio PWWP em sua estrutura, também presente na isoforma longa. Tanto a superexpressão da NSD31 quando da NSD3c leva uma célula saudável a apresentar características semelhantes a de células tumorais. Assim como a NSD3c, a proteína Pdp3, encontrada em *Saccharomyces cerevisiae*, possui apenas um domínio PWWP. As sequências dos domínios PWWP da Pdp3 e da NSD3c apresentam 25% de identidade e, com isso, acredita-se que as funções dessas proteínas possam ser semelhantes. Já foi mostrado que a superexpressão em levedura de NSD3c assim como a de Pdp3 resulta em uma alteração de metabolismo, levando a célula a apresentar um metabolismo menos oxidativo, característica semelhante de células tumorais. Visto esta alteração de fenótipo, este trabalho teve como objetivo observar a alteração do perfil metabólico causada pela superexpressão da proteína Pdp3 em células de *S. cerevisiae* através da análise de Metabolômica por Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Foram realizados os experimentos de 1D ^1H RMN, 2D [^1H - ^1H] TOCSY (*Total Correlation Spectroscopy*) e 2D [^1H - ^{13}C] HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*). Os metabólitos foram extraídos com etanol, logo, apenas os metabólitos polares foram analisados. A análise estatística foi realizada através da Análise de Componente Principal (PCA), Análise Discriminante com Calibração Multivariada por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) e Múltiplo Teste T. Os resultados obtidos mostraram que a superexpressão de Pdp3 elevou a concentração intracelular de glicerol, glutamato/glutamina, alanina, trealose e leucina/isoleucina/valina e reduziu a concentração de ácido gamma-aminobutírico, colina, succinato, arginina, ornitina e histidina. A partir da análise das vias metabólicas em que estes metabólitos estão envolvidos e de informações obtidas da literatura sobre características de células tumorais, concluiu-se que a superexpressão da proteína Pdp3 produziu na levedura alterações metabólicas como aumento na concentração de glutamato/glutamina e alanina e diminuição dos níveis de arginina, que são semelhantes às observadas em células tumorais. Experimentos realizados com a proteína NSD3c mostraram que a sua superexpressão em *S. cerevisiae* resulta em uma alteração do perfil metabólico semelhante a observada neste trabalho, superexpressando a Pdp3. Estes resultados reforçam a ideia que *S. cerevisiae* é uma ferramenta muito útil na investigação dos mecanismos moleculares relacionados ao câncer visto que a superexpressão da Pdp3 e NSD3c leva a célula de *S. cerevisiae* a apresentar características de células tumorais.

Índice de Figuras

Figura 1: Inibidores de histona metil-transferases (SPANNHOFF; SIPPL; JUNG, 2009).	20
Figura 2: Esquema simplificado apresentando a disposição dos domínios presentes nas proteínas da família NSD (Figura adaptada de Yan Li, et al. J. Biol. Chem. 2009).	21
Figura 3: Vetor plasmidial pECUh6	30
Figura 4: Grupo de espectros analisados para a cepa controle WT.....	33
Figura 5: Grupo de espectros analisados para a cepa Pdp3+.	33
Figura 6: Região 0,80-1,12 ppm dos espectros de 1D ¹ H da cepa WT. Nesta figura estão representados os espectros das 6 amostras da cepa WT, diferenciados por cor.	35
Figura 7: Região 0,80-1,12 ppm dos espectros da cepa Pdp3+. Nesta figura estão representados os espectros das 4 amostras da cepa Pdp3+, diferenciados por cor.	36
Figura 8: Região 0,9-1,12 ppm dos espectros de 1D ¹ H representativos das cepas WT (linha vermelha) e Pdp3 (linha azul).	37
Figura 9: Gráfico de PCA 2D comparando as cepas WT (ESFERAS VERMELHAS) e Pdp3+ (ESFERAS VERDES). As variâncias de PC1 e PC2 são de 79,1% e 13,1%, respectivamente. PC1- Componente Principal 1: Direção na qual a variação dos dados é máxima; PC2 – Componente Principal 2: Direção não correlacionada com o PC1 na qual a variação dos dados é máxima.	39
Figura 10: Gráfico de PCA 3D comparando as cepas WT (ESFERAS VERMELHAS) e Pdp3+ (ESFERAS VERDES). As variâncias de PC1, PC2 e PC3 são de 79,1%, 13,1% e 3,7%, respectivamente. PC1- Componente Principal 1: Direção na qual a variação dos dados é máxima; PC2- Componente Principal 2: Direção não correlacionada com o PC1 na qual a variação de dados é máxima; PC3- Direção não correlacionada com o PC1 e PC2 na qual a variação dos dados é máxima.	40
Figura 11: Gráfico de PLS-DA 2D comparando as cepas WT (ESFERAS VERMELHAS) e Pdp3+ (ESFERAS VERDES). Componente1: 78,9%; Componente 2: 12,5%.	42

Figura 12: Gráfico de PLS-DA 3D comparando as cepas WT (ESFERAS VERMELHAS) e Pdp3+ (ESFERAS VERDES). Componente1: 78,9%; Componente 2: 12,5%; Componente3: 4,6%.....	43
Figura 13: Gráfico de comparação de intensidades relativas.....	45
Figura 14: Integração das vias de síntese e degradação do glicerol em <i>S. cerevisiae</i>	50
Figura 15: Comparação das vias do ciclo TCA e do glioxilato.....	52
Figura 16: Esquema simplificado da via de síntese da histidina associado a síntese de nucleotídeos.	53
Figura 17: Via de síntese do GABA (Ácido Gamma AminoButírico) em <i>S. cerevisiae</i>	55
Figura 18: Via biosintética de fosfolipídios (Via Kennedy).....	58
Figura 19: Via biosintética de Ornitina e Arginina em <i>S. cerevisiae</i>	60
Figura 20: Via de integração do metabolismo de Glutamato, Ciclo do Ácido Cítrico e síntese de Lipídios.	67

Lista de Siglas, abreviaturas e símbolos

AAT1	Gene codificante da Aspartato aminotransferase mitocondrial
Aco1	Aconitase
ALT1	Gene codificante da Alanine transaminase
Arg1	Argininosuccinato sintase
Arg2	Acetilglutamato sintase
Arg3	Ornitina carbamoiltransferase
Arg4	Argininosuccinato liase
Arg5,6	Acetilglutamato quinase e N-acetil-gamma-glutamil-fosfato redutase
Arg7	Ornitina acetiltransferase mitocondrial
Arg8	Acetilornitina aminotransferase
ATP	Adenosina Trifosfato
Bat1	BCAA aminotransferase mitocondrial
BCAA	Aminoácido de cadeia ramificada
BCAT1	Branched-chain amino acid transaminase 1
C5HCH	<i>Cys-His-rich domain</i>
CAR1	Arginase
Cit2	Citrato sintase
CKI1	Gene codificante da enzima colina quinase
CMP	Citidilato
CPMG	<i>Carr-Purcell-Meiboom-Gill</i>
CPT1	Gene codificante da enzima sn-1,2-diacilglicerol colinafosfotransferase
ctGDP	G3P desidrogenase citosólica
CTP	Citidina trifosfato

DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNMT3B	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 beta
G3P	Glicerol-3-fosfato
G9a/EHMT2	<i>Euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 2</i>
GABA	Ácido gama-aminobutírico
Gad1p	Glutamato descarboxilase
GDE1	Gene codificante da enzima glicerofosfocolina fosfodiasterase
GDH	Glutamato desidrogenase
GLS	Glutaminase
GLT1	Glutamato sintase dependente de NAD(+)
GPC	Glicerofosfocolina
GPP	Glicerol-3-fosfatase
Gut1	Glicerol quinase
Gut2	Glicerol-3-fosfato desidrogenase mitocondrial
HAT	Histona acetiltransferase
HDC	Histidina descarboxilase
HMTases	Histona Metiltransferases
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
Ic11	Isocitrato liase
LAT1	L-type aminoacid transsporter 1
Mdh2	Malato desidrogenase
MIs1	Malato sintase
Mpr1	N-acetiltransferase
MS	Espectroscopia de massas
mTOR	Mechanistic target of rapamycin

NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma reduzida
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina na forma reduzida
NMR	Ressonância Magnética Nuclear
NO	Óxido Nítrico
NSD1	Nuclear Receptor Binding SET Domain 1
NSD2	Nuclear Receptor Binding SET Domain 2
NSD3	Nuclear Receptor Binding SET Domain 3
NuA3	Complexo enzimático histone metiltransferase
ODC	Ornitina descarboxilase
PC	Fosfocolina
PCA	Análise de Componente Principal
PCT1	Gene codificante da enzima fosfocolina transferase
Pdp3	Componente do complex NuA3
PHD	<i>plant homeodomain</i>
PLS-DA	Análise Discriminante com Calibração Multivariada por Mínimos Quadrados Parciais
Put1	Prolina oxidase
PWWP	Módulo estrutural com motivo conservado Pro-Trp-Trp-Pro
RNA	Ácido Ribonucléico
SAC	<i>suppressor of actin domain</i>
Sas3	Subunidade catalítica do complex NuA3
SET	<i>Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste and Trithorax domain</i>
Set2	Enzima com atividade de histona metiltransferase
Tah18	Flavoproteína
TCA	Ciclo do ácido cítrico
TOCSY	<i>Total Correlation Spectroscopy</i>

TORC1	Target of rapamycin complex 1
TORC2	Target of rapamycin complex 2
UGA1	Gene codificante da Gamma-aminobutirato transaminase
UGA2	Gene codificante da Succinato semialdeído desidrogenase
WHSC1L1	<i>Wolf-Hirschhorn Syndrome Candidate 1-Like 1</i>

Sumário

1	Introdução	13
2	Objetivo	15
3	Revisão Bibliográfica	16
3.1	Modificações pós-traducionais e Epigenética.....	16
3.2	Domínio PWWP	17
3.3	Proteína Pdp3	18
3.4	Histona metil-transferases e a NSD3.....	19
3.5	Câncer	22
3.6	Metabolômica	23
3.7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25
4	Metodologia.....	29
4.1	Microrganismo <i>S. cerevisiae</i>	29
4.2	Cepas e Condições de Cultivo	29
4.3	Extrato Celular.....	30
4.4	Preparo da amostra para análise por RMN	31
4.5	Ressonância Magnética Nuclear	31
4.6	Análise Estatística.....	31
5	Resultados e Discussão.....	33
5.1	Análise do Perfil Metabólico por 1D ¹ H RMN	33
5.2	Análise estatística por PCA e PLS-DA	38
5.3	Identificação dos metabólitos estatisticamente diferentes através da análise de Múltiplo Test T e PLS-DA	44
5.4	Análise de Metabolismo Celular	49
5.4.1	Metabolismo de Glicerol, Trealose, Succinato e Histidina	49
5.4.2	Via do GABA (“GABA Shunt”).....	54
5.4.3	Metabolismo de Colinas.....	56
5.4.4	Metabolismo de Arginina e Ornitina	58
5.4.5	Via da Glutaminólise	61
6	Considerações Finais.....	68
7	Conclusão	70
8	Referências	71

1 Introdução

A proteína NSD3 é uma histona metil-transferase que tem como função transferir de um a três grupos metila para resíduos de lisina em histonas, mantendo a integridade do genoma. Esta proteína possui importância na manutenção da estrutura da cromatina e está associada aos processos de transcrição gênica, crescimento celular, apoptose e diferenciação (ALBERT; HELIN, 2010; MORISHITA; DI LUCCIO, 2011; ZHOU et al., 2010). Diversas histona metil-transferases são superexpressas em células tumorais e são uma grande fonte de estudo para o desenvolvimento de novos tratamentos para a doença (MORISHITA; DI LUCCIO, 2011). Há três isoformas da proteína NSD3 devido ao processo de *splicing* alternativo, longa(l), curta (c) e WHISTLE (*WHSC1-like 1 isoform 9 with methyltransferase activity to lysine*), que se diferenciam pela composição de aminoácidos e domínios. A superexpressão de NSD3l e NSD3c tem a capacidade de transformar uma célula saudável em uma célula com características tumorais. A NSD3c possui um domínio PWWP, que também está presente na isoforma longa (YANG et al., 2010; ZHOU et al., 2010). Este domínio PWWP está presente em proteínas que se associam à cromatina e estão relacionadas aos processos de divisão celular, crescimento e diferenciação (HUNG et al., 2015).

A proteína Pdp3 está presente em *Saccharomyces cerevisiae* e possui um único domínio PWWP. Esta proteína encontra-se associada ao complexo NuA3b, uma histona acetil-transferase, que possuiu a proteína Sas3 responsável por esta atividade. Este complexo se liga à histona 3 trimetilada no resíduo de lisina 36 (H3K36me3) através do domínio PWWP presente na Pdp3. A metilação da H3K36 é realizada pela proteína Set2 (GILBERT et al., 2014).

Os domínios PWWP da Pdp3 e da NSD3c apresentam 25% de identidade de sequência e acredita-se que as funções dessas proteínas possam ser semelhantes. Rona e colaboradores (2016) mostraram que a superexpressão da proteína Pdp3 em levedura resultou em uma alteração de metabolismo, levando a célula a apresentar um metabolismo menos respiratório, característica semelhante de células tumorais. Esta mesma alteração de fenótipo também foi observada ao superexpressar a proteína humana NSD3c em levedura (RONA et al., 2016). Com isso, é interessante saber quais alterações metabólicas são causadas pela superexpressão destas

proteínas e se essas alterações estão relacionadas com o metabolismo de células tumorais.

2 Objetivo

Objetivo geral

Avaliar a alteração do perfil metabolômico de *Saccharomyces cerevisiae* em resposta a superexpressão da proteína Pdp3, por meio da técnica de RMN.

Objetivos específicos

- ✓ Identificação e comparação de intensidades dos picos dos metabólitos que apresentam alteração em sua concentração intracelular em resposta à superexpressão de Pdp3.
- ✓ Análise das possíveis vias metabólicas afetadas e relação destas com o metabolismo característico de células tumorais.

3 Revisão Bibliográfica

3.1 Modificações pós-traducionais e Epigenética

Em células eucarióticas, a cromatina é constituída de fibras contendo proteínas, DNA e uma pequena quantidade de RNA. O nucleossomo constitui a unidade fundamental da cromatina. Este é constituído de um octâmero de histonas formado por duas cópias dos heterodímeros de H3, H4, H2A e H2B, ao qual o DNA encontra-se associado (ALBERT; HELIN, 2010; GILBERT et al., 2014; NELSON; COX, 2011). A estrutura da cromatina possui papel importante na manutenção da integridade do genoma e na regulação de processos como replicação, reparo do DNA e transcrição (ALBERT; HELIN, 2010).

Epigenética é definida como o conjunto de alterações hereditárias na expressão gênica sem que hajam alterações na sequência nucleotídica do genoma. Essas modificações incluem metilação do DNA e modificações pós-traducionais covalentes em histonas, como: acetilação, metilação, fosforilação e ubiquitinação (YUN et al., 2012). Assim como os eventos de mutação genética, modificações epigenéticas podem causar anormalidades no padrão de expressão gênica. Entretanto, diferentemente de mutações, alterações epigenéticas são reversíveis, podendo ser alvo de estudos para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas contra patologias, como o câncer (ALBERT; HELIN, 2010).

As histonas podem ser modificadas a partir de reações em determinados aminoácidos, alterando sua estrutura e, por conseguinte, da cromatina (NELSON; COX, 2011). As modificações pós-traducionais em histonas regulam o grau de compactação da cromatina e atuam como sítios de ligação para proteínas regulatórias. (ALBERT; HELIN, 2010). Essas alterações químicas modificam a interação entre DNA e histonas, aumentando ou diminuindo a acessibilidade ao DNA genômico (BOWMAN; POIRIER, 2015).

As caudas das histonas estão localizadas na região aminoterminal de histonas e são as regiões que mais sofrem modificações pós-traducionais. Essa região desempenha papel importante na regulação da compactação da cromatina, visto que a remoção das caudas de histonas impede o seu enovelamento. A compactação está fortemente relacionada com o processo de transcrição, pois estudos já mostraram que a hiperacetilação das caudas de histonas interrompem o enovelamento do

nucleossomo e promovem aumento na transcrição. Além do processo de transcrição, as modificações em caudas de histonas têm grande influência nos processos de reparo e replicação do DNA (BOWMAN; POIRIER, 2015).

Tanto a iniciação do câncer como o sua progressão são causados por alterações genéticas e epigenéticas que podem ativar oncogenes ou inativar genes supressores de tumor. Essas alterações podem afetar o estado metabólico da célula, regulando a expressão de enzimas e então, causando a alteração no metabolismo observada em células tumorais. Da mesma forma, a alteração no metabolismo também pode afetar o estado epigenético alterando a expressão de oncogenes e genes supressores de tumor (YUN et al., 2012).

3.2 Domínio PWWP

O domínio PWWP é um módulo estrutural que apresenta o motivo de sequência Pro-Trp-Trp-Pro (Prolina- Triptofano- Triptofano- Prolina), no qual apenas o terceiro e quarto resíduos de triptofano e prolina, respectivamente, são conservados (HUNG et al., 2015). Foi primeiramente identificado na proteína WHSC1 (*Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1*) e acreditava-se que era responsável pelas interações proteína-proteína e proteína-DNA (WANG; HU, 2013). A função biológica do domínio PWWP ainda não foi estabelecida (HUNG et al., 2015).

Sabe-se que o genoma humano codifica mais de 20 proteínas contendo domínios PWWP. A grande maioria destas proteínas apresenta funções associadas à cromatina (QIN; MIN, 2014). O domínio PWWP é composto por uma sequência de 100-150 aminoácidos (HUNG et al., 2015). A porção amino-terminal é composta por uma estrutura em β -barril, enquanto a porção carboxi-terminal é formada por um feixe de α -hélices (RONA; ELEUTHERIO; PINHEIRO, 2016). É frequentemente encontrado em proteínas de eucariotos, tanto de organismos unicelulares quanto de humanos, que estão relacionadas aos processos de divisão celular, crescimento e diferenciação (HUNG et al., 2015; QIN; MIN, 2014). Essas proteínas também possuem outros domínios que interagem com a cromatina, como: cromo, bromo, PHD e SET. É muito importante a cooperação entre esses domínios para a modificação e leitura dos sinais da cromatina (GE et al., 2004).

O domínio PWWP pertence à família “Royal Superfamily”, da qual também fazem parte os domínios cromo, tudor e tumor maligno cerebral, que estão presentes

em proteínas que têm como função modificar histonas, sendo o domínio PWWP capaz de reconhecer histonas metiladas (WANG; HU, 2013; YANG et al., 2010). Também é conhecido por ser um módulo não-específico de ligação ao DNA, pois possui uma superfície de interação com DNA que apresenta características eletrostáticas básicas (WANG; HU, 2013). A primeira estrutura determinada de domínio PWWP foi da DNA metiltransferase DNMT3B e sua análise revelou uma superfície carregada positivamente, sugerindo que este domínio possui um papel importante na ligação ao DNA, o que foi confirmado *in vitro* (HUNG et al., 2015; QIN; MIN, 2014).

Estudos mostraram que peptídeos de histonas metiladas se ligam a uma cavidade hidrofóbica altamente conservada presente na superfície do domínio PWWP. Esta cavidade é formada por três resíduos aromáticos: o terceiro resíduo do motivo PWWP (triptofano), o resíduo que precede o motivo e outros resíduos aromáticos (Fenilalanina/Triptofano/Histidina) da estrutura em β -barril (HUNG et al., 2015). A maioria dos domínios PWWP possui esta cavidade hidrofóbica conservada, que é capaz de se ligar a histonas metiladas. Porém existem exceções, como por exemplo os domínios das proteínas RBBP1, RBBP1L1, MBD5 e NSD1 (N-terminal), que possuem esta cavidade hidrofóbica incompleta (QIN; MIN, 2014). O mecanismo de ligação à cromatina ocorre devido a presença dos dois sítios de ligação, na qual a cavidade hidrofóbica se liga ao resíduo de histona metilado e a superfície carregada positivamente interage com o ácido nucléico (HUNG et al., 2015).

A maioria dos domínios PWWP reconhecem especificamente H3K36me3, presente na região codificante de genes ativos, sendo este domínio um leitor específico de H3K36me3. Uma exceção é a proteína Pdp1 que se liga a H4K20me3, uma marca registrada das regiões heterocromáticas silenciadas (QIN; MIN, 2014; RONA; ELEUTHERIO; PINHEIRO, 2016). Proteínas humanas que possuem o domínio PWWP que se ligam a H3K36me3 estão envolvidas na regulação da transcrição, metilação do DNA e *splicing* alternativo (GILBERT et al., 2014).

3.3 Proteína Pdp3

A Pdp3 (*PWWP domain protein in NuA3*) é uma proteína encontrada em *Saccharomyces cerevisiae* e possui apenas um domínio PWWP. Pouco se sabe sobre a função desta proteína. Sabe-se que Pdp3 está associada com as proteínas Yng1, Nto1 e Sas3 no complexo HAT NuA3 (histona acetil-transferase). A proteína Sas3

possui um domínio HAT que tem como função acetilar resíduos de lisinas na extremidade amino-terminal de histonas. Devido a semelhanças estruturais entre o domínio PWWP de Pdp3 e o de outras proteínas já estudadas, além da semelhança entre os complexos HAT humanos e de leveduras, concluiu-se que Pdp3 se liga preferencialmente a H3K36me3. A tri-metilação de H3K36 é realizada pela proteína Set2 na levedura. Acredita-se que o complexo NuA3 possua duas formas funcionais diferentes, NuA3a e NuA3b. A proteína Pdp3 está associada ao complexo NuA3b e faz com que este complexo se ligue a H3K36me3 através do seu domínio PWWP, estando envolvida no processo de prolongamento da transcrição (GILBERT et al., 2014).

De acordo com estudos realizados no nosso grupo, a fim de se obter um melhor entendimento sobre a função de Pdp3 em *S. cerevisiae*, a superexpressão desta proteína levou a célula a apresentar um metabolismo menos oxidativo, sendo observado um aumento da taxa de crescimento e diminuição do consumo de oxigênio. Observou-se também uma diminuição da tolerância ao estresse oxidativo, que está associada a diminuição do metabolismo oxidativo e consequente redução do mecanismo de defesa da célula (RONA et al., 2016).

3.4 Histona metil-transferases e a NSD3

As histonas metil-transferases (HMTases) são enzimas que catalisam a transferência de um, dois ou três grupos metila para resíduos de lisina em histonas, preferencialmente nas histonas H3 e H4 (ALBERT; HELIN, 2010; LIU et al., 2015). A metilação de resíduos de lisina tem a função de manter a integridade do genoma e a identidade celular (ALBERT; HELIN, 2010), podendo ter tanto função ativadora como repressora da transcrição gênica (MORISHITA; DI LUCCIO, 2011). Muitas HMTases são encontradas superexpressas em tecidos tumorais. A reversão dos níveis de expressão dessas enzimas ou inibição da sua atividade podem levar a supressão do crescimento do câncer. O desenvolvimento de inibidores de HMTases parece ser uma estratégia de tratamento eficiente contra diversos tipos de câncer. A família NSD tem sido o foco no desenho racional de drogas para um grande número de cânceres utilizando inibidores de HMTases seletivos (MORISHITA; DI LUCCIO, 2011). Alguns inibidores de histona metil-transferases já foram desenvolvidos como Chaetocin, Bix-01294 e Bix-01338, por exemplo (Figura 1). Já foi mostrado que o Bix-01294 inibe a

enzima G9a/EHMT2 (*Euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 2*), encontrada em altas concentrações em pacientes com câncer; o Chaetocin inibe a histona metiltransferase Su(var)3-9 e sabe-se que o Bix-01338 inibe tanto lisina e arginina metiltransferases (SPANNHOFF; SIPPL; JUNG, 2009).

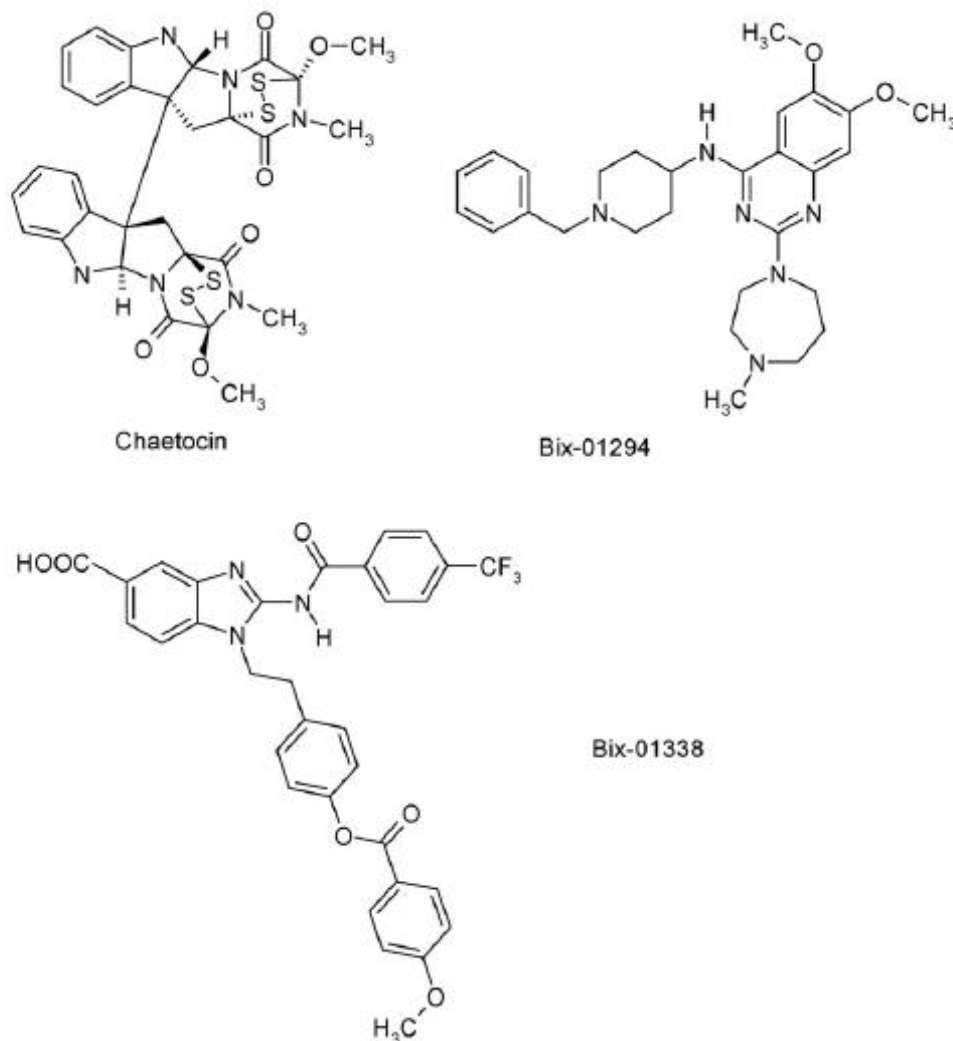


Figura 1: Inibidores de histona metil-transferases (SPANNHOFF; SIPPL; JUNG, 2009).

A família NSD é composta por três enzimas: NSD1, NSD2/MMSET/WHSC1 e NSD3/WHSC1L1. Essas proteínas são produtos de oncogenes altamente expressos em diversas condições patológicas. A superexpressão da NSD1 foi observada em casos de câncer de pulmão, neuroblastoma e mieloma múltiplo. A NSD2 está associada à mieloma múltiplo e câncer de próstata. NSD3 é superexpressa em câncer de mama, bexiga, pulmão e rim. Porém, seus mecanismos de ação não são muito bem conhecidos (MORISHITA et al., 2014).

A proteína NSD3 está associada a carcinomas de pulmão e mama, o que mostra a importância do papel desta proteína no controle do crescimento celular e diferenciação (ZHOU et al., 2010). O gene WHSC1L1 está localizado na região cromossômica 8p11-12, que é frequentemente amplificada em casos de câncer de mama e pulmão. Em contrapartida, o silenciamento deste gene inibe a proliferação de células tumorais (SHEN et al., 2015; YANG et al., 2010). Foram identificadas duas isoformas de NSD3, uma longa e outra curta, produzidas através de *splicing* alternativo do éxon 10. A superexpressão de ambas as isoformas é capaz de transformar uma célula saudável em uma célula com características tumorais. A isoforma longa possui 1437 aminoácidos e contém dois domínios PWWP (prolina-triptofano-triptofano-prolina), cinco domínios PHD (*plant homeodomain*), um C5HCH (*Cys-His-rich domain*), um SAC (*suppressor of actin domain*) e um SET (*Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste and Trithorax domain*), que é responsável pela atividade catalítica da enzima. A isoforma curta possui apenas o primeiro domínio PWWP da NSD3I (Figura 2). Ambas as isoformas de NSD3 apresentam localização nuclear (YANG et al., 2010).

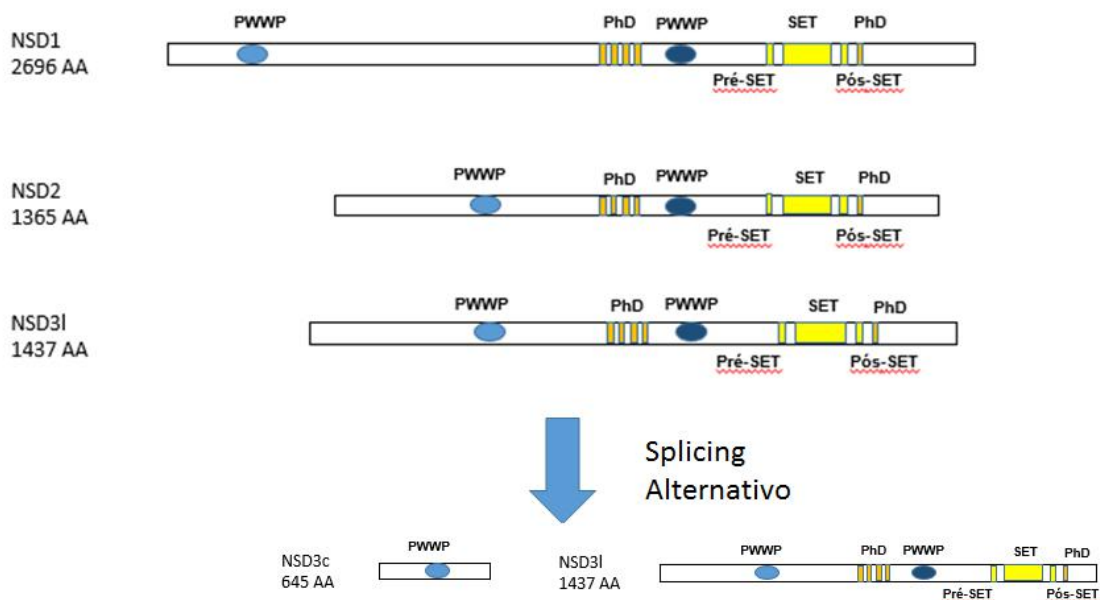


Figura 2: Esquema simplificado apresentando a disposição dos domínios presentes nas proteínas da família NSD (Figura adaptada de Yan Li, et al. J. Biol. Chem. 2009).

Assim como a Pdp3, a proteína humana NDS3c possui apenas um domínio PWWP em sua estrutura. Portanto, é possível que seus mecanismos de ação sejam

semelhantes. Rona e colaboradores (2016) avaliaram o efeito da superexpressão de NSD3c em células de *S. cerevisiae* e a alteração de metabolismo observado nos experimentos com Pdp3 também foi observada com a NSD3c, reforçando a hipótese de que essas proteínas possam ter funções semelhantes (RONA et al., 2016).

3.5 Câncer

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), câncer é o nome geral dado a um conjunto de mais de 100 doenças que apresentam crescimento desordenado de células podendo se espalhar por outras regiões do corpo, invadindo tecidos e órgãos vizinhos. Diversos tipos de câncer já foram descritos e subtipos de tumores podem ser encontrados em órgãos específicos, o que torna o tratamento desta doença um grande desafio (MEDINA; RIVERA, 2010).

De acordo com uma pesquisa mundial de 2012 realizada pelo projeto Globocan da IARC (*International Agency for Research on Cancer*), foram estimados 14 milhões de novos casos e 8 milhões de óbitos pela doença, sendo os países em desenvolvimento os que apresentam maior incidência da doença (INSTITUTO NACIONAL DE CANCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2016). Estes dados reforçam o fato de que o câncer é uma das grandes preocupações na área da saúde atualmente. Os três tipos de câncer mais frequentes em homens, com exceção do câncer de pele não melanoma, são câncer de pulmão, próstata e intestino. No caso das mulheres são o de mama, intestino e pulmão. O projeto Globocan estimou, para a região da América Latina em 2012, a ocorrência de 1,1 milhões de novos casos, sendo o câncer de mama e próstata os mais frequentes em mulheres e homens, respectivamente. Estima-se que no Brasil, entre 2016 e 2017, ocorram 600 mil novos casos, sendo o câncer de mama e próstata os mais frequentes entre mulheres e homens, respectivamente (INSTITUTO NACIONAL DE CANCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2016).

O câncer de mama tem como fatores de risco o envelhecimento, tendo um aumento da taxa de incidência até os 50 anos, histórico familiar e a vida reprodutiva da mulher como, por exemplo, o uso de anticoncepcionais, terapia de reposição hormonal e idade da primeira gestação (ALBERT; HELIN, 2010; INSTITUTO NACIONAL DE CANCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2016). Este tipo de câncer é considerado uma doença heterogênea e estudos já mostraram que existem

mais de 20 subtipos diferentes da doença (INSTITUTO NACIONAL DE CANCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2016).

Uma das principais características do câncer é a alteração no padrão da expressão gênica que podem ser causadas por mutações genéticas e modificações epigenéticas. Essa alteração no padrão de expressão gênica pode levar a ativação de oncogenes ou a perda de função de genes supressores de tumor (ALBERT; HELIN, 2010). Um mecanismo responsável pela ativação de oncogenes é a amplificação de uma região cromossomal que resulta na superexpressão de genes e das proteínas codificadas por estes (YANG et al., 2010). Outro evento importante durante o desenvolvimento tumoral é a desregulação do metabolismo celular e estudos nesta área estão sendo realizados para a investigação de novas estratégias terapêuticas contra a doença (DELAGE et al., 2010).

3.6 Metabolômica

O metabolismo celular é responsável pela manutenção de diversos processos essenciais como crescimento celular, proliferação, diferenciação e resistência ao estresse que ocorrem através de uma rede de reações bioquímicas altamente coordenadas capazes de satisfazer as exigências biossintéticas, energéticas e redox de forma balanceada (DUBUIS et al., 2016). Isso é possível devido a presença de receptores, um sistema de sinalização e aos próprios metabólitos que podem agir como sinais e regular, por exemplo, mecanismos epigenéticos e modificações pós-traducionais (DUBUIS et al., 2016; JOHNSON; IVANISEVIC; SIUZDAK, 2016). Os metabólitos podem causar modificações no ambiente em que são produzidos, logo, qualquer alteração incomum no fluxo metabólico pode causar consequências para o organismo. Estes possuem diversas funções no organismo e por isso é necessário ter um melhor entendimento sobre suas funções fisiológicas (DUBUIS et al., 2016).

Metabolômica é uma área de conhecimento que tem como objetivo estudar o perfil metabólico de um determinado organismo, sua atividade e estado celular a partir da análise da alteração dos níveis intracelulares de metabólitos (AIROLDI et al., 2015; LIU; LOCASALE, 2017). A metabolômica tem sido utilizada como uma ferramenta complementar à proteômica, transcriptômica e genômica (AIROLDI et al., 2015; EUCEDA; GISKEØDEGÅRD; BATHEN, 2015).

O método identifica metabólitos de massas moleculares de 80-1.200 Da, incluindo hexoses, aminoácidos, dipeptídeos, lipídios e ácidos orgânicos. Podem ser detectados metabólitos endógenos e exógenos, e o estudo de cada tipo dependerá do objetivo principal da pesquisa (HOCHER; ADAMSKI, 2017). Diversos tipos de amostras podem ser analisadas incluindo tecidos, biofluidos e células. A partir deste método, pode-se entender melhor as funções de determinados metabólitos, sua influência dentro da rede metabólica, e então correlacioná-los com fenótipos de interesse para o estudo, observando por exemplo, alterações em suas concentrações (MÜLLEDER et al., 2016).

Alterações metabólicas têm um papel importante no câncer, em infecções patogênicas, restrição calórica e também no processo de envelhecimento (MÜLLEDER et al., 2016). Com isso, a metabolômica é importante para um melhor entendimento dos processos envolvidos nesses casos. Um dos objetivos é identificar biomarcadores que podem se tornar alvo de medicamentos para o tratamento de diversas doenças (JOHNSON; IVANISEVIC; SIUZDAK, 2016).

Um exemplo de aplicação é em estudos utilizando amostras de plasma e urina de pacientes em diferentes estágios da doença renal crônica (Chronic Kidney Disease-CKD) que estão sendo realizados com objetivo de determinar biomarcadores para a doença. Resultados importantes foram obtidos e novos biomarcadores foram determinados como acilcarnitinas, glicerolipídios, dimetilargininas e metabólitos dos ciclos da uréia, ácido cítrico e do triptofano (HOCHER; ADAMSKI, 2017). No caso do câncer, alterações metabólicas são observados em tumores sólidos como um aumento no consumo de glicose e na produção de lactato e uma dependência em determinados nutrientes. Essas alterações causam um aumento na atividade fisiológica e na capacidade de adaptação a mudanças ambientais (DUBUIS et al., 2016).

As técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e espectrometria de massa (MS) são comumente utilizadas nos estudos de metabolômica. A técnica de RMN detecta as características moleculares medindo uma propriedade magnética intrínseca do núcleo atômico, conhecida como *spin*. Assim, é possível obter informações acerca do ambiente químico e da estrutura molecular (LIU; LOCASALE, 2017). É uma técnica não destrutiva utilizada na elucidação da estrutura e conformação de moléculas em estado líquido ou sólido. É possível obter informações

altamente detalhadas sobre estrutura, assim como informações sobre dinâmica molecular, determinando coeficientes de difusão rotacional e translacional e movimentação interna da molécula (FAN; LANE, 2011; MAHROUS; FARAG, 2015). Uma das grandes vantagens da RMN é a capacidade de identificação de compostos desconhecidos em uma mistura complexa (MAHROUS; FARAG, 2015). A RMN tem sido aplicada à identificação de moléculas pequenas oriundas do metabolismo de células vivas bem como ao estudo da conformação de macromoléculas como proteínas, DNA, RNA, carboidratos (LI et al., 2017).

Na espectrometria de massa (MS), as moléculas presentes na amostra são ionizadas e volatilizadas através da ação de uma fonte de íons. Em seguida, os íons gerados são acelerados para um analisador de massa onde são detectados de acordo com sua relação massa-carga (m/z) (EUCEDA; GISKEØDEGÅRD; BATHEN, 2015). É comum acoplar o espectrômetro de massa a um cromatógrafo para aumentar a resolução da técnica (HOCHER; ADAMSKI, 2017). A MS possui vantagens como maior sensibilidade e capacidade de quantificar um maior número de moléculas em uma amostra biológica complexa (LIU; LOCASALE, 2017). Porém, são obtidas mais informações sobre a estrutura química dos metabólitos, facilitando sua elucidação, utilizando a RMN. Outra vantagem da técnica de RMN está na preparação de amostras de fluidos biológicos e tecidos, pois o processo é simples e não requer um longo período de tempo para realizá-lo (EUCEDA; GISKEØDEGÅRD; BATHEN, 2015).

As duas técnicas são capazes de gerar ótimos resultados para pesquisa e a escolha poderá depender do objetivo do trabalho. É possível que as duas técnicas sejam utilizadas para a mesma amostra fazendo com que mais informações possam ser obtidas (HOCHER; ADAMSKI, 2017).

3.7 *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi o primeiro organismo eucariótico a ter seu genoma completamente sequenciado, apresentando aproximadamente 6.000 ORFs (open reading frames) que codificam proteínas com mais de 100 resíduos de aminoácidos (BJORNSTI, 2002). É um organismo muito utilizado como modelo para o melhor entendimento de processos e vias celulares que são difíceis de se estudar em eucariotos superiores, como controle do ciclo celular, reparo do DNA,

envelhecimento, expressão gênica, autofagia e vias associadas a diversas doenças humanas (BJORNSTI, 2002; MATUO et al., 2012).

Esta levedura tem como principais características a genética simples, rápida taxa de crescimento, um mecanismo de ciclo celular e vias metabólicas altamente conservados, fácil manipulação e cultivo barato (BJORNSTI, 2002; MATUO et al., 2012). Diversos vetores de DNA estão disponíveis e podem ser mantidos como plasmídeos epissomais, sendo possível a expressão de proteínas humanas e o estudo de mutações e suas consequências fenotípicas. A possibilidade de se realizar recombinação homóloga também é muito interessante, pois permite a inserção de uma sequência de DNA em locais específicos do genoma da levedura (BJORNSTI, 2002; TOSATO et al., 2012).

Diversos genes de levedura apresentam ortólogos humanos e muitos deles estão relacionados com doenças humanas. Com isso, a *S. cerevisiae* vem sendo muito utilizada como modelo de estudo para elucidar os mecanismos moleculares de doenças como diabetes, doenças neurodegenerativas e câncer (MATUO et al., 2012).

No caso do câncer, este modelo permite o estudo de características importantes do desenvolvimento da doença, como instabilidade do cromossomo e genes envolvidos na susceptibilidade da doença (MATUO et al., 2012). Uma grande vantagem apresentada pela *S. cerevisiae* para o estudo desta doença é a sua capacidade de reproduzir características do Efeito Warburg observadas em células tumorais (DIAZ-RUIZ; RIGOLET; DEVIN, 2011).

Em 1956, Warburg mostrou que células de câncer consomem glicose e produzem ácido láctico mesmo na presença de oxigênio, sendo a fermentação a principal forma de obtenção de energia da célula (WARBURG, 1956). Este processo é conhecido como o efeito Warburg. Warburg acreditava que a preferência da célula pela produção de energia através da glicólise aeróbica ocorria devido a danos na mitocôndria (UPADHYAY et al., 2013). Muitos estudos validam a hipótese de Warburg, pois já foram descobertas mutações no DNA nuclear e mitocondrial em genes codificantes de proteínas envolvidas na respiração. O efeito Warburg foi observado na maioria das células de câncer e se tornou uma marca registrada da doença. Além deste efeito, essas células possuem outras características em comum, como: sinais de crescimento persistentes, evasão da apoptose, insensibilidade a sinais anti-

crescimento, potencial replicativo ilimitado, angiogênese, invasão e metástase (TRAN et al., 2016).

O efeito Warburg foi proposto por ser um mecanismo de adaptação para satisfazer as necessidades biossintéticas de proliferação descontrolada (LIBERTI et al., 2017). Acredita-se que o efeito pode conferir vantagens no crescimento de células tumorais, produzindo ATP mais rapidamente, aminoácidos, ácidos nucleicos e lipídios, essenciais para a proliferação celular e também promovendo um ambiente ácido prejudicial às células normais, mas não às tumorais (TRAN et al., 2016). Ainda não foram esclarecidas as vias e fatores principais que levam ao fenótipo tumoral, mas diversos mecanismos foram propostos com base nas mudanças epigenéticas em proto-oncogenes e genes supressores de tumor no processo de carcinogênese. Estes mecanismos estão associados às alterações na mitocôndria e defeitos na fosforilação oxidativa; alterações no metaboloma e nos fluxos metabólicos; mudança da respiração oxidativa mitocondrial para glicólise induzida pela hipoxia e a regulação coordenada de proteínas que controlam o fluxo glicolítico (TRAN et al., 2016).

É possível reproduzir as características do Efeito Warburg pois a *S. cerevisiae* apresenta um efeito semelhante, conhecido como repressão catabólica, no qual a levedura utiliza fermentação como a via metabólica principal quando a concentração de glicose no meio é alta e o metabolismo oxidativo passa a predominar quando os níveis de glicose são reduzidos (DIAZ-RUIZ; RIGOLET; DEVIN, 2011). O metabolismo respiratório da *S. cerevisiae* pode ser induzido ou reprimido facilmente quando a fonte de carbono é alterada (TOSATO et al., 2012).

Assim como células tumorais, a levedura apresenta um aumento na expressão de enzimas chave da via glicolítica, em resposta a presença de glicose, e diminuição na atividade e expressão de enzimas que participam do metabolismo oxidativo (DIAZ-RUIZ; RIGOLET; DEVIN, 2011). A expressão de outros genes também são afetados como os envolvidos na utilização de outras fontes de carbono e na gliconeogênese (CARLSON, 1999). Durante a Repressão Catabólica e o Efeito Warburg, há uma diminuição de expressão das enzimas do ciclo do ácido cítrico, resultando em um mau funcionamento deste ciclo. Observa-se uma diminuição das atividades das enzimas aconitase, isocitrato desidrogenase e malato desidrogenase, assim como das atividades dos complexos II e IV (DIAZ-RUIZ; RIGOLET; DEVIN, 2011). Apesar de

o Efeito Warburg e a Repressão Catabólica apresentarem diversas semelhanças, o efeito observado em leveduras é reversível, enquanto o Efeito Warburg é irreversível.

Com isso, a *S. cerevisiae* passa a ser um dos modelos mais utilizados atualmente para o estudo da patologia da doença e investigação de determinantes da sensibilidade ou resistência a drogas anticancer (MATUO et al., 2012).

4 Metodologia

4.1 Microrganismo *S. cerevisiae*

Neste estudo foram utilizadas uma cepa controle (WT) e uma cepa superexpressando a proteína Pdp3 (Pdp3+). A cepa Pdp3+ foi construída a partir da inserção do plasmídeo pECUh6 contendo a sequência da Pdp3. No caso da cepa WT foi inserido o plasmídeo sem a sequência da proteína de estudo. Na tabela abaixo (Tabela 1) estão descritas as especificações de cada cepa utilizada.

Tabela 1: Especificações das cepas WT e Pdp3+

Linhagem	Genótipo de interesse	Fenótipo	Fonte
Pdp3 ⁺	Isogênica da BY4741 (<i>MATa leu2 his3 ura3 met 15</i>) com pECUh6- <i>CUP1-PDP3, URA3</i>	Superexpressão de <i>PDP3</i> na presença de Cu ²⁺	Rona e col, 2016
WT	Isogênica da BY4741 com pECUh6- <i>CUP1</i>	Controle com plasmídeo vazio	Rona e col, 2016

4.2 Cepas e Condições de Cultivo

O plasmídeo pECUh6 é de múltiplas cópias, com promotor *CUP1* induzido pela presença de cobre (Cu²⁺). Possui marcador de resistência a ampicilina e uracila como marcador nutricional (Figura 3).

As cepas foram estocadas em meio *dropout* sólido sem uracila (0,2% mistura *dropout* sem uracila, 0,67% base nitrogenada sem aminoácido, 2% glicose, 2% ágar) e os experimentos foram realizados em meio *dropout* líquido sem uracila (0,2% mistura *dropout* em uracila, 0,67% base nitrogenada sem aminoácido, 4% glicerol) e suplementado com sulfato de cobre 50 µM com objetivo de induzir a superexpressão da Pdp3. A fonte de carbono utilizada no meio foi glicerol, pois desejava-se que o metabolismo das cepas fosse respiratório.

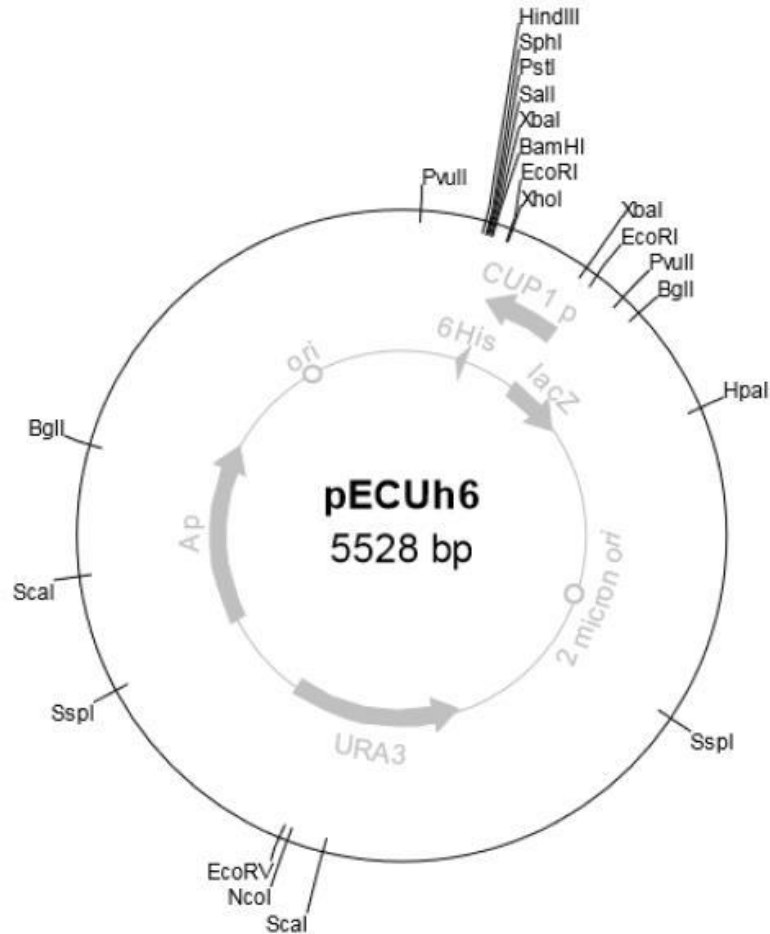


Figura 3: Vetor plasmidial pECUh6

4.3 Extrato Celular

Primeiramente, foram coletados um volume correspondente a 40 mg de células por centrifugação a 4°C, 8000 rpm por 5 minutos. As células foram lavadas três vezes com o mesmo volume de água destilada gelada. Por fim, foram transferidas para um tubo falcon de 15 mL e imediatamente congeladas em uma temperatura de -80°C.

No dia seguinte, as células coletadas foram lavadas três vezes com 10 ml de água destilada gelada e então, foram ressuspensas em 3 mL de etanol 75%. À suspensão, foram adicionados 2 mL de pérola de vidro e as células foram rompidas por 12 ciclos de agitação violenta em vórtex por 30 segundos, intercalados com 30 segundos no gelo. O extrato foi centrifugado à 4°C, 2000 x g por 5 minutos e 1,6 mL do sobrenadante foram recolhidos em eppendorf. Por fim, o sobrenadante foi submetido a evaporação a vácuo até secar utilizando speedvac Savant-Thermo.

4.4 Preparo da amostra para análise por RMN

O extrato seco foi ressuspenso em 600µL de tampão fosfato de sódio 20mM pH 7,4 adicionado de D₂O (10% v/v), contendo 0,1mM de DSS (ácido 4,4-dimetil-4-silapentano-1-sulfônico) como padrão interno para deslocamento químico e para determinação da intensidade relativa dos picos. A suspensão foi agitada por 1 minuto com o auxílio de um vórtex e, em seguida, centrifugada à 14000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi recolhido e transferido para um tubo de RMN.

4.5 Ressonância Magnética Nuclear

A análise de RMN foi realizada utilizando o espectrômetro Bruker Avance III-500 MHz à 25°C. Com objetivo de eliminar sinais de macromoléculas (proteínas e lipídios) foi utilizada a sequência de pulso CPMG (CarrPurcell- Meiboom-Gill), possibilitando a obtenção de espectros com melhor resolução através de um filtro T2 (NAGANA GOWDA; RAFTERY, 2015). Os espectros 1D ¹H RMN foram adquiridos utilizando 4 *dummy scans* e 1024 *scans*, largura espectral de 19.9947 ppm e um tempo de aquisição de 3,28 segundos. O processamento e referenciamento dos espectros foi feito utilizando o programa TOPSPIN 3.2 (Bruker-Biospin). Nesta etapa, foi realizada a correção da linha de base e o ajuste de fase dos espectros. Para referenciamento dos espectros foi utilizado o sinal do padrão interno DSS.

Para cada amostra, foram obtidos os espectros de 1D ¹H RMN utilizados para comparação de intensidades dos picos e análise estatística. Os experimentos de 2D [¹H-¹H] TOCSY (*Total Correlation Spectroscopy*) e 2D [¹H-¹³C] HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) foram realizados apenas para uma amostra de cada grupo estudado. Os espectros obtidos foram utilizados no processo de identificação e assinalamento juntamente com o auxílio da base de dados *Biological Magnetic Resonance Data Bank*.

4.6 Análise Estatística

Primeiramente, foi utilizado o programa AMIX (Bruker-Biospin) para obtenção das intensidades das ressonâncias relativas ao sinal do padrão interno DSS, utilizado como referência de deslocamento químico.

Este programa divide os espectros igualmente em pedaços chamados *buckets*. Optou-se por dividir os espectros em intervalos de 0,03 ppm. As ressonâncias

contidas em cada um desses *buckets* são integradas e suas intensidades são calculadas. Para tal procedimento, foi considerada a região do espectro entre 0.5-9.7 ppm. É necessário que algumas regiões sejam excluídas pois podem trazer resultados equivocados para o trabalho. Foram excluídas a região contendo o sinal da água (4,6-4,9 ppm), pois sua grande intensidade promove distorções na linha base do espectro; as regiões contendo os sinais referentes ao etanol (1,15-1,18 e 3,64-3,66ppm), pois estes apresentaram grande diferença de intensidade nos espectros de um mesmo grupo estudado, mostrando que, por ser o solvente utilizado na extração, a quantificação do etanol não é precisa; e regiões duvidosas que apresentaram muitas divergências entre espectros do mesmo grupo (8,19-8,26ppm).

Obtidos os buckets e as intensidades relativas aos seus sinais, foi realizada a análise estatística dos resultados pela Análise dos Componentes Principais ou PCA (*Principal Component Analysis*) e Análise Discriminante com Calibração Multivariada por Mínimos Quadrados Parciais ou PLS-DA (*Partial Least Squares Discriminant Analysis*) através da plataforma online Metaboanalyst 3.0. Os dados foram normalizados pela soma das intensidades e foi utilizado *Pareto scaling*. A análise de PLS-DA foi validada por validação cruzada pelo método *leave-one-out* (LOOCV) no Metaboanalyst 3.0. Foi realizado também a análise estatística de Múltiplo Teste T utilizando o programa GraphPad Prism 6. Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0,05$.

Por fim, obtidos os buckets que apresentavam diferença significativa, foi possível identificar e quantificar os metabólitos. Neste estudo, foram destacados os metabólitos que foram analisados sem ambiguidade.

5 Resultados e Discussão

5.1 Análise do Perfil Metabólico por 1D ^1H RMN

Após a análise de RMN, um grupo de espectros de 1D ^1H foi obtido para cada cepa. Inicialmente, foram escolhidos para estudo os espectros que apresentavam menor diferença entre si, com o objetivo de se obter grupos mais homogêneos, facilitando a observação das diferenças entre as duas cepas. Para a cepa WT, foram escolhidos 6 espectros homogêneos (Figura 4) e para a cepa Pdp3, 4 espectros (Figura 5).

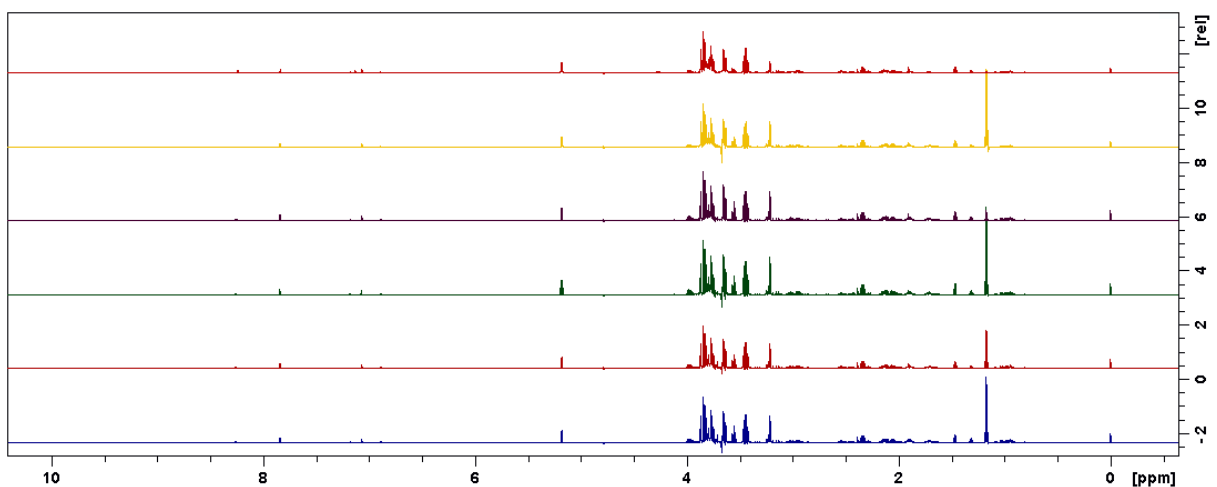


Figura 4: Grupo de espectros analisados para a cepa controle WT.

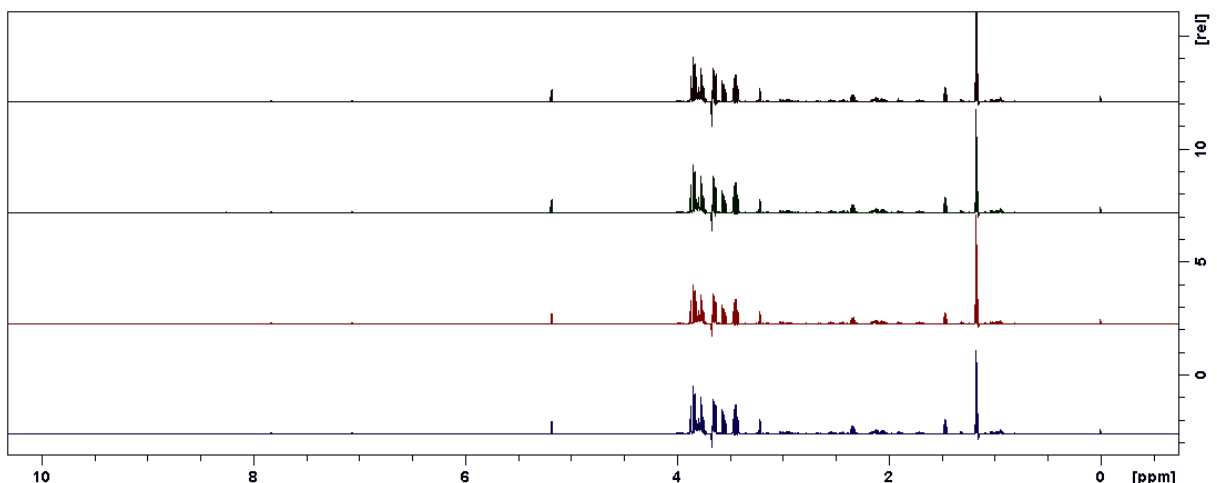


Figura 5: Grupo de espectros analisados para a cepa Pdp3+.

Para exemplificação da homogeneidade dos grupos, as figuras 6 e 7 mostram a região de 0,80-1,12ppm dos espectros de 1D ^1H RMN das cepas WT e Pdp3+, respectivamente, e pode-se observar que, aparentemente, não há grande diferença nas intensidade dos picos e no perfil de sinais de cada grupo estudado. Comparou-se também os espectros das cepas WT e Pdp3+ e foram identificadas diferenças nas intensidades de determinados picos (Figura 8), mostrando que as cepas WT e Pdp3+ apresentam diferença entre seus perfis metabólicos.

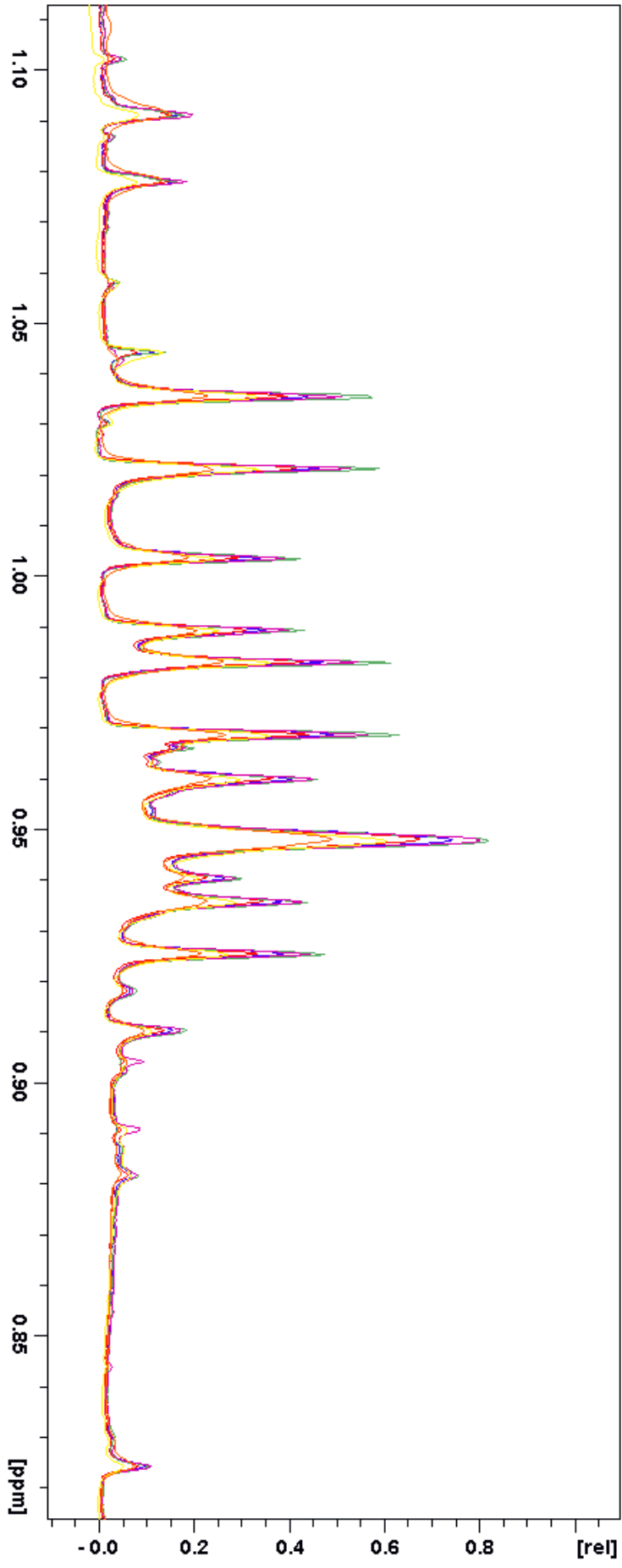


Figura 6: Região 0,80-1,12 ppm dos espectros de 1D ^1H da cepa WT. Nesta figura estão representados os espectros das 6 amostras da cepa WT, deferenciados por cor.

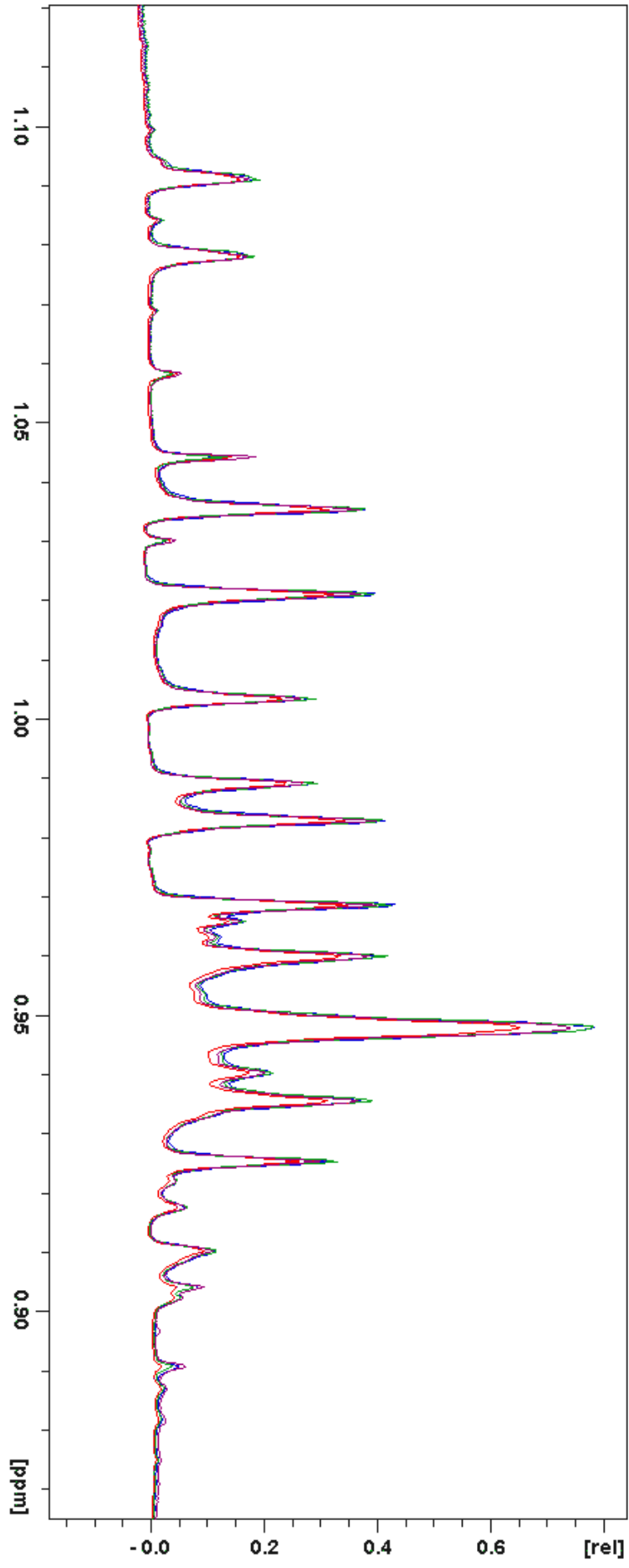


Figura 7: Região 0,80-1,12 ppm dos espectros da cepa Pdp3+. Nesta figura estão representados os espectros das 4 amostras da cepa Pdp3+, diferenciados por cor.

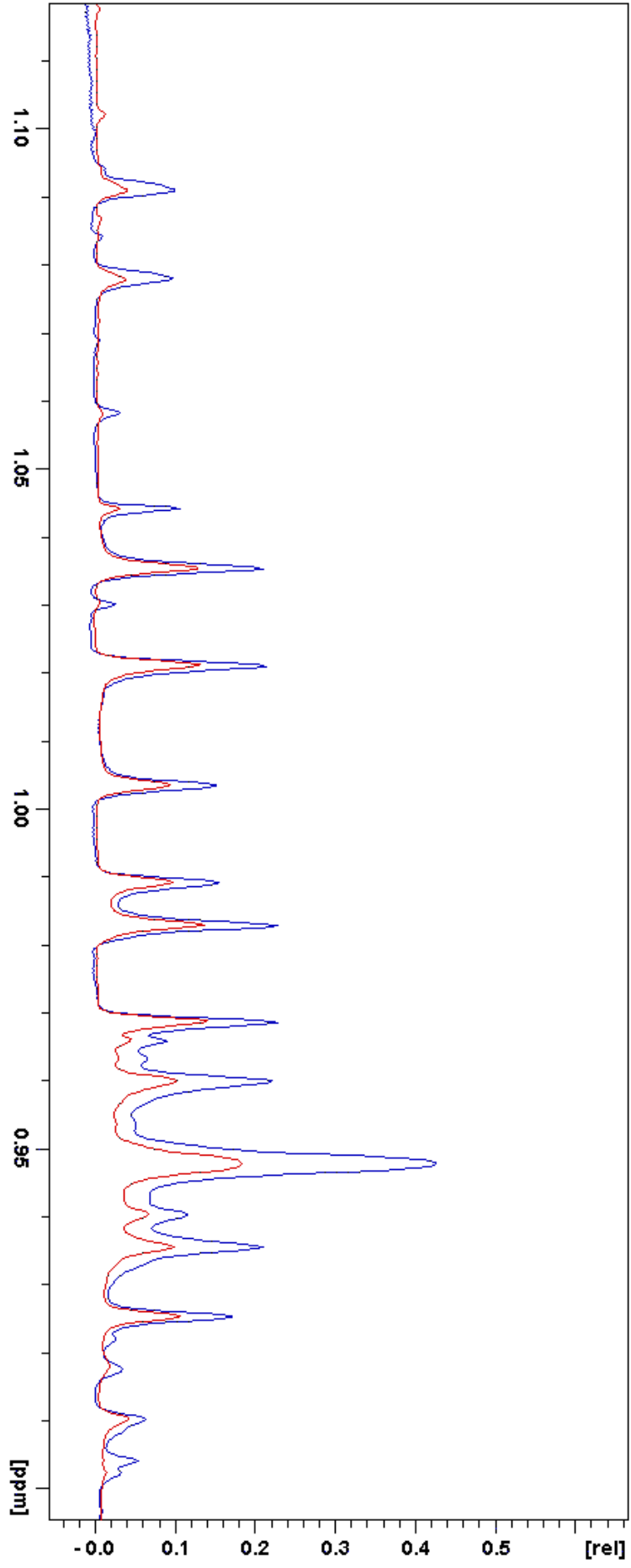


Figura 8: Região 0,9-1,12 ppm dos espectros de 1D ^1H representativos das cepas WT (linha vermelha) e Pdp3 (linha azul).

5.2 Análise estatística por PCA e PLS-DA

Foi iniciado o processo de análise estatística para a confirmação de homogeneidade entre espectros de uma mesma cepa e observação de diferenças estatísticas entre grupos estudados. A partir dos dados de intensidade obtidos pelo programa AMIX, a análise estatística de múltiplas variáveis chamada Análise dos Componentes Principais (PCA) (RINGNÉR, 2008) foi realizada utilizando a plataforma online MetaboAnalyst 3.0 (XIA; WISHART, 2016). Foram obtidos gráficos de PCA 2D e 3D. Analisando os gráficos, foi possível confirmar a homogeneidade dos espectros escolhidos para cada cepa e observar que há uma diferença estatística entre os dois grupos estudados, visto que observa-se uma separação dos grupos na análise de PCA (Figuras 9 e 10).

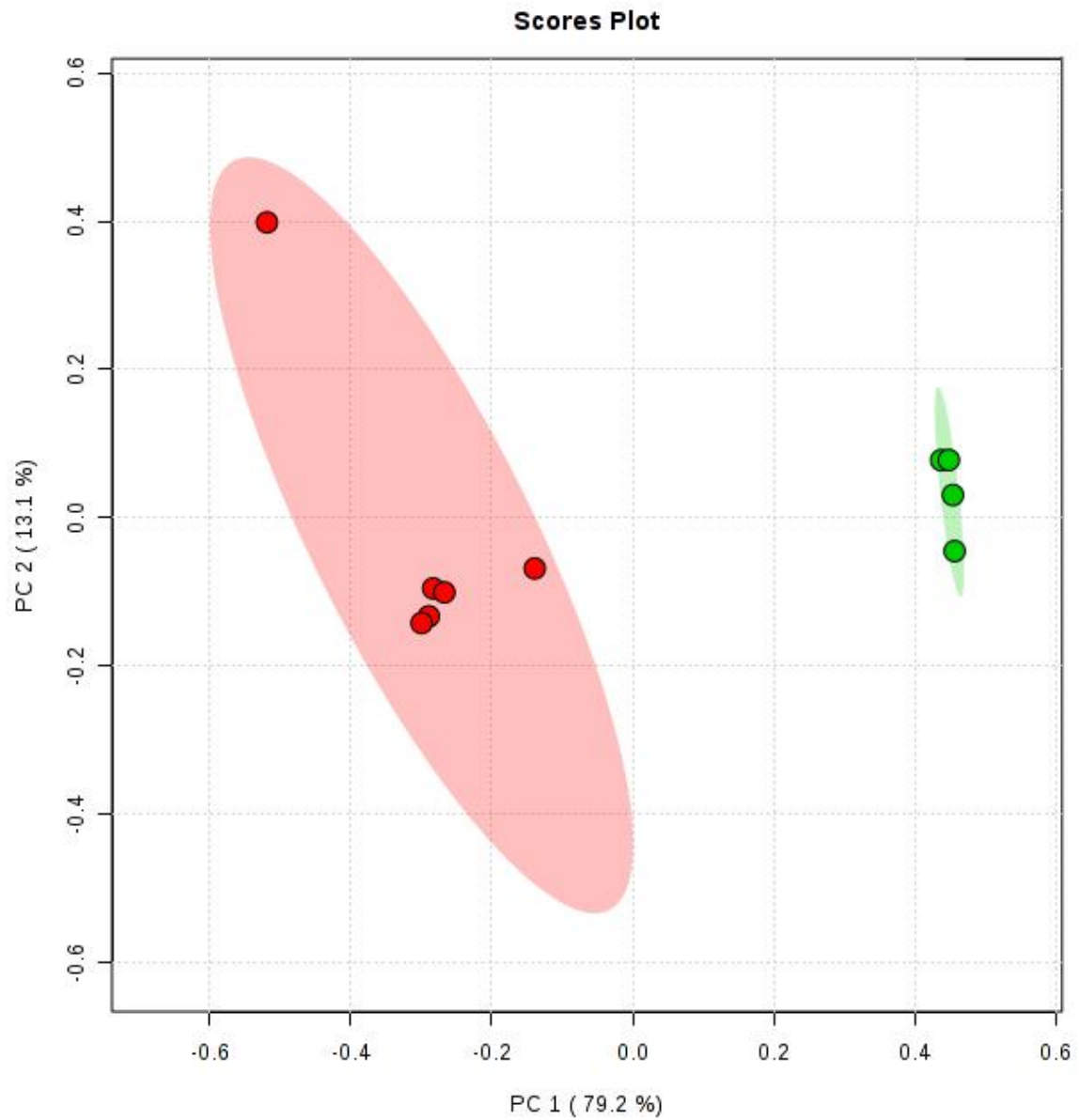


Figura 9: Gráfico de PCA 2D comparando as cepas WT (ESFERAS VERMELHAS) e Pdp3+ (ESFERAS VERDES). As variâncias de PC1 e PC2 são de 79,1% e 13,1%, respectivamente. PC1- Componente Principal 1: Direção na qual a variação dos dados é máxima; PC2 – Componente Principal 2: Direção não correlacionada com o PC1 na qual a variação dos dados é máxima.

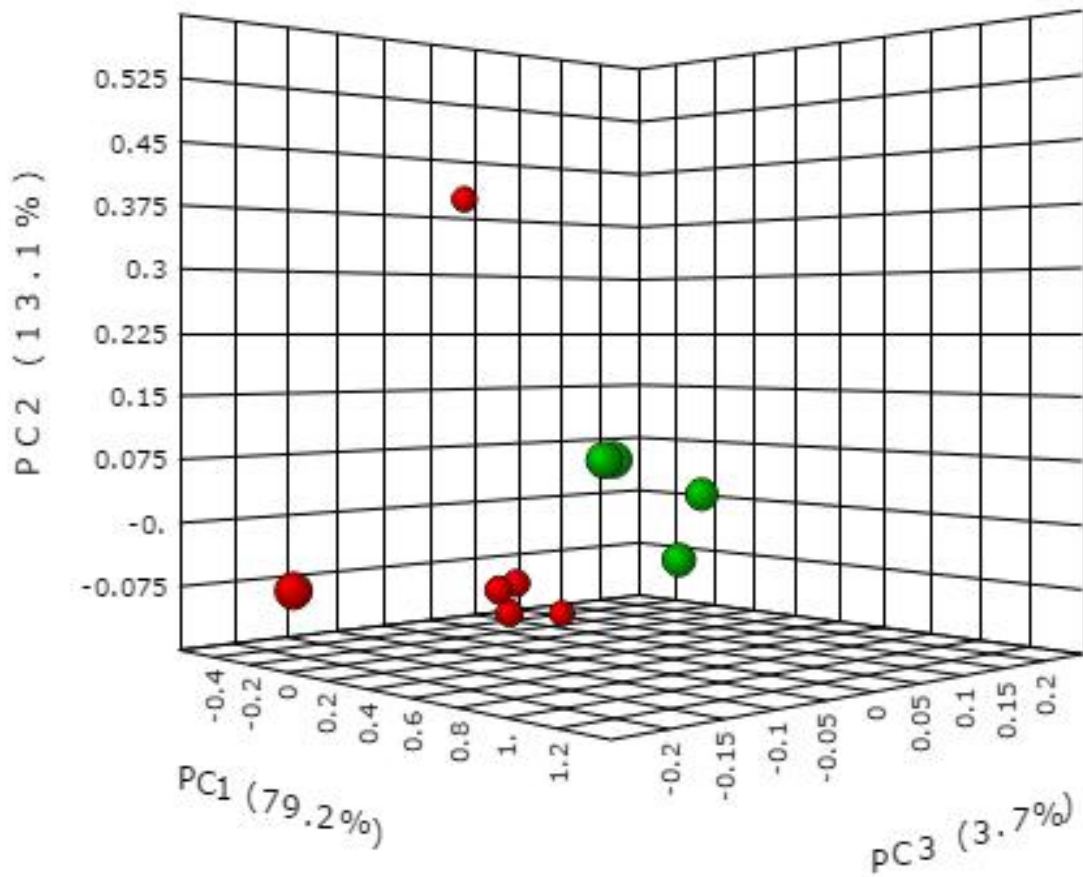


Figura 10: Gráfico de PCA 3D comparando as cepas WT (ESFERAS VERMELHAS) e Pdp3+ (ESFERAS VERDES). As variâncias de PC1, PC2 e PC3 são de 79,1%, 13,1% e 3,7%, respectivamente. PC1- Componente Principal 1: Direção na qual a variação dos dados é máxima; PC2- Componente Principal 2: Direção não correlacionada com o PC1 na qual a variação de dados é máxima; PC3- Direção não correlacionada com o PC1 e PC2 na qual a variação dos dados é máxima.

Em seguida, foi realizada a análise de PLS-DA (XIA; WISHART, 2011) e foram obtidos os gráficos 2D e 3D (Figura 11 e 12). Assim como na análise de PCA, observou-se que os grupos estudados apresentam diferença estatística pois observa-se uma separação desses grupos nos gráficos. A validação da análise foi realizada por validação cruzada pelo método *leave-on-out* obtendo-se os valores de acurácia, R^2 e Q^2 . O valores de R^2 e Q^2 determinam a qualidade do ajuste e a habilidade preditiva do modelo, respectivamente. Valores de R^2 e Q^2 próximos de 1 indicam uma descrição perfeita dos dados pelo modelo e perfeita previsibilidade (TRIBA et al., 2015). A validação cruzada mostrou uma acurácia de 1, R^2 de 0,99976 e Q^2 de 0,96641 para 4 componentes. Logo, concluiu-se que este é um bom modelo.

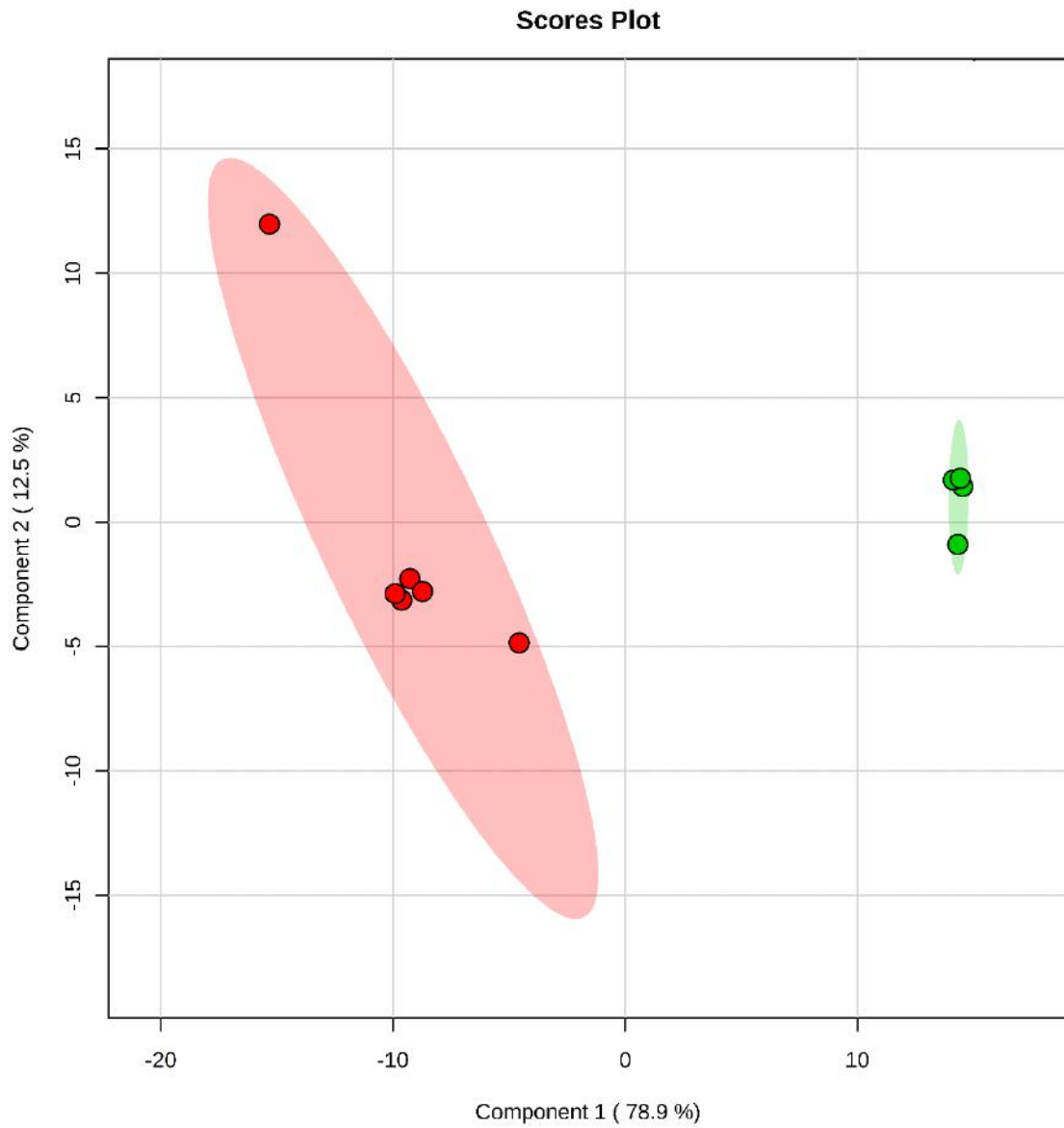


Figura 11: Gráfico de PLS-DA 2D comparando as cepas WT (ESFERAS VERMELHAS) e Pdp3+ (ESFERAS VERDES). Componente1: 78,9%; Componente 2: 12,5%.

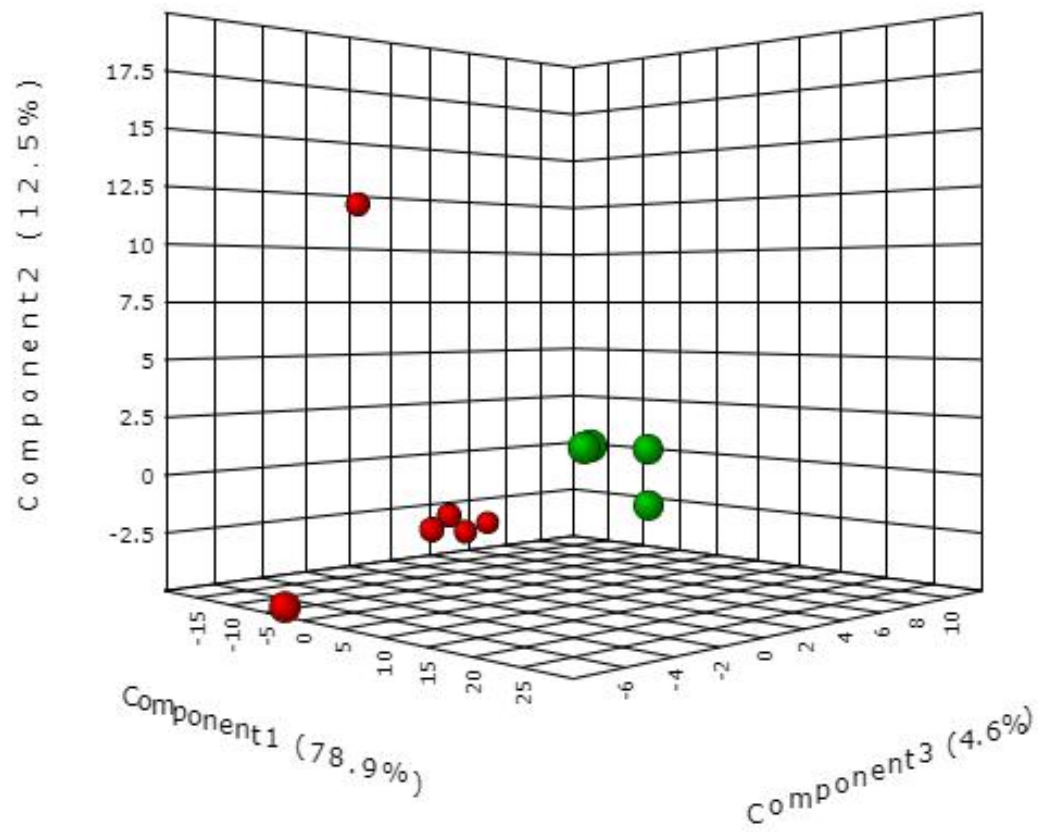


Figura 12: Gráfico de PLS-DA 3D comparando as cepas WT (ESFERAS VERMELHAS) e Pdp3+ (ESFERAS VERDES). Componente1: 78,9%; Componente 2: 12,5%; Componente3: 4,6%.

5.3 Identificação dos metabólitos estatisticamente diferentes através da análise de Múltiplo Test T e PLS-DA

Nesta etapa, foram utilizados os dados das intensidades de cada *bucket* para uma análise estatística de Múltiplo Teste T com o objetivo de se obter os *buckets* que apresentavam diferença estatística entre os dois grupos estudados. A partir desta lista de *buckets*, foram identificados os metabólitos que apresentavam diferença estatística entre as cepas WT e Pdp3+, diferenciando aqueles que apresentavam aumento ou diminuição de concentração em relação a cepa controle WT.

A análise de PLS-DA também foi utilizada para identificação dos *buckets* responsáveis pela diferença estatística através dos valores de *vip score* (*Variable Importance in Projection*). Foram identificados os 15 *buckets* de maior valor de *vip score*. Foi observado que, a partir da análise de Múltiplo Test T, obteve-se uma lista maior de *buckets*. Porém, os *buckets* identificados na análise de PLS-DA estão contidos nesta lista. A tabela 2 mostra os *buckets* que apresentaram diferença estatística na análise de Múltiplo Test T e PLS-DA e alteração dos níveis intracelulares dos metabólitos em resposta a superexpressão da proteína Pdp3 (aumento ou diminuição); seus respectivos deslocamentos químicos; os coeficientes de regressão (*loading factors*) de PLS-DA nos componentes 1, 2 e 3 e p-valor ajustado obtido pela análise de Múltiplo Test T.

O gráfico abaixo (Figura 13) mostra os metabólitos identificados e quantificados sem ambiguidade, e suas respectivas intensidades relativas ao padrão interno DSS. Observa-se que, ao superexpressar a proteína Pdp3, houve um aumento nos níveis de glicerol, glutamato/glutamina, alanina, trealose e leucina/isoleucina/valina; e uma diminuição na concentração de ácido gama aminobutírico (GABA), colina, succinato, arginina, ornitina e histidina.

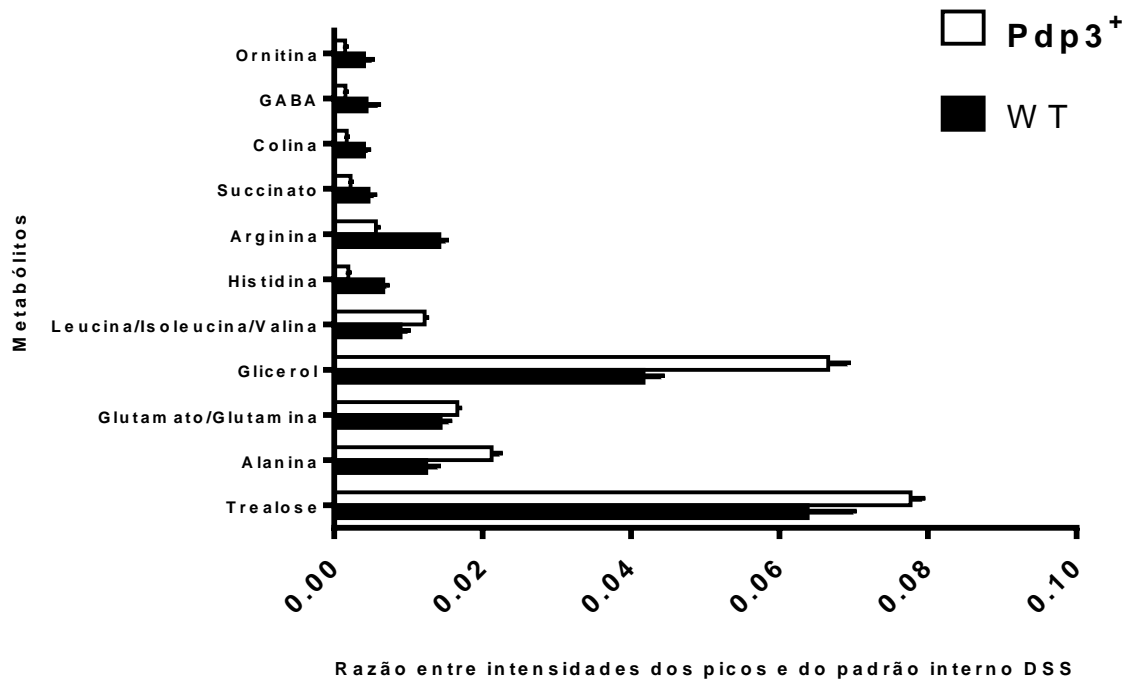


Figura 13: Gráfico de comparação de intensidades relativas.

Tabela 2: Buckets e seus respectivos metabólitos que apresentaram diferença estatística pelas análises de Múltiplo Teste T (1) e PLS-DA (2).

Metabólito	Status	δH (ppm)	Comp1	Comp2	Comp3	p-valor
Pico Ambíguo ^{1,2}	↓	3,2	-0.22575	-0.0076619	-0.18554	<0.000001
Trealose ^{1,2}	↑	3,83	0.30982	-0.27873	-0.086437	<0.000001
Alanina ^{1,2}	↑	1,46	0.15438	0.16036	0.10578	<0.000001
Trealose/ Glicerol/ Alanina ^{1,2}	↑	3,77	0.25194	0.027627	0.072722	<0.000001
Glicerol ^{1,2}	↑	3,62	0.27514	0.18228	0.003404 1	<0.000001
Leucina/ Isoleucina/ Valina ¹	↑	0,95	0.085524	0.12452	0.16643	2E-06
Glicerol ^{1,2}	↑	3,56	0.19552	0.2124	0.23057	<0.000001
Trealose/ Glutamato/ Glutamina ^{1,2}	↑	3,74	0.15166	-0.023392	-0.095379	<0.000001
Ácido acético/ GABA ^{1,2}	↓	1,91	-0.14964	0.063183	-0.092761	<0.000001
Trealose ^{1,2}	↑	3,8	0.21532	-0.20654	-0.050828	<0.000001
Histidina ^{1,2}	↓	7,07	-0.12284	-0.02251	-0.034601	<0.000001
Arginina ^{1,2}	↓	3,23	-0.15619	-0.10166	-0.17217	<0.000001
Pico Ambíguo ^{1,2}	↓	3,98	-0.12547	-0.041892	-0.051503	<0.000001
Trealose ¹	↑	3,47	0.12625	-0.12303	0.080509	<0.000001
Trealose ¹	↑	5,18	0.1261	-0.13613	-0.032686	<0.000001
Histidina ¹	↓	3,14	-0.112	-0.005293	-0.022256	<0.000001
Histidina ¹	↓	7,85	-0.072838	-0.16456	0.005633 6	3,4E-05
Trealose ^{1,2}	↑	3,86	0.15451	-0.20018	-0.10274	<0.000001
Pico Ambíguo ¹	↓	1,95	0.11576	0.19126	-0.33117	<0.000001
Trealose ^{1,2}	↑	3,44	0.14146	-0.12716	-0.15487	<0.000001
Histidina/ Serina ¹	↓	3,95	-0.10316	-0.049506	-0.071366	<0.000001
Pico Ambíguo ¹	↓	3,92	-0.096871	-0.062732	-0.098051	1E-06
GABA ^{1,2}	↓	1,88	-0.13699	0.0033875	-0.087687	<0.000001
Colina ¹	↓	3,17	-0.088754	0.012977	0.02059	0,0066
GABA ¹	↓	2,27	-0.09642	0.11772	0.029515	0,0001

Glutamato/ Glutamina¹	↑	2,12	0.065484	0.16436	0.013128	0,01229
Pico Ambíguo¹	↓	3,68	-0.10189	-0.18566	0.24045	<0.000001
Leucina/ Lisina	↓	3,71	-0.074128	-0.14956	0.020019	1,7E-05
Glicerol/ Glicina¹	↑	3,53	0.088998	-0.054618	0.12594	0,00015
Ornitina¹	↓	3,05	-0.091421	0.0828	-0.037966	0,00107
Pico Ambíguo¹	↓	3,89	-0.081661	-0.070484	-0.091254	0,00293
Succinato¹	↓	2,39	-0.090083	0.051535	-0.02478	0,00305
GABA/ Lisina¹	↓	2,99	-0.085723	0.14555	0.037084	0,00741
Arginina¹	↓	1,64	-0.080351	-0.070299	-0.054341	0,01049
Arginina/ Leucina/ Lisina¹	↓	1,73	-0.08405	0.0061218	-0.062778	0,01786

Observações: Comp1, 2 e 3: coeficientes de regressão (loading factors) de PLS-DA nos componentes 1, 2 e 3. Status: aumento (↑) ou diminuição (↓) da concentrações dos metabólitos frente a superexpressão da proteína Pdp3. p-valor: valor de p ajustado obtido no múltiplo teste t, no qual foram considerados estatisticamente diferentes os p-valores <0,05. δH: deslocamento químico do respectivo bucket (ppm).

A partir da observação na alteração dos níveis dos metabólitos descritos acima, iniciou-se o estudo de quais vias estariam sendo afetadas pela superexpressão da Pdp3, relacionando essas modificações com o fenótipo apresentado por essa cepa. A seguir estão descritas algumas vias metabólicas associadas a estes metabólitos e suas respectivas relações com o desenvolvimento tumoral. O objetivo nesta etapa foi tentar associar as alterações nos níveis intracelulares destes metabólitos com dados presentes na literatura e observar se a superexpressão da proteína Pdp3 levou a célula a apresentar um metabolismo característico de células tumorais.

5.4 Análise de Metabolismo Celular

5.4.1 Metabolismo de Glicerol, Trealose, Succinato e Histidina

Glicerol pode ser utilizado como fonte de carbono e energia por diversos tipos de levedura (HIMMS-HAGEN, 1968). A utilização de glicerol pela *S. cerevisiae* ocorre através das enzimas glicerol quinase (Gut1) e glicerol-3-fosfato desidrogenase mitocondrial (Gut2), estando a última localizada na superfície externa da membrana mitocondrial interna. Essas duas enzimas responsáveis pela utilização de glicerol como fonte de carbono são reguladas pela repressão catabólica (NEVOIGT; STAHL, 1997). Primeiramente, o glicerol é fosforilado a glicerol-3-fosfato (G3P) no citoplasma pela ação da enzima Gut1. Em seguida, este metabólito é transportado para mitocôndria, onde é oxidado a dihidroacetona fosfato pela enzima Gut2. O dihidroacetona fosfato é transportado para o citoplasma e pode ser direcionado para via glicolítica ou gliconeogênese (TURCOTTE et al., 2010). A enzima Gut2 é dependente de FAD, logo, a segunda reação produz FADH₂, que entra diretamente na cadeia transportadora de elétrons (NEVOIGT; STAHL, 1997).

Além de ser utilizado como fonte de carbono, o glicerol é subproduto do processo de fermentação da glicose (HIMMS-HAGEN, 1968). A produção de glicerol ocorre primeiramente devido a redução da dihidroacetona fosfato, oriunda da via glicolítica, produzindo glicerol-3-fosfato pela enzima G3P desidrogenase citosólica (ctGDP). A enzima glicerol 3-fosfatase (GPP) catalisa a desfosforilação do G3P em glicerol. A produção de glicerol tem papel fundamental na manutenção do balanço redox citosólico. A enzima GPP tem sua atividade aumentada em presença de glicose, porém, a ctGDP é reprimida nessas condições. Acredita-se que um aumento da atividade da enzima ctGDP durante crescimento em fontes de carbono não repressoras está associado a uma necessidade de balanceamento dos níveis intracelulares de G3P para síntese de glicerídeos necessário para produção de membrana celular (NEVOIGT; STAHL, 1997). Na figura 14 estão demonstradas de forma simplificada as vias de degradação e síntese do glicerol, e as vias alternativas de utilização de seus intermediários.

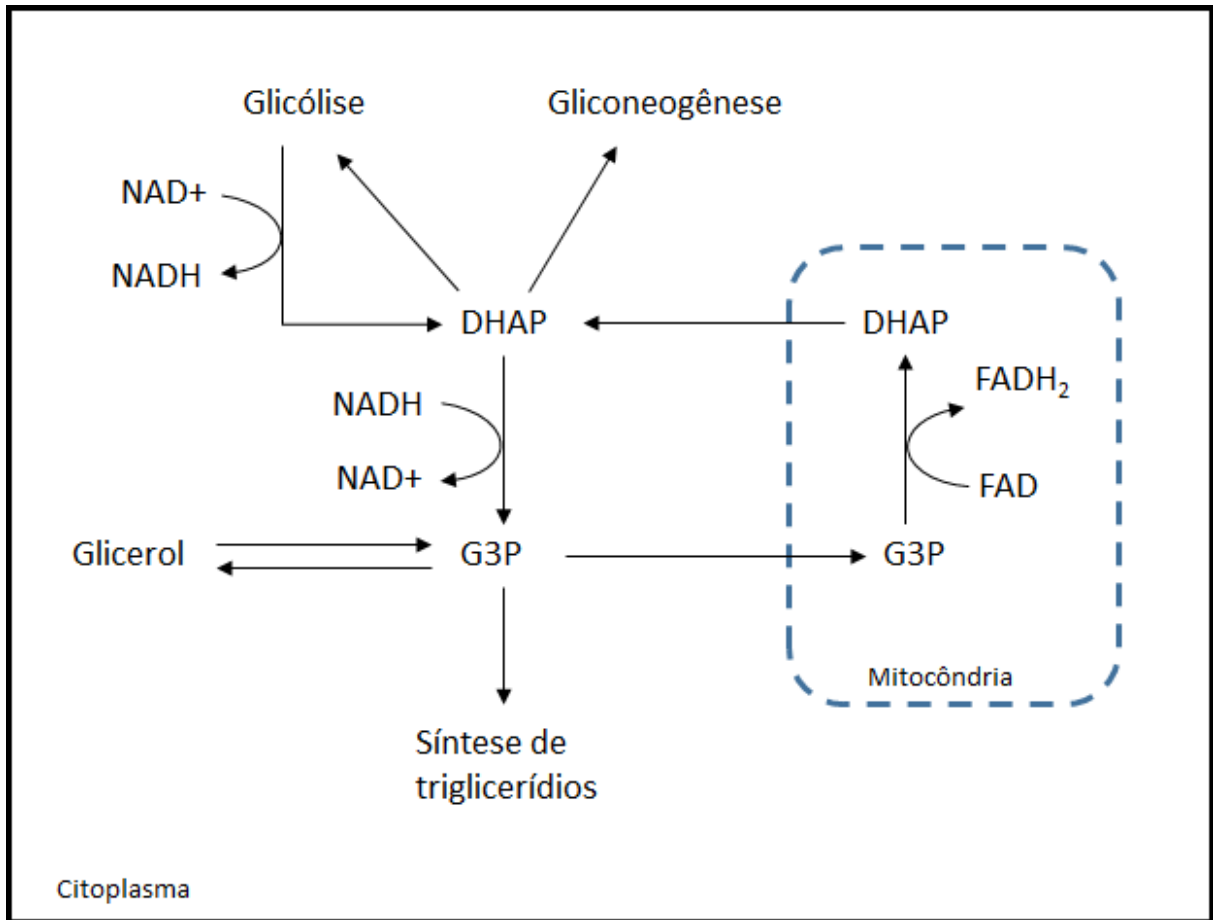


Figura 14: Integração das vias de síntese e degradação do glicerol em *S. cerevisiae*.

Neste trabalho, foi observado um aumento na concentração intracelular de glicerol. Como foi reportado por Rona e cols. (2016), a superexpressão da Pdp3 leva a célula a apresentar um metabolismo menos oxidativo. Como a utilização de glicerol como fonte de carbono está diretamente relacionada ao metabolismo oxidativo, uma redução deste metabolismo levaria a uma diminuição do fluxo de glicerol através da sua via de degradação para produção de energia, resultando em um acúmulo intracelular. É possível também que a via de síntese de glicerol esteja mais ativa para suportar a necessidade de síntese de triglicerídios para produção de membrana celular.

Trealose é um dissacarídeo presente em levedura e diversos outros microrganismos utilizado como reserva de carbono e energia, como parte do mecanismo de proteção a diversas condições de estresse. (GARRE et al., 2009; PETITJEAN et al., 2015). Estudos realizados em células de *S. cerevisiae* mostraram que este metabólito confere tolerância a diversos tipos de estresse como térmico, oxidativo, osmótico, concentração de etanol, dentre outros, e sabe-se que a síntese

de trealose é ativada em resposta ao estresse sofrido pela célula (ELEUTHERIO et al., 2014). A tolerância adquirida pela célula ocorre devido a capacidade da trealose de proteger a integridade da membrana através da interação com fosfolipídios, e por preservar a conformação nativa de proteínas (GARRE et al., 2009). Foi observado um aumento na concentração intracelular de trealose, e esta alteração pode estar relacionada a um possível estresse causado na célula devido a superexpressão da proteína Pdp3. Porém, não é possível relacionar a alteração deste metabólito com células tumorais pois, células de mamíferos não possuem esta via de síntese em seu metabolismo. Logo, essa alteração envolve a regulação de vias que não estão presentes em células de mamíferos.

Foi observado também uma diminuição nos níveis intracelulares de succinato. Este metabólito é um intermediário importante do ciclo do ácido cítrico sendo formado a partir do succinil-CoA, através da enzima succinil-CoA sintase, e degradado pelo complexo enzimático succinato desidrogenase, produzindo fumarato (JIANG; YAN, 2017). Este metabólito também pode ser produzido através da via do GABA, que será comentada em seguida. O desenvolvimento tumoral está relacionado com mutações em diversas enzimas. Mutações nos genes codificantes da enzima succinato desidrogenase, que também participa da cadeia respiratória mitocondrial (complexo II), estão associadas a diversos tipos de câncer, resultando na acumulação deste metabólito. Em condições de fermentação, em células de *S. cerevisiae*, a succinato desidrogenase tem sua expressão reduzida (DIAZ-RUIZ; RIGOLET; DEVIN, 2011; JIANG; YAN, 2017).

Em levedura, há também a presença do ciclo do glioxilato, que não está presente em células de mamíferos. Este ciclo é constituído de 5 reações catalisadas pelas enzimas isocitrato liase (Icl1), malato sintase (Mls1), citrato sintase (Cit2), aconitase (Aco1) e malato desidrogenase (Mdh2). As três reações catalisadas pelas enzimas Mdh2, Aco1, Cit2 deste ciclo estão presentes também no ciclo do ácido cítrico (Figura 15) (LEE et al., 2011). No ciclo do glioxilato, duas moléculas de acetil-CoA são convertidas em succinato (4 carbonos), que é direcionado para o ciclo do ácido cítrico ou utilizado como precursor para síntese de aminoácidos. Este ciclo possibilita a utilização de ácidos graxos, etanol e acetato como fonte de carbono (KUNZE et al., 2006). Portanto, além do ciclo do ácido cítrico, o succinato também pode ser produzido pelo ciclo do glioxilato e com isso, não é possível fazer uma comparação com o

metabolismo de células tumorais, visto que esta via pode ter uma influência na alteração da concentração intracelular de succinato e não está presente em células de mamíferos.

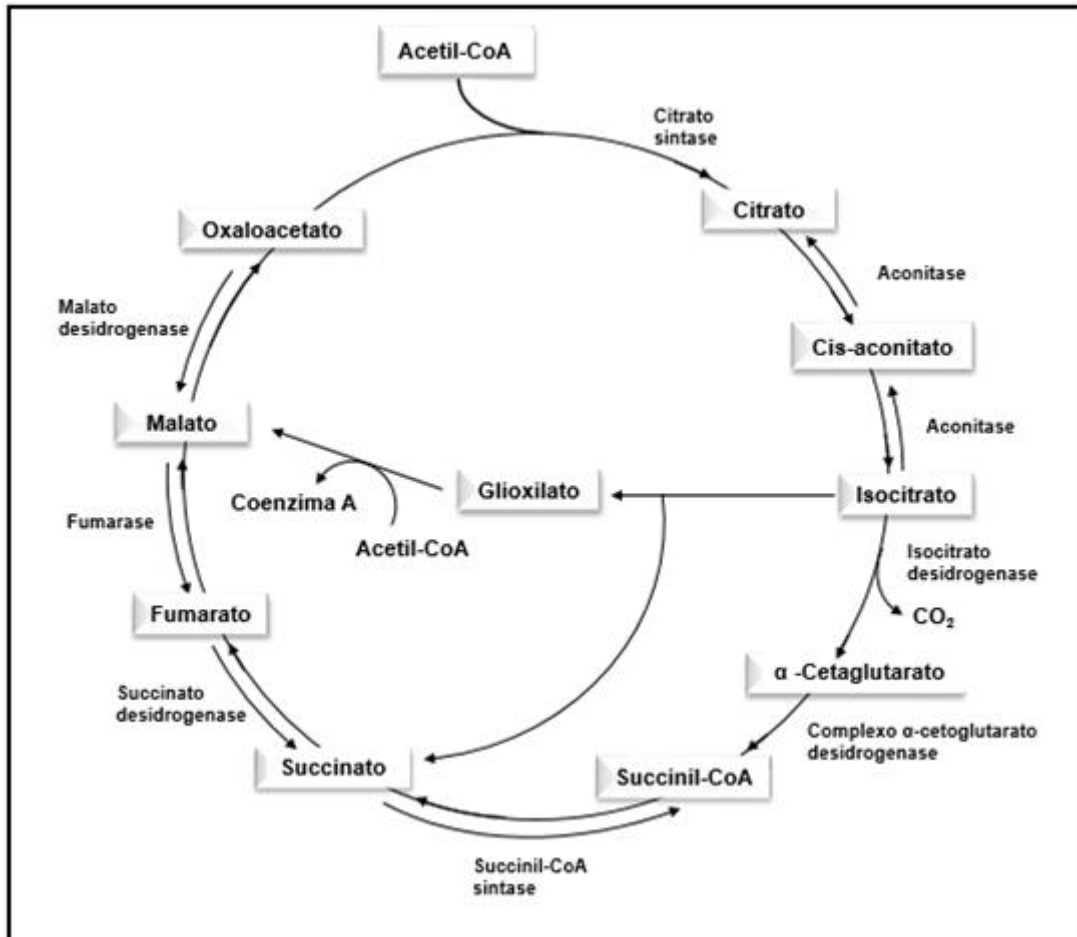


Figura 15: Comparação das vias do ciclo TCA e do glioxilato.

Histidina é um aminoácido proteínogênico e faz parte do grupo de aminoácidos que não suportam o crescimento celular quando utilizados como fonte única de nitrogênio (LJUNGDAHL; DAIGNAN-FORNIER, 2012). A via biosintética deste aminoácido está associada a via de síntese de nucleotídeos, visto que o composto precursor deste aminoácido é o 5-fosforibosil 1-pirofosfato, produzido a partir da ribose-5-fosfato, um intermediário da via das pentoses (Figura 16). A via de síntese de histidina é composta por dez reações enzimáticas e é conservada em todos os organismos, incluindo *Archea*, bactéria gram-positiva, eucariotos inferiores e plantas. O aminoácido glutamina é importante para esta via pois é utilizado como fonte de nitrogênio em uma das etapas. O glutamato também é utilizado em uma reação de

transaminação de um dos intermediários de síntese (ALIFANO et al., 1996; KULISHORN; PERSICKE; KALINOWSKI, 2014).

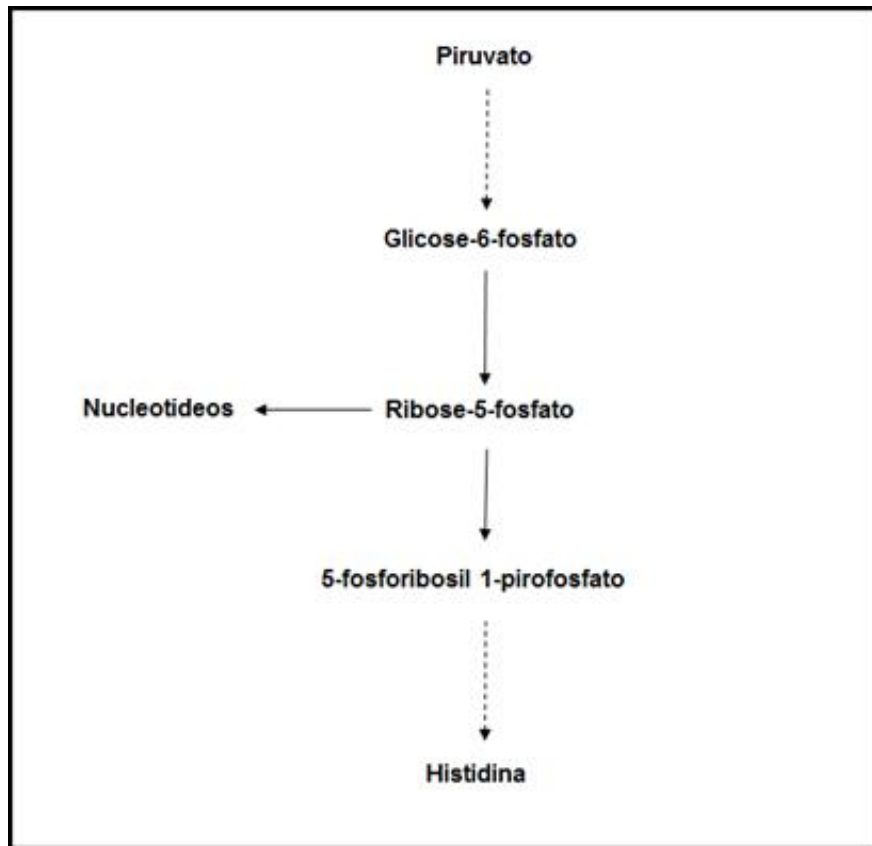


Figura 16: Esquema simplificado da via de síntese da histidina associado a síntese de nucleotídeos.

A histidina então produzida é utilizada na síntese de proteínas, porém este aminoácido também é um precursor na produção de histamina. Este metabólito é o produto de descarboxilação do aminoácido histidina através da enzima histidina descarboxilase (HDC). Estudos mostram uma relação entre a histamina e os processos de carcinogênese e proliferação tumoral (MEDINA et al., 1999). Acredita-se que o crescimento tumoral e a atividade da enzima HDC estão relacionados e já foi mostrado que esta enzima é encontrada superexpressa em diversos tipos de câncer como leucemia, mama, estômago e pulmão. Porém ainda não se tem evidências da relação entre a enzima HDC e a progressão tumoral (MEDINA et al., 1999). Células tumorais apresentam altos níveis de histamina endógena, que pode regular diversos processos biológicos associados ao crescimento tumoral (MEDINA; RIVERA, 2010).

Neste trabalho, foi observado uma diminuição dos níveis de histidina com a superexpressão da proteína Pdp3, porém a histamina não foi identificada nos espectros obtidos, tanto para a cepa Pdp3, quanto para a controle WT. Logo, pode-se supor que a diminuição nos níveis de histidina não está relacionada com a síntese de histamina. É possível que esta diminuição da concentração de histidina possa estar relacionada com um aumento na utilização para a síntese de proteínas. Não é possível supor que a síntese de histidina esteja sendo afetada visto que este aminoácido é requerimento nutricional para a cepa utilizada neste trabalho (BY4741). São necessários experimentos adicionais como, por exemplo, de análise de expressão de proteínas, para que seja possível se ter uma melhor elucidação sobre essa alteração dos níveis deste aminoácido.

5.4.2 Via do GABA (“GABA Shunt”)

Outro metabólito identificado nas análises dos espectros de RMN foi o ácido gamma-aminobutírico (GABA). Foi observado uma diminuição dos níveis de GABA com a superexpressão da proteína Pdp3. Este metabólito é um aminoácido não protéico sintetizado a partir da descarboxilação do glutamato através da enzima glutamato descarboxilase. Está presente em plantas, bactérias e animais e possui um papel metabólico no ciclo do ácido cítrico, sugerindo seu envolvimento no metabolismo do organismo (AL-WADEI; ULLAH; AL-WADEI, 2011). A via metabólica do GABA, conhecida como “GABA shunt” é constituída de 3 reações catalisadas pelas enzimas glutamato descarboxilase (GAD1), responsável pela conversão de glutamato a GABA; GABA aminotransferase, que converte GABA e α -cetoglutarato em succinato semialdeído e glutamato, e por fim, a succinato semialdeído desidrogenase, que converte SSA em succinato (CAO et al., 2013).

O papel da via do GABA tem sido estudado em plantas e animais. No caso de mamíferos, o GABA é um neurotransmissor chave no sistema nervoso central, está associado com neurotransmissão inibitória e também atua como hormônio ou fator trófico em sistemas neuronais periféricos e endócrinos (BACH et al., 2009; CAO et al., 2013). A síntese e secreção de GABA tem um papel fundamental na manutenção da função normal neural e alterações no seu metabolismo estão associadas a doenças como epilepsia e Parkinson. Doenças genéticas humanas apresentam perda das enzimas desta via, evidenciando sua importância na fisiologia da célula (COLEMAN

et al., 2001). A relação entre a via do GABA e o câncer esta sendo estudada e resultados mostram que a estimulação na sinalização do GABA induz a apoptose em células de neuroblastoma humano e o tratamento com este aminoácido pode diminuir a taxa de proliferação em alguns tipos de câncer, como cólon, pâncreas e pulmão (SONG et al., 2016).

Em plantas, esta via é importante para o controle do pH citosólico, balanço entre o metabolismo de carbono e nitrogênio e para a adaptação ao stress. Já foi mostrado também que esta via tem um papel fundamental na sinalização de processos biológicos, regulação da expressão gênica e da atividade enzimática (CAO et al., 2013). Em levedura, a via do GABA tem como função converter α -cetogluturato à succinato, evitando duas reações do ciclo do ácido cítrico catalisadas pelas enzimas α -cetoglutarato desidrogenase e succinato tioquinase (Figura 17) (CAO et al., 2013). Porém, pouco se sabe sobre o papel desta via no metabolismo de levedura. Estudos mostraram que a presença da proteína glutamato descarboxilase (Gad1p) é necessária para a resistência normal ao estresse oxidativo (COLEMAN et al., 2001).

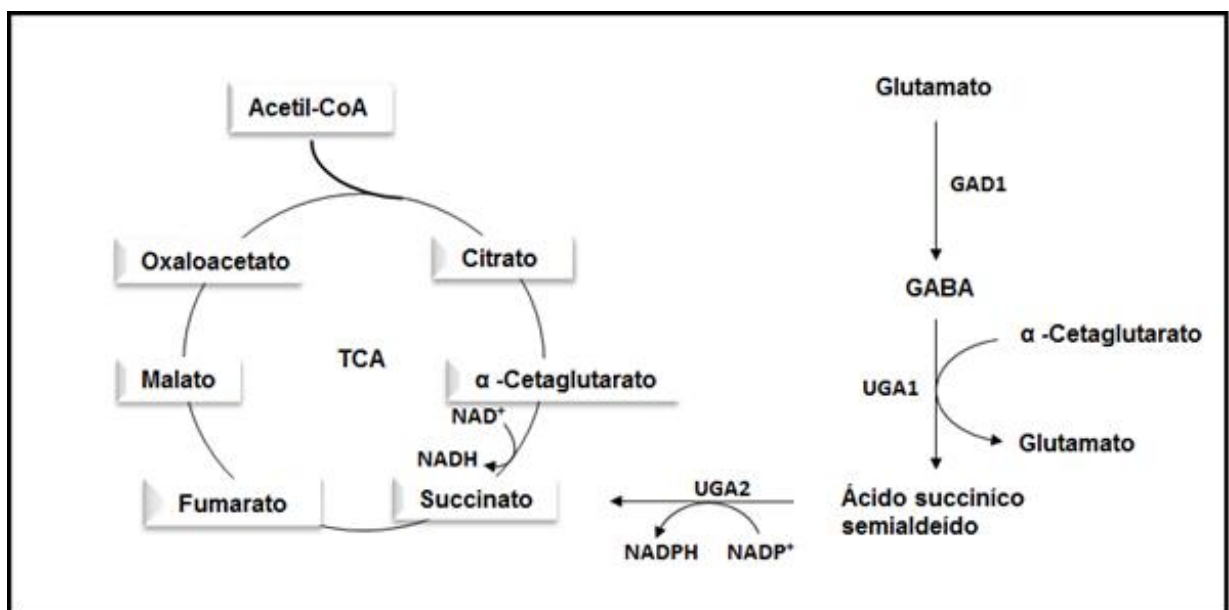


Figura 17: Via de síntese do GABA (Ácido Gamma AminoButírico) em *S. cerevisiae*.

Observou-se também que células expressando a proteína Gad1p apresentaram maior tolerância ao estresse oxidativo, porém é observado uma maior sensibilidade ao expressar a proteína Gad1p em células deletadas nos genes codificantes das proteínas GABA aminotransferase (UGA1) e succinato semialdeído

desidrogenase (UGA2), sugerindo que a via do GABA possui um papel importante na limitação da produção de espécies reativas de oxigênio durante estresse (CAO et al., 2013; COLEMAN et al., 2001). Esta via também exerce uma função na tolerância ao estresse térmico. A deleção de qualquer uma das enzimas da via torna as células de levedura mais sensíveis a um estresse de 45 e 50°C. O fluxo através desta via é necessário para o controle dos níveis de espécies reativas de oxigênio durante o estresse térmico (CAO et al., 2013).

Um estudo sobre mutações nas enzimas do ciclo do ácido cítrico mostrou que os níveis de mRNA do gene que codifica a enzima Gad1p diminuíram com qualquer mutação nas enzimas Ciclo de Krebs. Sabe-se que a expressão desta enzima é induzida depois da diauxia, quando a fonte de carbono passa a ser não fermentável. A partir dessas observações sugere-se que esta diminuição da expressão do gene da proteína Gad1p está associado a uma diminuição do metabolismo oxidativo (MCCAMMON, 2003).

É possível que uma diminuição nos níveis de GABA esteja associada a uma diminuição da expressão da enzima Gadp1. Como os resultados obtidos por Rona e col 2016 mostraram que a superexpressão da Pdp3 leva a uma diminuição do metabolismo oxidativo e da tolerância ao estresse oxidativo, é possível que este fenótipo esteja associado a uma diminuição da expressão desta enzima e do fluxo através da via do GABA.

5.4.3 Metabolismo de Colinas

Lipídios são os principais componentes estruturais de membranas celulares, mas também possuem como função o fornecimento de energia e sinalização no processo de crescimento celular, inflamação e imunidade. Um aumento na síntese de lipídios é uma característica de células tumorais, que satisfaz as necessidades para proliferação na produção de membrana (MORI et al., 2016).

Os ácidos graxos são transformados em glicerofosfolipídios por uma sequência de reações de transesterificações entre duas moléculas de acil-CoA e glicerol-3-fosfato, produzindo o ácido fosfatídico. Este composto é então desfosforilado a diacilglicerol pela enzima lipin (Pah1), que, por sua vez, pode ser utilizado para síntese de triacilglicerol ou ser desviado para síntese de fosfatidiletanolamina e fosfatidilcolina

através da via CDP-colina, que também é conhecida como via Kennedy (NATTER; KOHLWEIN, 2013).

Fosfatidilcolina e outros fosfolipídios formam a bicamada lipídica característica de membranas celulares e são responsáveis por regular sua integridade, sendo a fosfatidilcolina o composto mais abundante presente em membranas. A fosfocolina (PC) é tanto um precursor de síntese como um produto da quebra da fosfatidilcolina (ACKERSTAFF; GLUNDE; BHUJWALLA, 2003). Biossíntese e degradação de fosfatidilcolina são processos importantes para eventos de transdução de sinal mitogênico. A regulação do metabolismo de fosfolipídios de colina ocorre pela estimulação por fatores de crescimento, citocinas, oncogenes e substâncias químicas carcinogênicas (ACKERSTAFF; GLUNDE; BHUJWALLA, 2003).

Células tumorais apresentam um metabolismo alterado de colina e lipídios, observando-se um aumento nos níveis de fosfocolina e colina total (fosfocolina, glicerofosfocolina e colina) característico. Esse aumento foi observado em câncer de mama, próstata e cerebral (ACKERSTAFF; GLUNDE; BHUJWALLA, 2003; MORI et al., 2016). Em câncer de mama e ovário, observa-se também uma diminuição nos níveis de glicerofosfocolina (GCP), com consequente diminuição da razão GPC/PC em relação a tecidos saudáveis (STEWART et al., 2012). Esta alteração no metabolismo de colina está relacionado com mudanças na expressão e atividades das enzimas desta via.

Estudos mostraram que células tumorais apresentam um aumento na expressão e atividade da enzima GPC PDE, responsável pela produção de colina e G3P a partir da glicerofosfocolina. A colina produzida pode então ser consumida pela via Kennedy. O silenciamento do gene que codifica esta enzima resultou em um aumento na razão GPC/PC e uma diminuição nos níveis de metabólitos lipídicos, ácido fosfatídico e LPA, sendo os dois últimos importantes moléculas de sinalização envolvidas em transformação celular e diversos tipos de câncer (STEWART et al., 2012). Em *S. cerevisiae*, a enzima responsável pela produção de colina e G3P a partir da glicerofosfocolina é a glicerofosfocolina fosfodiesterase, codificada pelo gene GDE1 (“Saccharomyces Genome Database”).

A síntese de fosfocolina é realizada a partir da colina pela ação da enzima colina quinase (CK). Esta enzima é superexpressa em células tumorais e é considerada a principal causa do aumento de fosfocolina e colinas totais (MORI et al.,

2016). Se esta enzima é submetida a ação de inibidores observa-se inibição da mitose e proliferação (STEWART et al., 2012). Também é observado em células tumorais um aumento no transporte de colina para a célula e da atividade da enzima fosfolipase C e D, que catalisam as reação de hidrólise da fosfatidilcolina produzindo fosfocolina, no primeiro caso, e colina e ácido fosfatídico, no segundo (GLUNDE et al., 2015).

Neste trabalho foi observado uma diminuição nos níveis de colina ao superexpressar a proteína Pdp3. A figura abaixo (Figura 18) apresenta a via Kennedy, responsável pela síntese de fosfatidilcolina a partir da colina. A diminuição da concentração de colina pode estar associada a uma alteração de expressão ou atividade da enzima colina quinase (CKI1), assim como observado em células tumorais. A colina pode estar sendo consumida para síntese de fosfocolina e este pode estar sendo utilizado na produção de fosfatidilcolina para síntese de membrana celular necessária no processo de proliferação. Esta hipótese está de acordo com os resultados apresentados por Rona e col 2016, mostrando que a superexpressão da Pdp3 leva a célula a apresentar características semelhantes a células tumorais, como um aumento da síntese de lipídios para produção de membrana celular.

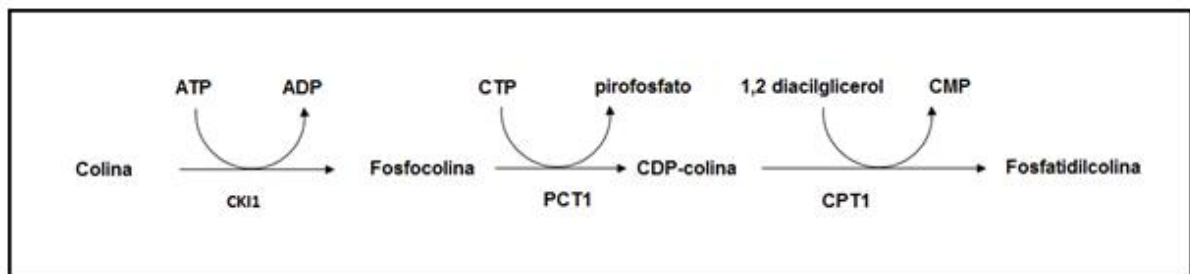


Figura 18: Via biosintética de fosfolipídios (Via Kennedy).

5.4.4 Metabolismo de Arginina e Ornitina

A arginina é um aminoácido semi-essencial, precursor da iniciação de diversas vias metabólicas como síntese de proteínas, óxido nítrico, poliaminas, uréia, nucleotídeos, glutamato, dentre outras (DELAGE et al., 2010). Os níveis de arginina em células em crescimento diminuem mais rapidamente que outros aminoácidos, mostrando que a arginina não é utilizada apenas para síntese de proteínas (WHEATLEY, 2005).

A concentração deste aminoácido é parcialmente mantida pela síntese a partir da citrulina pela ação da enzima argininosuccinato sintase 1 e arginosuccinato liase. Porém a síntese endógena deste aminoácido não é suficiente para suprir as necessidades de células tumorais proliferantes (QIU et al., 2014). Este aminoácido está associado com o desenvolvimento de tumores e estudos realizados em ratos mostraram que um aumento de arginina na alimentação leva a um aumento no crescimento tumoral e que a sua diminuição na dieta impede o desenvolvimento de metastase em rins, ou seja, arginina é muito requerida por tumores (DELAGE et al., 2010; WHEATLEY, 2005).

Células tumorais apresentam um aumento na utilização de arginina para processos anabólicos, por outro lado, muitos tumores são deficientes na enzima argininosuccinato sintase 1 e passam a ser auxotróficos em relação a este aminoácido. A enzima argininosuccinato sintase 1 catalisa uma etapa limitante na síntese de arginina para manter a sua concentração no soro do sangue. Já foi descoberto que esta enzima atua como um supressor de tumor (QIU et al., 2014). Também foi observado que células tumorais de câncer de mama são deficientes na enzima argininosuccinato sintase 1 e que pacientes com a doença possuem níveis baixos de arginina no soro do sangue se comparado com pessoas saudáveis (DONGMEI et al., 2015; QIU et al., 2014).

Em levedura, mas especificamente em células de *S. cerevisiae*, a síntese de arginina começa a partir do glutamato e acetil-CoA, que produzem ornitina através de 5 etapas de acetilação, sendo o grupo acetil reciclado durante o processo. Em seguida, a ornitina é transportada para o citosol e então reage com carbamoilfosfato sob a ação da enzima carbamoiltransferase para produção de citrulina. A enzima ácido arginosuccínico sintase (Arg1) transforma a citrulina em arginosuccinato. Por último, arginosuccinato é clivado por uma liase, produzindo arginina.(JAUNIAUX; URRESTARAZU; WIAME, 1978). Todas essas etapas da síntese de arginina estão descritas na figura abaixo (Figura 19).

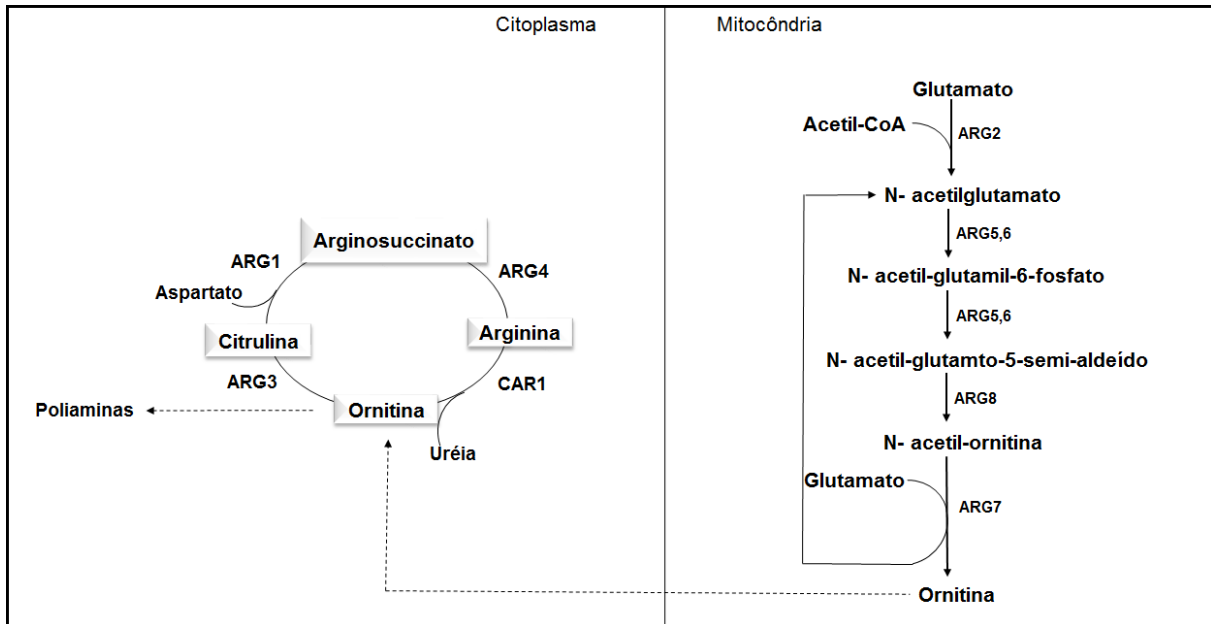


Figura 19: Via biosintética de Ornitina e Arginina em *S. cerevisiae*.

Ao analisar os espectros de RMN obtidos para a cepa de *S. cerevisiae* superexpressando a proteína Pdp3 e a WT, observou-se uma diminuição nos níveis de arginina intracelular, por mais que a concentração de glutamato tenha aumentado.

Com base nas informações citadas acima, pode-se sugerir que esta diminuição nos níveis de arginina esteja relacionada com uma deficiência na enzima argininosuccinato sintase 1, assim como já foi observada em células tumorais. É provável que a arginina esteja sendo utilizada como precursora de todas as vias que este aminoácido está envolvido, porém, como sua síntese pode estar sendo prejudicada, sua concentração intracelular diminui devido ao fato de sua única fonte de arginina ser exógena. Essa diminuição também pode estar relacionada apenas com um aumento na utilização de arginina para processos anabólicos, uma característica de células tumorais. As duas suposições mostram que esta diminuição na concentração de arginina pode estar relacionada com uma alteração do metabolismo que leva esta célula a apresentar características tumorais. Com isso, este resultado está de acordo com os resultados obtidos por Germana Rona, que mostram que a superexpressão da proteína Pdp3 leva a célula a apresentar características semelhantes a de células tumorais.

A síntese de poliaminas também é um processo de extrema importância para a proliferação tumoral. A enzima ornitina descarboxilase (ODC) catalisa a primeira reação da síntese de poliaminas, que é importante para manutenção de viabilidade

celular e da síntese de macromoléculas devido a sua interação com ácidos nucleicos, proteínas e membrana celular. Esta enzima é encontrada superexpressa em células tumorais e sabe-se que um dos primeiros eventos durante a proliferação tumoral é a indução da biossíntese desses compostos (MEDINA et al., 1999). Ao superexpressar a Pdp3, observou-se uma diminuição nos níveis intracelular de ornitina, que pode estar relacionado com um elevado consumo deste metabólito para síntese de poliaminas. Porém, esta suposição deve ser confirmada com outros experimentos como análise da expressão da enzima ornitina descarboxilase pois não foi possível quantificar poliaminas neste trabalho.

5.4.5 Via da Glutaminólise

Uma transformação metabólica é necessária para tumorigênese, e diversos tipos de tumores apresentam atividades metabólicas conservadas e taxa de absorção de nutrientes aumentada a níveis maiores que o necessário devido a mutações em oncogenes. Essas alterações podem ocorrer devido a mudanças na expressão de enzimas, incluindo as responsáveis pelo transporte desses nutrientes, o que pode modificar o fluxo metabólico (DEBERARDINIS et al., 2008).

Células tumorais tem como característica principal a chamada glicólise aeróbica, na qual a glicose é preferencialmente convertida a lactato mesmo na presença de oxigênio (Efeito Warburg), observando-se então uma diminuição do metabolismo oxidativo (DIAZ-RUIZ; RIGOLET; DEVIN, 2011). O metabolismo fermentativo passa a ser a principal fonte de energia da célula tumoral e satisfaz as exigências de ATP para diversos processos celulares como, por exemplo, a proliferação (DIAZ-RUIZ; RIGOLET; DEVIN, 2011; LE et al., 2012). Porém, essas células precisam de precursores biossintéticos adicionais não obtidos através da via glicolítica (LE et al., 2012).

O ciclo do ácido cítrico é o principal processo metabólico das células, no qual moléculas combustíveis entram nesta via na forma de acetil-CoA, produzindo energia na forma de transportadores de elétrons reduzidos (NADH e FADH₂) e CO₂ através de uma série de reações (NELSON; COX, 2011; SAJNANIA et al., 2017). Além disso, os metabólitos intermediários deste ciclo são precursores para diversos processos biossintéticos na produção de macromoléculas essenciais para a célula (NELSON; COX, 2011).

Em células tumorais, este ciclo está truncado devido a uma diminuição das atividades de enzima-chaves deste ciclo, e o piruvato oriundo da glicólise é convertido apenas a citrato, que será transportado da mitocôndria para o citosol. Por fim, o citrato é clivado pela ATP citrato liase produzindo acetyl-CoA para a síntese de ácidos graxos. Isto resulta em um aumento no consumo dos intermediários deste ciclo, sendo necessária um aumento de sua síntese para o balanceamento deste consumo (COLLER, 2014). Grande parte dos precursores biossintéticos é obtida através do metabolismo da glutamina (LE et al., 2012). Células tumorais apresentam alto consumo de glutamina, que é utilizada como principal substrato para anaplerose (YANG; VENNETI; NAGRATH, 2017).

A via da glutaminólise é responsável por converter glutamina em metabólitos do ciclo de Krebs como, por exemplo, o α -cetoglutarato e oxaloacetato, pela ação de diversas enzimas (YANG; VENNETI; NAGRATH, 2017). O α -cetoglutarato entra o ciclo do ácido cítrico como fonte de carbono para produção de macromoléculas necessárias durante o processo de proliferação (CHEN; CUI, 2015).

A primeira etapa da via da glutaminólise é a conversão de glutamina à glutamato. A enzima GLS (glutaminase) é responsável pela síntese de glutamato e amônia a partir da glutamina. Já a reação inversa é catalisada pela enzima glutamina sintase. A reação no sentido da produção de glutamato é favorecida em células tumorais, pois a GLS é encontrada altamente expressa e sua atividade está relacionada com as taxas de crescimento de tumores. Além disso, é observado um acúmulo de glutamato em células tumorais (DEBERARDINIS et al., 2008; DEBERARDINIS; CHENG, 2010).

O glutamato sintetizado é convertido a α -cetoglutarato através da ação da enzima glutamato desidrogenase, obtendo-se poder redutor na forma de NADH e NADPH (DEBERARDINIS; CHENG, 2010; YANG; VENNETI; NAGRATH, 2017). Esta mesma reação pode ocorrer através da atividade de um grupo de transaminases que inclui glutamato-oxaloacetato transaminase, glutamato-piruvato transaminase e fosfoserina transaminase, produzindo aminoácidos não essenciais como aspartato, alanina e fosfoserina (LE et al., 2012; YANG; VENNETI; NAGRATH, 2017).

Como já foi dito, o citrato é o precursor principal para o processo de lipogênese através das enzimas ATP-citrato liase e ácido graxo sintase. O oxaloacetato, um importante intermediário do ciclo de Krebs, é produzido a partir do α -cetoglutarato e

sofre uma reação de condensação com o acetil-CoA para formar citrato (YANG; VENNETI; NAGRATH, 2017).

Em *S. cerevisiae*, glutamato e glutamina são responsáveis por 85 E 15% do nitrogênio intracelular total, respectivamente, e estão envolvidos com diversas reações de transaminação necessárias para síntese de outros aminoácidos (LJUNGDAHL; DAIGNAN-FORNIER, 2012; SIEG; TROTTER, 2014). A síntese de glutamato em levedura pode ocorrer através da reação entre amônia e α -cetoglutarato ou pelo catabolismo de moléculas precursoras (SIEG; TROTTER, 2014). Este metabólito pode ser sintetizado a partir da glutamina e α -cetoglutarato pela enzima codificada pelo gene *GLT1* (Glutamato sintase) (LJUNGDAHL; DAIGNAN-FORNIER, 2012). Esta reação é responsável por produzir duas moléculas de glutamato a partir de uma molécula de glutamina e α -cetoglutarato (HOFMAN-BANG, 1999). Este aminoácido é substrato para síntese de α -cetoglutarato catalisada pela enzima glutamato desidrogenase (LJUNGDAHL; DAIGNAN-FORNIER, 2012).

Nesta trabalho, pode-se observar que os níveis de concentração de glutamato/glutamina na cepa *Pdp3⁺* são maiores em relação a cepa WT. Os experimentos foram realizados utilizando glicerol como fonte de carbono para que as células apresentassem um metabolismo oxidativo. Resultados anteriores obtidos por Rona e col. 2016 mostraram uma alteração de metabolismo ao superexpressar a proteína *Pdp3* nas mesmas condições experimentais. Observou-se que a superexpressão desta proteína resultou em um aumento na taxa de crescimento e diminuição do consumo de oxigênio e uma menor tolerância a estresse oxidativo, sendo este um metabolismo menos oxidativo do que o observado na cepa controle (RONA et al., 2016).

Considerando então que a superexpressão da *Pdp3* levou a célula a apresentar características semelhantes a células tumorais, o resultado obtido neste trabalho está de acordo com resultados apresentados por Germana B. Rona e diversos outros descritos na literatura que mostram o glutamato como sendo uma marca de células tumorais. Pode-se supor que este aumento nos níveis de glutamato/glutamina observado seja devido a um aumento na absorção de glutamina e da utilização da mesma para síntese de glutamato. É possível que possa ter ocorrido um aumento de expressão da enzima *GLT1*, responsável pela produção de glutamato a partir da glutamina e α -cetoglutarato, em *S. cerevisiae*. Este excesso de glutamato/glutamina

pode estar sendo redirecionado para a síntese de α -cetoglutarato e consequente produção de aminoácidos, proteínas e lipídios, assim como observado em células tumorais.

Altas demandas energéticas e metabólicas das células tumorais fazem com que alguns aminoácidos não essenciais sejam necessários. A glutamina é fonte desses aminoácidos como aspartato, alanina e fosfoserina (YANG; VENNETI; NAGRATH, 2017). Uma alta taxa de secreção de alanina é observada em células ploriferantes. Isso porque, em células tumorais, é observado um excesso de nitrogênio intracelular oriundo o metabolismo da glutamina que deve ser secretado na forma de alanina ou amônia (DEBERARDINIS et al., 2008). Este aminoácido é um dos produtos do metabolismo da glutamina no qual o glutamato e piruvato reagem para formar alanina e α -cetoglutarato a através da ação da enzima alanina transaminase. Esse aumento na concentração de alanina pode estar relacionado com o processo de lipogênese. A transaminação da alanina favorece a oxidação de glutamato a α -cetoglutarato que, por sua vez, é a fonte de carbono para a lipogênese (ALBERS et al., 2008).

Foi observado que a superexpressão da proteína Pdp3 em células de *S. cerevisiae* resultou em um aumento na concentração intracelular de alanina, característica de células tumorais. Pode-se supor que o aumento nos níveis de alanina pode estar relacionado com o aumento do metabolismo da glutamina, e consequente aumento na concentração de glutamato. Esse aumento beneficiaria a produção de proteínas que é aumentada em células tumorais e a síntese de ácidos graxos e triglicerídios (ALBERS et al., 2008; TESSEM et al., 2008).

Além de ser fonte de carbono e nitrogênio para síntese de macromoléculas, a glutamina também está envolvida em processos de sinalização intracelular responsáveis por promover o crescimento tumoral. Em humanos, o processo de exportação da glutamina para fora do citoplasma pelo transportador LAT1 (L-type amino acid transporter 1) permite a absorção do aminoácido leucina. Este aminoácido, por sua vez, ativa a proteína quinase mTORC1, que tem um papel de regular a síntese de proteínas, biogênese ribossomal e autofagia (YANG; VENNETI; NAGRATH, 2017). A glutamato desidrogenase (GDH) é regulada alostéricamente por diversos fatores e leucina é um ativador desta enzima. Este aminoácido ativa a GDH se ligando diretamente a esta enzima, estimulando a desaminação do glutamato a α -

cetoglutarato (DURÁN et al., 2012). Com isso, juntamente com glutamina, leucina é um aminoácido muito importante para o metabolismo energético e são responsáveis pela estimulação da glutaminólise e atividade da mTORC1 em humanos (DURÁN et al., 2012).

Leucina faz parte de um grupo de aminoácidos de cadeia ramificada chamados de BCAA, que inclui isoleucina e valina. Esses aminoácidos são importantes sinalizadores nutricionais e seu catabolismo participa de diversos processos patológicos e fisiológicos. Em humanos, os níveis de BCAA no plasma é maior em pacientes com câncer de mama, assim como a expressão da enzima BCAT1 (Branched-chain amino acid transaminase 1), que participa do catabolismo de BCAA. Já foi mostrado que esta enzima promove crescimento celular e formação de colônias de células de câncer de mama e que pode ativar seletivamente a sinalização da mTOR (ZHANG; HAN, 2017).

Em levedura, esses aminoácidos também possuem um papel importante na via de sinalização TOR. A qualidade de uma fonte de nitrogênio é definida pela sua capacidade de sustentar o metabolismo de nitrogênio e crescimento celular e ativar ou reprimir mecanismos transcricionais específicos responsáveis pela assimilação de nitrogênio seletiva. Em presença de glutamina exógena, células de levedura crescem rapidamente e vias metabólicas necessárias para utilização de outras fontes de nitrogênio são reprimidas. Em levedura, tanto fontes de nitrogênio de alta qualidade, como glutamina e amônia, quanto de baixa qualidade (leucina) podem estimular uma rápida ativação da TORC1. Porém, apenas fontes preferenciais de nitrogênio podem manter a atividade de TORC1 e crescimento, através da síntese de glutamina ou sua acumulação (STRACKA et al., 2014).

As enzimas de *S. cerevisiae* TORC1 e TORC2 são responsáveis por ativar o crescimento celular de acordo com a disponibilidade de nutrientes (CRESPO et al., 2002). A TORC1 promove o crescimento celular a partir da regulação de diversos processos, controlando a produção e acumulação de massa celular (LOEWITH; HALL, 2011). Quando a função de TOR é inibida, os genes regulados por nitrogênio, envolvidos na utilização de fontes alternativas de nitrogênio, são afetados. Em condições de limitação de nitrogênio e inibição da atividade TOR, os genes regulados por nitrogênio são expressos. Como já foi mencionado, glutamina é a fonte de

nitrogênio preferencial das células de levedura e estudos anteriores sugerem que a atividade de TOR é sensível à concentração deste aminoácido (CRESPO et al., 2002).

A disponibilidade de leucina também é importante para o controle da atividade da TORC1. Este aminoácido e o metabólito α -cetoleucina, ativam a TORC1 quinase. A conversão de leucina a α -cetoisocaproato é catalisada por aminotransferases conhecidas como BCAT (Branched-chain aminotrasferases). Estudos já mostraram que leveduras mutantes nessas enzimas apresentam atividade da TORC1 comprometida, que pode ser restaurada através da expressão de Bat1 (BCAA aminotransferase mitocondrial). Logo, as BCAT apresentam importância estrutural e catalítica na regulação da TORC1 (KINGSBURY; SEN; CARDENAS, 2015).

Não foi possível quantificar individualmente os aminoácido leucina e glutamina. Sabe-se que a concentração de leucina/isoleucina/valina aumenta com a superexpressão da proteína Pdp3, e que esta cepa possui uma taxa de crescimento maior que a controle. Logo, esse aumento na taxa de crescimento pode estar relacionado com uma maior ativação de TOR causada por um suposto aumento na concentração destes aminoácidos. O aumento na concentração destes aminoácidos pode ser explicada por um aumento na síntese devido a um aumento na concentração de glutamato e glutamina, ou um aumento na absorção destes metabólitos.

Como foi sugerido anteriormente, o aumento na concentração de glutamato e glutamina observado pode estar relacionado com um aumento na taxa de absorção de glutamina, e aumento na expressão ou atividade da enzima GLT1. É razoável supor que um aumento na concentração de glutamina levou a uma maior ativação da TOR, resultando em um aumento na taxa de crescimento. Porém, é necessário realizar outros experimentos para confirmar essas suposições, como por exemplo, dosar a concentração intracelular de leucina e glutamina, ou também, obter informação sobre expressão de enzimas envolvidas no catabolismo de BCAA, como a Bat1.

Na figura abaixo (Figura 20), está representada uma integração das vias de síntese e degradação de glutamato com o Ciclo do Ácido Cítrico, mostrando que as alterações observadas nos níveis intracelular dos metabólitos citados neste trabalho podem estar levando a um aumento na síntese de lipídios e proteínas, característica de células tumorais.

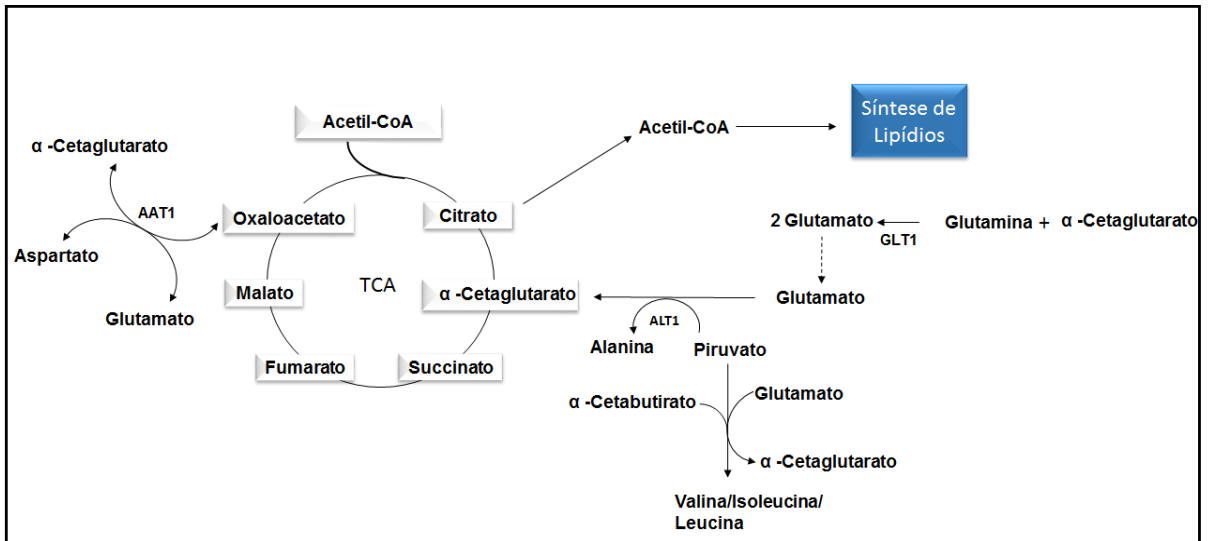


Figura 20: Via de integração do metabolismo de Glutamato, Ciclo do Ácido Cítrico e síntese de Lipídios.

6 Considerações Finais

Após análise dos resultados obtidos pelo trabalho, foi possível concluir primeiramente que a superexpressão da proteína de levedura Pdp3 resultou em uma alteração metabólica, visto que alguns metabólitos apresentaram alterações estatisticamente significativas em suas concentrações intracelulares. O objetivo do trabalho foi tentar correlacionar as alterações nas vias metabólicas em que estes metabólitos estão envolvidos com o metabolismo característico de células tumorais e o fenômeno de repressão catabólica.

A partir das alterações nas concentrações intracelulares do glicerol, trealose, histidina e succinato não foi possível estabelecer uma relação direta entre o efeito da superexpressão da Pdp3 com o metabolismo de células tumorais. Seriam necessárias informações adicionais para um melhor entendimento de quais vias metabólicas foram afetadas para se obter alguma conclusão. No caso da trealose, essa relação fica ainda mais difícil de ser estabelecida pois a sua via síntese não está presente em células de mamíferos.

A diminuição na concentração intracelular do GABA pode estar relacionada com o fato de a cepa Pdp3+ apresentar uma menor tolerância ao estresse oxidativo que sua controle, visto que o fluxo através da via do GABA confere resistência a este tipo de estresse. Logo, acredita-se que esta diminuição observada seja causada pela diminuição de expressão ou atividade da enzima Gad1p.

A diminuição dos níveis de colina está de acordo com a hipótese de que, assim como células tumorais, a cepa Pdp3+ apresentaria um aumento na síntese de lipídios necessário para produção de membrana celular. Esta diminuição pode estar relacionada com um aumento na expressão da enzima colina quinase, observado também em células tumorais, que resultaria em um aumento na produção de fosfatidilcolina.

Pode-se concluir que a cepa de estudo apresenta alterações metabólicas características de células tumorais como o aumento na concentração de glutamato/glutamina, alanina e dos aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA) valina, isoleucina e leucina, sendo glutamato e alanina uma das principais marcas metabólicas da doença. A partir desses resultados, conclui-se que a superexpressão da proteína Pdp3 levou a célula a acumular glutamato/glutamina, precursores de moléculas necessárias para a síntese de proteínas e lipídios. Acredita-se que houve

um aumento na via da glutaminólise, assim como observado em células tumorais, que estaria contribuindo para a produção de precursores da síntese de lipídios.

A diminuição na concentração de arginina é mais uma evidência de que a cepa Pdp3+ apresenta características de células tumorais, já que estudos sobre a doença mostram uma grande dependência dessas células por esse aminoácido, o que levaria um aumento no seu consumo, e uma deficiência da enzima argininosuccinato 1, prejudicando sua síntese.

Os mesmos experimentos deste trabalho já foram realizados em células de *S. cerevisiae* superexpressando o oncogene NSD3c. Foi observado que a alteração de fenótipo causada pela superexpressão da proteína Pdp3 é semelhante a alteração observada ao superexpressar a NSD3c, principalmente em relação a alteração na concentração de glutamato, glutamina, alanina, leucina/isoleucina/valina e arginina.

Para confirmação das hipóteses levantadas neste trabalho, é necessário experimentos adicionais, principalmente de expressão de proteínas como, por exemplo, proteômica e PCR quantitativo. Muitas informações obtidas neste trabalho podem ser utilizadas para o desenvolvimento de novas pesquisas para um melhor entendimento do efeito da superexpressão da proteína Pdp3 e futuramente, da NSD3c, possibilitando a investigação de novos tratamentos mais eficazes para o câncer de mama.

7 Conclusão

A partir dos espectros 1D ^1H RMN 2D, [^1H - ^1H] TOCSY e 2D [^1H - ^{13}C] HSQC obtidos para cada cepa estudada, foi possível a identificação e quantificação de forma não ambígua de metabólitos que apresentaram alteração em sua concentração intracelular com a superexpressão da proteína Pdp3, mostrando que houve uma alteração do perfil metabólico.

Através das análises das vias metabólicas que seriam possivelmente alteradas, conclui-se que a cepa Pdp3+ apresenta características semelhantes a células tumorais.

8 Referências

- ACKERSTAFF, E.; GLUNDE, K.; BHUJWALLA, Z. M. Choline phospholipid metabolism: A target in cancer cells? **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 90, n. 3, p. 525–533, 2003.
- AIROLDI, C. et al. NMR analysis of budding yeast metabolomics: a rapid method for sample preparation. **Mol. BioSyst.**, v. 11, n. 2, p. 379–383, 2015.
- AL-WADEI, H. A. N.; ULLAH, M. F.; AL-WADEI, M. GABA (γ -aminobutyric acid), a non-protein amino acid counters the β -adrenergic cascade-activated oncogenic signaling in pancreatic cancer: A review of experimental evidence. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 55, n. 12, p. 1745–1758, 2011.
- ALBERS, M. J. et al. Hyperpolarized ^{13}C Lactate, Pyruvate, and Alanine: Noninvasive Biomarkers for Prostate Cancer Detection and Grading. **Cancer Research**, v. 68, n. 20, p. 8607–8615, 15 out. 2008.
- ALBERT, M.; HELIN, K. Histone methyltransferases in cancer. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 21, n. 2, p. 209–220, 2010.
- ALIFANO, P. et al. Histidine biosynthetic pathway and genes: structure, regulation, and evolution. **Microbiological reviews**, v. 60, n. 1, p. 44–69, 1996.
- BACH, B. et al. New insights into γ -aminobutyric acid catabolism: Evidence for γ -hydroxybutyric acid and polyhydroxybutyrate synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 13, p. 4231–4239, 2009.
- BJORNSTI, M. A. Cancer therapeutics in yeast. **Cancer Cell**, v. 2, n. 4, p. 267–273, 2002.
- BOWMAN, G. D.; POIRIER, M. G. Post-Translational Modifications of Histones That Influence Nucleosome Dynamics. **Chemical Reviews**, v. 115, p. 2274–2295, 2015.
- CAO, J. et al. GABA shunt mediates thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae* by reducing reactive oxygen production. **Yeast**, v. 30, n. 4, p. 129–144, abr. 2013.
- CARLSON, M. Glucose repression in yeast. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 202–207, 1999.

CHEN, L.; CUI, H. Targeting glutamine induces apoptosis: A cancer therapy approach. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 9, p. 22830–22855, 2015.

COLEMAN, S. T. et al. Expression of a glutamate decarboxylase homologue is required for normal oxidative stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 1, p. 244–250, 2001.

COLLER, H. A. Is cancer a metabolic disease? **American Journal of Pathology**, v. 184, n. 1, p. 4–17, 2014.

CRESPO, J. L. et al. The TOR-controlled transcription activators GLN3, RTG1, and RTG3 are regulated in response to intracellular levels of glutamine. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 99, n. 10, p. 6784–6789, 2002.

DEBERARDINIS, R. J. et al. Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 18, n. 1, p. 54–61, 2008.

DEBERARDINIS, R. J.; CHENG, T. Q's next: The diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. **Oncogene**, v. 29, n. 3, p. 313–324, 2010.

DELAGE, B. et al. Arginine deprivation and argininosuccinate synthetase expression in the treatment of cancer. **International Journal of Cancer**, v. 126, n. 12, p. 2762–2772, 2010.

DIAZ-RUIZ, R.; RIGOLET, M.; DEVIN, A. The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1807, n. 6, p. 568–576, 2011.

DONGMEI, G. et al. The therapy of gefitinib towards breast cancer partially through reversing breast cancer biomarker arginine. **African Health Sciences**, v. 15, n. 2, p. 594–597, 2015.

DUBUIS, S. et al. Metabotypes of breast cancer cell lines revealed by non-targeted metabolomics. **Metabolic Engineering**, 2016.

DURÁN, R. V. et al. Glutaminolysis Activates Rag-mTORC1 Signaling. **Molecular Cell**, v. 47, n. 3, p. 349–358, 2012.

ELEUTHERIO, E. et al. Revisiting yeast trehalose metabolism. **Current Genetics**, v. 61, n. 3, p. 263–274, 2014.

EUCEDA, L. R.; GISKEØDEGÅRD, G. F.; BATHEN, T. F. Preprocessing of NMR metabolomics data. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 75, n. 3, p. 193–203, 2015.

FAN, T. W. M.; LANE, A. N. NMR-based stable isotope resolved metabolomics in systems biochemistry. **Journal of Biomolecular NMR**, v. 49, n. 3–4, p. 267–280, 2011.

GARRE, E. et al. Acid trehalase is involved in intracellular trehalose mobilization during postdiauxic growth and severe saline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 9, n. 1, p. 52–62, 2009.

GE, Y. Z. et al. Chromatin targeting of de novo DNA methyltransferases by the PWWP domain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 24, p. 25447–25454, 2004.

GILBERT, T. M. et al. A PWWP Domain-Containing Protein Targets the NuA3 Acetyltransferase Complex via Histone H3 Lysine 36 trimethylation to Coordinate Transcriptional Elongation at Coding Regions. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 13, n. 11, p. 2883–2895, 2014.

GLUNDE, K. et al. Choline metabolism-based molecular diagnosis of cancer: an update. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 15, n. 6, p. 735–747, 28 abr. 2015.

HIMMS-HAGEN, J. Glycerol metabolism in yeast. **Canadian journal of biochemistry**, v. 46, p. 1107–14, 1968.

HOCHER, B.; ADAMSKI, J. Metabolomics for clinical use and research in chronic kidney disease. **Nature Reviews Nephrology**, 2017.

HOFMAN-BANG, J. Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 35–73, 1999.

HUNG, Y. L. et al. The First Residue of the PWWP Motif Modulates HATH Domain Binding, Stability, and Protein-Protein Interaction. **Biochemistry**, v. 54, n. 26, p. 4063–4074, 2015.

INSTITUTO NACIONAL DE CANCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2016 Incidência do Câncer no Brasil. **Ministério da Saúde Instituto Nacional de Cancer José Alencar Gomes da Silva**, 2016.

JAUNIAUX, J. C.; URRESTARAZU, L. A.; WIAME, J. M. Arginine metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: subcellular localization of the enzymes. **J Bacteriol**, v. 133, n. 3, p. 1096–1107, 1978.

JIANG, S.; YAN, W. Succinate in the cancer–immune cycle. **Cancer Letters**, v. 390, p. 45–47, 2017.

JOHNSON, C. H.; IVANISEVIC, J.; SIUZDAK, G. Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 17, n. 7, p. 451–459, 2016.

KINGSBURY, J. M.; SEN, N. D.; CARDENAS, M. E. Branched-Chain Aminotransferases Control TORC1 Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS Genetics**, v. 11, n. 12, p. 1–24, 2015.

KULIS-HORN, R. K.; PERSICKE, M.; KALINOWSKI, J. Histidine biosynthesis, its regulation and biotechnological application in *Corynebacterium glutamicum*. **Microbial Biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 5–25, 2014.

KUNZE, M. et al. A central role for the peroxisomal membrane in glyoxylate cycle function. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1763, n. 12, p. 1441–1452, dez. 2006.

LE, A. et al. Glucose-independent glutamine metabolism via TCA cycling for proliferation and survival in b cells. **Cell Metabolism**, v. 15, n. 1, p. 110–121, 2012.

LEE, Y. J. et al. TCA cycle-independent acetate metabolism via the glyoxylate cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 28, p. 153–166, fev. 2011.

LI, C. et al. Magnetic Resonance Spectroscopy As a Tool for Assessing Macromolecular Structure and Function in Living Cells. n. March, p. 1–26, 2017.

LIBERTI, M. V et al. The Warburg Effect : How Does it Benefit Cancer Cells ? v. 41, n. 3, p. 211–218, 2017.

LIU, L. et al. Genetic alterations of histone lysine methyltransferases and their significance in breast cancer. **Oncotarget**, v. 6, n. 4, p. 2466–82, 2015.

LIU, X.; LOCASALE, J. W. Metabolomics: A Primer. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 42, n. 4, p. 274–284, abr. 2017.

LJUNGDAHL, P. O.; DAIGNAN-FORNIER, B. Regulation of amino acid, nucleotide, and phosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 190, n. 3, p. 885–929, 2012.

LOEWITH, R.; HALL, M. N. Target of rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control. **Genetics**, v. 189, n. 4, p. 1177–1201, 2011.

MAHROUS, E. A.; FARAG, M. A. Two dimensional NMR spectroscopic approaches for exploring plant metabolome: A review. **Journal of Advanced Research**, v. 6, n. 1, p. 3–15, 2015.

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, 2012.

MCCAMMON, M. T. Global Transcription Analysis of Krebs Tricarboxylic Acid Cycle Mutants Reveals an Alternating Pattern of Gene Expression and Effects on Hypoxic and Oxidative Genes. **Molecular Biology of the Cell**, v. 14, n. 3, p. 958–972, 1 mar. 2003.

MEDINA, M. Á. et al. Histamine, polyamines, and cancer. **Biochemical Pharmacology**, v. 57, n. 12, p. 1341–1344, 1999.

MEDINA, V. A.; RIVERA, E. S. Histamine receptors and cancer pharmacology. **British Journal of Pharmacology**, v. 161, n. 4, p. 755–767, 2010.

MORI, N. et al. The Tumor Microenvironment Modulates Choline and Lipid Metabolism. **Frontiers in Oncology**, v. 6, n. December, 2016.

MORISHITA, M. et al. In vitro histone lysine methylation by NSD1, NSD2/MMSET/WHSC1 and NSD3/WHSC1L. **BMC Structural Biology**, v. 14, n. 1, p. 25, 2014.

MORISHITA, M.; DI LUCCIO, E. Cancers and the NSD family of histone lysine methyltransferases. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1816, n. 2, p. 158–163, 2011.

MÜLLEDER, M. et al. Functional Metabolomics Describes the Yeast Biosynthetic Regulome. **Cell**, v. 167, n. 2, p. 553–565.e12, 2016.

NAGANA GOWDA, G. A.; RAFTERY, D. Can NMR solve some significant challenges in metabolomics? **Journal of Magnetic Resonance**, v. 260, p. 144–160, nov. 2015.

NATTER, K.; KOHLWEIN, S. D. Yeast and cancer cells - Common principles in lipid metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1831, n. 2, p. 314–326, 2013.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 5^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

NEVOIGT, E.; STAHL, U. Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 21, n. 3, p. 231–241, 1997.

PETITJEAN, M. et al. Yeast tolerance to various stresses relies on the trehalose-6P synthase (Tps1) protein, not on trehalose. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 26, p. 16177–16190, 2015.

QIN, S.; MIN, J. Structure and function of the nucleosome-binding PWWP domain. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 39, n. 11, p. 536–547, 2014.

QIU, F. et al. Arginine Starvation Impairs Mitochondrial Respiratory Function in ASS1-Deficient Breast Cancer Cells. **Science Signaling**, v. 7, n. 319, p. ra31-ra31, 1 abr. 2014.

RINGNÉR, M. What is principal component analysis? **Nat Biotechnol**, v. 26, n. 3, p. 303–304, 2008.

RONA, G. B. et al. The PWWP domain of the human oncogene WHSC1L1/NSD3 induces a metabolic shift toward fermentation. **Oncotarget**, 2016.

RONA, G. B.; ELEUTHERIO, E. C. A.; PINHEIRO, A. S. PWWP domains and their modes of sensing DNA and histone methylated lysines. **Biophysical Reviews**, v. 8, n. 1, p. 63–74, 2016.

Saccharomyces Genome Database. Disponível em: <<http://www.yeastgenome.org/>>. Acesso em: 18 maio. 2017.

SAJNANIA, K. et al. Genetic alterations in Krebs cycle and its impact on cancer pathogenesis. **Biochimie**, v. 135, p. 164–172, 2017.

SHEN, C. et al. NSD3-Short Is an Adaptor Protein that Couples BRD4 to the CHD8 Chromatin Remodeler. **Molecular Cell**, v. 60, n. 6, p. 847–859, 2015.

SIEG, A. G.; TROTTER, P. J. Differential contribution of the proline and glutamine pathways to glutamate biosynthesis and nitrogen assimilation in yeast lacking glutamate dehydrogenase. **Microbiological Research**, v. 169, n. 9–10, p. 709–716, set. 2014.

SONG, L. et al. γ -Aminobutyric acid inhibits the proliferation and increases oxaliplatin sensitivity in human colon cancer cells. **Tumor Biology**, v. 37, n. 11, p. 14885–14894, 2016.

SPANNHOFF, A.; SIPPL, W.; JUNG, M. Cancer treatment of the future: Inhibitors of histone methyltransferases. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 41, p. 4–11, 2009.

STEWART, J. D. et al. Choline-releasing glycerophosphodiesterase EDI3 drives tumor cell migration and metastasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 21, p. 8155–8160, 2012.

STRACKA, D. et al. Nitrogen source activates TOR (Target of Rapamycin) complex 1 via glutamine and independently of Gtr/Rag proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 36, p. 25010–25020, 2014.

TESSEM, M. et al. Evaluation of lactate and alanine as metabolic biomarkers of prostate cancer using ^1H HR-MAS spectroscopy of biopsy tissues. **Magnetic Resonance in Medicine**, v. 60, n. 3, p. 510–516, set. 2008.

TOSATO, V. et al. Warburg effect and translocation-induced genomic instability: two yeast models for cancer cells. **Frontiers in oncology**, v. 2, n. January, p. 212, 2012.

TRAN, Q. et al. Targeting cancer metabolism - revisiting the Warburg effects. **Toxicological Research**, v. 32, n. 3, p. 177–193, 2016.

TRIBA, M. N. et al. PLS / OPLS models in metabolomics : the impact of permutation of dataset rows on the K-fold cross-validation quality parameters. **Molecular BioSystems**, v. 11, p. 13–19, 2015.

TURCOTTE, B. et al. Transcriptional regulation of nonfermentable carbon utilization in budding yeast. **FEMS Yeast Research**, v. 10, n. 1, p. 2–13, 2010.

UPADHYAY, M. et al. The Warburg effect: Insights from the past decade. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 137, n. 3, p. 318–330, 2013.

WANG, Y.; HU, J. p53 and the PWWP Domain Containing Effector Proteins in Chromatin Damage Repair. **Cell & Developmental Biology**, v. 2, n. 1, p. 2166–2171, 2013.

WARBURG, O. On the Origin of Cancer Cells On the Origin of Cancer. **Science, New Series**, v. 123, p. 309–314, 1956.

WHEATLEY, D. N. Arginine deprivation and metabolomics: Important aspects of intermediary metabolism in relation to the differential sensitivity of normal and tumour cells. **Seminars in Cancer Biology**, v. 15, n. 4, p. 247–253, 2005.

XIA, J.; WISHART, D. S. Web-based inference of biological patterns , functions and pathways from metabolomic data using MetaboAnalyst. **Nature Protocols**, v. 6, n. 6, p. 743–760, 2011.

XIA, J.; WISHART, D. S. Using MetaboAnalyst 3.0 for Comprehensive Metabolomics Data Analysis. **Current Protocols in Bioinformatics**, p. 14.10.1-14.10.91, 2016.

YANG, L.; VENNETI, S.; NAGRATH, D. Glutaminolysis: A Hallmark of Cancer Metabolism. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 19, n. 1, p. annurev-bioeng-071516-044546, 2017.

YANG, Z. Q. et al. Transforming properties of 8p11-12 amplified genes in human breast cancer. **Cancer Research**, v. 70, n. 21, p. 8487–8497, 2010.

YUN, J. et al. Interactions between epigenetics and metabolism in cancers. **Frontiers in Oncology**, v. 2, n. November, p. 1–10, 2012.

ZHANG, L.; HAN, J. Branched-chain amino acid transaminase 1 (BCAT1) promotes the growth of breast cancer cells through improving mTOR-mediated mitochondrial biogenesis and function. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 486, n. 2, p. 224–231, 2017.

ZHOU, Z. et al. The NSD3L histone methyltransferase regulates cell cycle and cell invasion in breast cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 398, n. 3, p. 565–570, 2010.

