

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Ana Claudia Galvão Freire



**PAPEL DE FOSFATASES NA VIABILIDADE DE CÉLULAS
DA LEUCEMIA MIELÓIDE HUMANA TRATADAS COM
DITERPENÓ LACTONA**

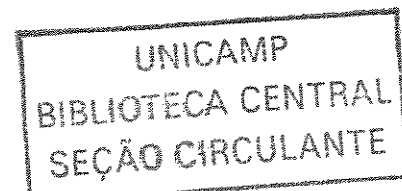
Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Ana Claudia Galvão Freire
Freire
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Biologia Funcional e
Molecular na área de Bioquímica.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Carmen Veríssima Ferreira

Co-Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Nora Marcela Haun Quirós

2002



64401/02

UNIDADE BC
Nº CHAMADA TI-1102110
F883p
V _____ EX _____
TOMBO BC/ S3019
PROC 16-124/03
C _____ D X
PREÇO R\$ 11,00
DATA 08/04/03
Nº CPD _____

CM00181000-4

08/04/03 F883p

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

F883p

Freire, Ana Claudia Galvão

Papel de fosfatases na viabilidade de células da leucemia mielóide humana tratadas com diterpeno lactona/Ana Claudia Galvão Freire. -- Campinas, SP: [s.n.], 2002.

Orientadora: Carmen Veríssima Ferreira

Co-Orientadora: Nora Marcela Haun Quirós

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas . Instituto de Biologia.

1.Fosfatases. 2.Leucemia. 3.Citotoxicidade. 4.Apoptoses.
I.Ferreira, Carmen Veríssima. II.Quirós, Nora Marcela Haun. III..
Universidade Estadual de Campinas.Instituto de Biologia.
IV.Título.

Data da Defesa: 06 / 12 / 2002.

BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

Profa. Dra. Carmen Veríssima Ferreira (Orientadora)
UNICAMP - Instituto de Biologia - Dep. Bioquímica

Assinatura

Prof. Dr. Néelson Eduardo Durán Caballero
UNICAMP - Instituto de Química - Dep. Química

Assinatura

Prof. Dr. Stephen Hyslop
UNICAMP/ FCM - Dep. de Farmacologia

Assinatura

Prof. Dr. José Camillo Novello
UNICAMP - Instituto de Biologia - Dep. Bioquímica

Assinatura

Prof. Dr. Éspér George Kallás
UNIFESP/EPM – Laboratório de Doenças Infecciosas e
Parasitárias (DIPA)

Assinatura

SUPLENTE:

Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo
UNICAMP - Instituto de Biologia - Dep. Bioquímica

Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Marangoni
UNICAMP - Instituto de Biologia - Dep. Bioquímica

Assinatura

Data da Defesa: 06 / 12 / 2002.

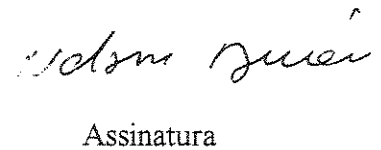
BANCA EXAMINADORA:

Profª. Dra. Carmen Veríssima Ferreira (Orientadora)
UNICAMP - Instituto de Biologia - Dep. Bioquímica



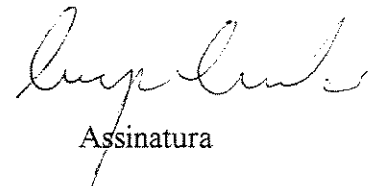
Assinatura

Prof. Dr. Néelson Eduardo Durán Caballero
UNICAMP - Instituto de Química - Dep. Química



Assinatura

Prof. Dr. Esper Georges Kallás
UNIFESP/EPM – Laboratório de Imunologia



Assinatura

Prof. Dr. José Camillo Novello
UNICAMP - Instituto de Biologia - Dep. Bioquímica



Assinatura

Prof. Dr. Stephen Hyslop
UNICAMP – Depto de Farmacologia - FCM



Assinatura

Profª. Dra. Denise Vaz de Macedo
UNICAMP - Instituto de Biologia - Dep. Bioquímica

Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Marangoni
UNICAMP - Instituto de Biologia - Dep. Bioquímica

Assinatura

Dedico este trabalho

À Carmen, dedico a você este trabalho, por ser mais do que uma orientadora, minha referência profissional. Admiro você, além de tudo, por sua eficiência, dedicação ao trabalho e paciência em ensinar. Agradeço por acreditar na minha capacidade e pela confiança depositada durante esses anos de convivência. Qualquer agradecimento a você seria insuficiente e, neste caso, OBRIGADA POR TUDO!

À minha mãe e Dilermando, exemplos de integridade e força, que me apoiaram nos momentos mais difíceis e sempre torceram por mim. Agradeço por tudo o que me ensinaram para que eu me tornasse a pessoa que sou hoje. Divido com vocês mais esta vitória! Ao meu irmão Nelson Henrique, pelo imenso carinho e incentivo. Ao meu namorado Gedeão, por todo amor e compreensão, estando sempre ao meu lado.

Ao meu pai e à Soraya, pelo apoio e afeto ao longo desta caminhada, sempre acreditando no meu trabalho. Às minhas irmãs Ana Elisa, Bruna, Luísa e Sofia, por todo carinho. Agradeço especialmente à Bruna, pela sua amizade e confiança.

AGRADECIMENTOS

A Deus, minha luz e força!!!

A toda minha família, que sempre acreditou na minha vontade de vencer, torcendo sempre pelo meu sucesso.

Ao Prof. Dr. Hiroshi Aoyama, por seus valiosos ensinamentos, tanto no âmbito profissional como no pessoal, que contribuíram para o meu desenvolvimento.

Aos professores membros da banca de qualificação (Dra. Lúcia Pereira da Silva, Dra. Nilce Correa Meirelles e Dr. Sérgio Marangoni), pelas críticas e sugestões que muito enriqueceram o meu trabalho.

Aos professores membros da banca de Defesa de Tese (Dr. Néelson Eduardo Durán Caballero, Dr. Stephen Hyslop, Dr. José Camillo Novello e Dr. Éspér George Kallás, pelas considerações valiosas junto à versão final do meu trabalho.

À professora Dra. Marcela Haun, pela atenção e por disponibilizar o seu laboratório para a realização dos experimentos de cultura de células.

Ao professor Dr. Rui Curi e Valdemir Colleone da Universidade de São Paulo (USP) pelo fornecimento das células HL60.

Ao professor Dr. Éspér George Kallás e à mestranda Mariana Mellilo Sauer do Laboratório de Imunologia da UNIFESP/EPM, pelos experimentos de citometria de fluxo.

A Neto (Laboratório de Cultura de Células e Biofármacos) por sua disponibilidade em ajudar.

A Daniel Favari, por sua atenção e por realizar a estatística do meu trabalho.

À Dra. Patrícia da Silva Melo, por ter me ensinado a trabalhar com cultura de células.

À FAPESP, pelo suporte financeiro, concessão de bolsa e assessoria científica.

À Andréia e a Marina, secretárias do Departamento de Bioquímica, pelo carinho e por serem extremamente atenciosas sempre que precisei.

A todos os docentes, funcionários e pós-graduandos do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da UNICAMP que, de alguma forma, colaboraram para a realização deste trabalho.

A todos do laboratório de Enzimologia, pelo carinho, amizade e pela convivência agradável durante essa jornada.

À Telma, por compartilhar comigo toda essa jornada (nada fácil!), participando nos momentos alegres e também nas dificuldades. Obrigada por sua amizade e por fazer parte da minha vida há tantos anos, com todo o meu carinho.

À Marilena, que foi uma pessoa que muito contribuiu para que meus dias em Campinas fossem mais agradáveis e felizes. Aprendi durante este tempo, que existem coisas que nem o tempo podem apagar. O carinho e o respeito que tenho por você serão eternos!

À Karina, pelo constante incentivo e ajuda e por ser uma pessoa em que posso confiar e que gosto muito.

À Cris, uma pessoa que mostrou que uma amizade é construída por atitudes e não com palavras vazias, se mostrando verdadeiramente amiga nos momentos mais difíceis. Nunca poupando esforços para me ajudar! Os meus sinceros agradecimentos!!!

À Paty, uma pessoa muito especial, que me conquistou por sua bondade e simplicidade.

A Márcio, pelo auxílio nas prestações de contas para a FAPESP.

A Andre Okamoto, por ser sempre muito prestativo e atencioso comigo.

A Alexandre, pelo convívio agradável e por ter me ajudado em algumas dúvidas.

À Erika, pelo apoio e por colaborar com o meu trabalho.

Aos meus grandes amigos Caio, Genilson e Ney, que sempre estiveram ao meu lado, torcendo por mim.

Às minhas amigas de Natal, que sempre se mantiveram presentes na minha vida.

À Sandra Rezende e Nilsen por todo apoio e incentivo, tão importantes para a minha formação.

ÍNDICE

| | |
|---|-----|
| LISTA DE ABREVIATURAS | xi |
| RESUMO | xiv |
| ABSTRACT | xv |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1. Linhagem celular da leucemia mielóide humana (HL60) | 1 |
| 1.2. Indutores de diferenciação | 2 |
| 1.3. Estudos de Citotoxicidade | 3 |
| 1.4. Fosfatases | 5 |
| 1.4.1. Características Gerais | 5 |
| 1.4.2. Proteínas Fosfatases | 5 |
| 1.4.2.1. Proteínas Tirosina Fosfatases | 7 |
| 1.4.2.2. Proteínas Serina/Treonina Fosfatases | 9 |
| 1.5. Proteínas fosfatases presentes em células HL60 | 12 |
| 1.6. Fosfatases utilizadas como biomarcadores celulares | 12 |
| 1.7. Morte Celular | 13 |
| 1.8. Características gerais dos compostos utilizados neste trabalho | 18 |
| 1.8.1 Vanadato e Pervanadato | 18 |
| 1.8.2. Ácido Okadáico | 19 |
| 1.8.3. Desidrocrotonina | 20 |
| 2. OBJETIVOS | 23 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS DA CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DA FOSFATASE TOTAL DAS CÉLULAS HL60 | 24 |
| 3.1. Materiais | 24 |
| 3.2. Métodos | 24 |
| 3.2.1. Obtenção da enzima total | 24 |
| 3.2.2. Obtenção da enzima (fração citoplasmática e de membrana) | 25 |
| 3.2.3. Dosagem da atividade fosfatásica | 25 |

| | |
|--|----|
| 4. RESULTADOS DA CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DA FOSFATASE TOTAL DAS CÉLULAS HL60 | 26 |
| 5. DISCUSSÃO GERAL | 60 |
| 6. CONCLUSÕES | 67 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 68 |

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Diagrama esquemático mostrando as vias envolvidas na apoptose em resposta a um sinal apoptótico ou de proliferação/sobrevivência 15

Figura 2 – Efeito de diferentes concentrações da Desidrocrotonina (A) e da Metilprednisolona (B) na atividade fosfatásica da fração citoplasmática e de membrana das células HL60 31

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Estudos Cinéticos da Fosfatase das células HL60 29

Tabela 2 – Efeito de compostos na viabilidade das células HL60 60

Tabela 3 – Efeito de compostos na indução da diferenciação das células HL60 66

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|------------------------|---|
| Apaf1 | Fator de indução da apoptose |
| BAD | Promotor de morte associado ao Bcl-2 |
| BAG | Antagonene 1 associado a Bcl-2 |
| BAX | Proteína X associada a Bcl-2 |
| Bcl-2 | Proteína de células B (Linfoma tipo 2) |
| BMr | Baixa massa molecular relativa |
| CD45 | Antígeno comum de leucócito |
| Cdc25 | Controle da divisão celular (Proteína tirosina fosfatase dual) |
| DMF | Dimetilformamida |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DPA | Difenilamina |
| DTNB | Ácido 5,5 ditio-bis (2-nitrobenzóico) |
| DTT | Ditiotreitol |
| EROs | Espécies reativas de oxigênio |
| FADD | Domínio de morte associado ao Fas |
| FasL | Fas ligante |
| GSH | Glutathiona reduzida |
| HL60 | Células da leucemia promielocítica humana |
| IC₅₀ | Concentração que inibe 50% da atividade enzimática ou viabilidade celular |
| IκB | Proteína inibidora do fator NFκB |
| MAPK(s) | Proteína(s) quinase(s) ativada(s) por mitógeno(s) |

| | |
|----------------------|---|
| MTT | Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio) |
| NAC | Conteúdo de ácidos nucleicos |
| NBT | Nitroblue tetrazolium |
| NFAT | Fator de transcrição nuclear de células T ativadas |
| NFκB | Fator nuclear Kappa B |
| NOS | Óxido nítrico sintase |
| NTB | Tionitrobenzóico |
| OKA | Ácido okadáico |
| PARP | Polimerase poli-ADP ribose |
| PBS | Solução salina tamponada com fosfato |
| pCMB | p-cloromercuribenzoato |
| Perv | Pervanadato |
| PI | Iodeto de propídio |
| Pi | Fosfato inorgânico |
| pNP | p-nitrofenol |
| pNPP | p-nitrofenilfosfato |
| pRb | Proteína retinoblastoma |
| PSer | Fosfoserina |
| PThr | Fosfotreonina |
| PTP(s) | Proteína(s) tirosina fosfatase(s) |
| PTyr | Fosfotirosina |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute (Culture Medium) |
| <i>t</i>-DCTN | Trans-desidrocrotonina |

| | |
|--------------|---|
| TNF | Fator de necrose tumoral |
| TPA | 12- <i>o</i> -tetradecanoilforbol 13-acetato |
| TRADD | Domínio de morte associado ao receptor do TNF |

RESUMO

A linhagem celular da leucemia promielocítica humana (HL60) foi estabelecida a partir do sangue periférico de uma paciente com leucemia promielocítica aguda. Essa cultura prolifera continuamente em suspensão, consiste predominantemente de promielócitos e tem sido utilizada como alvo para o estudo do efeito citotóxico de drogas, diferenciação e morte celular. Neste trabalho foi avaliada a citotoxicidade de inibidores de proteínas fosfatases (ácido okadáico e pervanadato) e da desidrocrotónina (*t*-DCTN) através dos seguintes parâmetros de viabilidade, após 24h de tratamento: redução do MTT (integridade mitocondrial), dosagem do teor de proteínas (indicação do número de células) e atividade fosfatásica (metabolismo celular). Os dois inibidores de proteínas fosfatases apresentaram efeito citotóxico sobre as células HL60. Em relação à função mitocondrial e atividade fosfatásica, as células apresentaram somente 20% de viabilidade em presença do ácido okadáico (100 nM) e pervanadato (200 μ M). Para a *t*-DCTN foram obtidos os seguintes valores de IC₅₀: 500 e 300 μ M para o teor de proteína e redução do MTT, respectivamente. Outro aspecto abordado foi a relação entre o estado redox celular com uma possível indução da diferenciação e morte celular. Para este propósito foram determinados: redução do NBT, fragmentação do DNA, perda da assimetria da membrana plasmática e conteúdo total de GSH. A *t*-DCTN apresentou uma baixa capacidade de indução de diferenciação (20%). No entanto, na presença dos inibidores de proteínas fosfatases este efeito foi observado. A apoptose foi induzida na presença do ácido okadáico (34%) e este efeito foi aumentado em combinação com a *t*-DCTN (65,28%). De acordo com os resultados obtidos, sugere-se a importância da modulação química das proteínas fosfatases em diversos processos celulares, uma vez que os efeitos citotóxicos apresentados por estes compostos podem ser explicados pela alteração do estado redox celular e/ou efeito direto (formação de adutos) sobre estas enzimas ou outras macromoléculas.

ABSTRACT

Human promyelocytic leukemia cell line (HL60) was isolated from the peripheral blood of a patient with acute myeloid leukemia. This culture proliferates continuously in suspension and predominantly consists of promyelocytes and has been used as tool for cytotoxic studies of drugs, differentiation and cell death. In this work was evaluated the cytotoxicity of protein phosphatases inhibitors (okadaic acid and pervanadate) and dehydrocrotonin (*t*-DCTN) through following viability parameters, after 24h of the cells treatment: MTT reduction (mitochondrial integrity), protein determination (cell number indication) and fosfatase activity (cell metabolism). Both inhibitors presented cytotoxic effect on HL60 cells. In relation to mitochondrial function and phosphatase activity, these cells presented only 20% of viability in presence of okadaic acid (100 nM) and pervanadate (200 μ M). For *t*-DCTN were obtained the following IC₅₀ values: 500 and 300 μ M for protein content and MTT reduction, respectively. Other approached aspect was the relation to cellular redox state with a possible differentiation and cell death induction. For this purpose were determined: NBT reduction, DNA fragmentation, the loss of plasma membrane asymmetry and total GSH. *t*-DCTN presented low capacity of differentiation induction (20%). However, in the presence of protein phosphatase inhibitors this effect was not observed. Apoptosis was induced when the cells were treated with okadaic acid (34%) and plus *t*-DCTN this effect was increased (65,28%). According to the results obtained, we can suggest the importance of chemical modulation of protein phosphatases in several cellular processes, since cytotoxic effects presented by these compounds could be explained by redox state changing and/or direct effect (adducts formation) on these enzymes or other macromolecules.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Linhagem celular da leucemia mielóide humana (HL60)

A leucemogênese é um fenômeno complexo que é caracterizado pelo desacoplamento anômalo da proliferação e diferenciação, que resulta no bloqueio da maturação celular e expansão leucêmica clonal (Uzunoglu *et al*, 1999).

Leucemia mielóide aguda é caracterizada por uma expressiva insuficiência medular, responsável por parada da maturação celular numa fase em que a célula granulocítica ainda está indiferenciada (blasto) e, portanto, incapaz de exercer suas funções. As leucemias mielóides agudas podem ser classificadas em subtipos de acordo com o tipo celular predominante (Lorenzi, 1999).

A linhagem celular da leucemia promielocítica humana (HL60) foi estabelecida a partir do sangue periférico de uma paciente com leucemia promielocítica aguda, prolifera continuamente em suspensão e consiste predominantemente de promielócitos (Newburger *et al*, 1979; Breitman, 1990). Porém, 4-5 % das células HL60 mostram características morfológicas de células mielóides mais maduras, como mielócitos, metamielócitos, bastões e leucócitos polimorfonucleares (Newburger *et al*, 1979).

As células HL60 não apresentam o gene que codifica a proteína p53 (responsável pelo reparo do DNA ou indução da apoptose), e expressam em grande quantidade as proteínas bcl-2 e c-myc (antiapoptóticas), as quais contribuem para a carcinogênese (“imortalidade” celular) - (Blagosklonny *et al*, 1996; Wall *et al*, 1999). A proteína bcl-2 é normalmente expressa na medula óssea e em células blásticas leucêmicas, entretanto, seus níveis diminuem dramaticamente durante a diferenciação induzida por ésteres de forbol. A

expressão da proteína c-myc está correlacionada com o estado proliferativo das células HL60 (Blagosklonny *et al*, 1996).

1.2. Indutores de diferenciação

As células HL60 representam um sistema experimental para o estudo *in vitro* da diferenciação, bem como alvo do estudo de possíveis drogas que poderão ser utilizadas no tratamento e prevenção dos diferentes tipos de leucemias (Sokoloski and Sartorelli, 1997; Uzunoglu *et al*, 1999).

A diferenciação das células HL60 em granulócitos maduros ocorre por exposição a uma grande variedade de compostos, incluindo dimetilsulfóxido (DMSO), actinomicina D, hipoxantina, dimetilformamida (DMF), ácido retinóico e metilprednisolona (Collins *et al*, 1978). Por outro lado, compostos como o 12-*o*-tetradecanoilforbol 13-acetato (TPA), 1,25 dihidroxivitamina D₃, e butirato de sódio induzem a diferenciação das mesmas em monócitos/macrófagos (McCarthy *et al*, 1983; Breitman, 1990; Pan *et al*, 1997). Vários autores demonstraram que as células HL60 quando diferenciadas pelos compostos acima referidos adquiriram propriedades semelhantes às células maduras do sangue periférico, incluindo: fagocitose, liberação de enzimas lisossomais, receptores de complemento, quimiotaxia, ativação da via das pentoses (“shunt” da hexose monofosfato), geração do ânion superóxido e habilidade de reduzir o NBT (Newburger *et al*, 1979; Breitman, 1990).

A metilprednisolona, um importante membro da família dos hormônios esteróides, é bem conhecida pelos vários efeitos nas células hematopoéticas e no microambiente da medula óssea (Hicsonmez *et al*, 1996). Desta forma, este composto tem sido utilizado de forma eficaz nos estudos de indução de diferenciação de células da leucemia mielóide,

induzindo a diferenciação das células HL60 numa concentração de 10 μ M (Hicsonmez *et al.*, 1996, Uzunoglu *et al.*, 1999).

A indução de diferenciação celular e conseqüente iniciação do processo apoptótico são ferramentas importantes para pesquisa de compostos que ativem esses mecanismos celulares. Sabendo que a diferenciação terminal de células neoplásicas pode ser induzida por alguns agentes, é possível sugerir que o estado maligno seja reversível quando certos tipos de cânceres são tratados com indutores de diferenciação celular, resultando em menor morbidade quando comparado ao que ocorre em tratamentos com agentes citodestrutivos (Sokoloski and Sartorelli, 1997).

1.3. Estudos de Citotoxicidade

A legislação atual exige que novas drogas sejam testadas antes de serem liberadas para uso farmacológico ou alimentício, onde a toxicidade é um fator importante e limitante para a liberação e consumo (Freshney, 1994). Assim, a descoberta e caracterização físico-química de substâncias causou um grande aumento da demanda de ensaios biológicos necessários para avaliação das atividades toxicológicas destas substâncias (Groth *et al.*, 1995; Clemedson *et al.*, 1996).

A determinação da toxicidade de um xenobiótico é tão importante quanto a verificação de sua atividade biológica. É de fundamental importância a análise do efeito terapêutico *versus* a toxicidade de um composto para determinar o seu índice terapêutico.

O estudo toxicológico *in vivo* tem sido preterido em virtude da utilização de elevado número de animais, acarretando alto custo financeiro, além de aspectos éticos questionados por entidades protetoras de animais. Desta forma, estudos *in vitro* têm sido cada vez mais

utilizados, já que o efeito deletério de um xenobiótico em determinada linhagem celular é um indicativo da sua toxicidade *in vivo*. Além disto, apesar das limitações da cultura de células, os resultados obtidos são muito reprodutíveis (Freshney, 1994; Rodriguez and Haun, 1999).

Citotoxicidade é a medida do potencial de um agente causar injúria celular tais como: alterações morfológicas; lesões na membrana; perda de atividades metabólicas; viabilidade e adesão; inibição do crescimento celular; danos no material genético (genotoxicidade) e morte celular.

Estudos de citotoxicidade são realizados para avaliar a viabilidade celular, os quais podem avaliar a função celular através da integridade da membrana e de organelas, conteúdo celular (metabólito ou macromolécula) e atividade enzimática (Loveland *et al*, 1992; Repetto and Sanz, 1993; Olivier *et al*, 1995). Vários métodos foram descritos nas últimas décadas, para a avaliação da toxicidade *in vitro*, sendo ainda usualmente empregados:

- Exclusão do azul de tripan - avalia a integridade da membrana celular, pois células viáveis excluem este corante (Renzi *et al*, 1993).
- Redução do MTT [brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio]- avalia a função mitocondrial através da atividade de enzimas como a succinato desidrogenase (Mosmann, 1983).
- Incorporação do vermelho neutro (cloridrato de 2-amino-3-metil-7-dimetil-amino fenanzina) - analisa a função lisossomal (Renzi *et al*, 1993).

- Conteúdo de ácidos nucléicos e proteína - fornecem uma estimativa do número de células (Cingi *et al*, 1991).
- Atividade da fosfatase total - dá indicação do metabolismo celular em relação ao metabolismo do fosfato (Aoyama *et al*, 2000).

1.4. Fosfatases

1.4.1. Características Gerais

As fosfatases são hidrolases que utilizam como substratos fosfato monoésteres. Estas enzimas podem ser classificadas como: fosfatase ácida, fosfatase alcalina e proteína fosfatase (Jia, 1997; Bernier and Wang, 1995) e estão amplamente distribuídas nos diferentes tipos de tecidos (Duff *et al*, 1994; Ferreira *et al*, 1998) e compartimentos celulares (Lee, 1988).

1.4.2. Proteínas Fosfatases

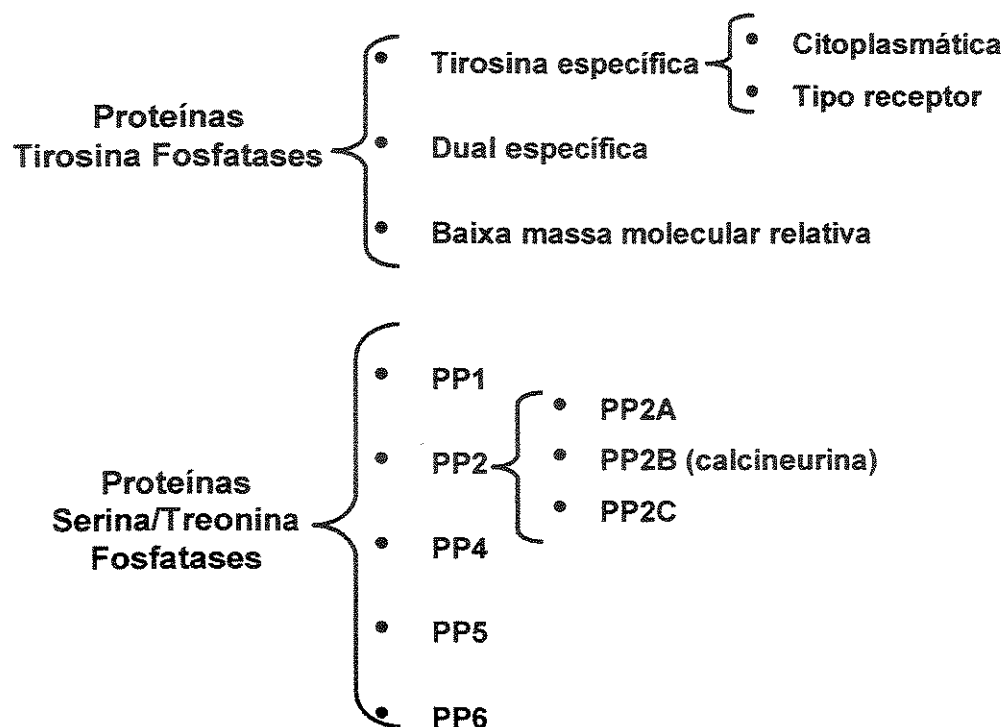
Durante a última década, considerável progresso tem sido feito na elucidação do controle do crescimento e regulação das células eucarióticas (Tonks and Neel, 1996). A fosforilação reversível de proteínas, catalisada pela ação oposta e dinâmica de proteínas quinases e fosfatases, representa o mecanismo regulatório mais comum em células eucarióticas (Zolnierowicz, 2000; Chinkers, 2001). O balanço entre a fosforilação e desfosforilação de proteínas é a base para o controle de diversos eventos biológicos disparados por efetores extracelulares, como hormônios, mitógenos, carcinógenos,

citocinas, oncogenes, neurotransmissores e substâncias ou metabólitos tóxicos (Harrison *et al*, 1999; Ostman and Böhmer, 2001).

Em particular, a fosforilação e desfosforilação de resíduos de serina, treonina e tirosina em proteínas tem emergido como evento chave na regulação da divisão, diferenciação, desenvolvimento celular e apoptose, regulação do metabolismo e expressão gênica, contração, transporte, locomoção celular, aprendizado e memória (Cohen, 1988; Denu *et al*, 1996; Harrison *et al*, 1999; Krebs and Graves, 2000; Genoux *et al*, 2002). Acredita-se que 30% das proteínas intracelulares sejam fosfoproteínas e que cerca de 4% do genoma eucariótico codifique proteínas quinases e fosfatases, o que confirma a importância destas duas classes de enzimas (Jia, 1997; Zhang, 2002).

Dada a importância da fosforilação de proteínas no contexto da função celular, atividades anormais das proteínas fosfatases têm sido responsáveis por vários tipos de patologias, tais como câncer, diabetes e inflamação (Harrison *et al*, 1999; Alexander, 2000; Zhang, 2001). Entretanto, enquanto muito tem sido estudado sobre o papel de quinases, a participação de proteínas fosfatases em diversas vias de transdução de sinais está menos esclarecida.

Proteínas fosfatases (PPs) eucarióticas são estrutural e funcionalmente diferentes, sendo classificadas de acordo com a especificidade por substratos, dependência de metais e sensibilidade a agentes inibidores ou ativadores (Ingebritsen and Cohen, 1983; Cohen, 1985; Harrison *et al*, 1999). Desta forma, elas podem ser agrupadas em dois grandes grupos: Proteínas Tirosina Fosfatases (PTP) e Proteínas Serina/Treonina Fosfatases (Jia, 1997; Harrison *et al*, 1999), como mostrado a seguir.



1.4.2.1. Proteínas Tirosina Fosfatases

As proteínas tirosina fosfatases (PTPs) constituem uma família com características estruturais diferentes. Elas compreendem enzimas do tipo receptor, que possuem a habilidade de transmitir sinais diretamente através da membrana e enzimas citoplasmáticas, que agem tanto positivamente como negativamente controlando diversos processos celulares (Fischer *et al*, 1991; Walton and Dixon, 1993; Harrison *et al*, 1999; Zhang, 2002).

Proteínas tirosina quinases, proteínas tirosina fosfatases e seus substratos correspondentes são integrantes das vias de transdução de sinais que são essenciais para a regulação do crescimento celular, diferenciação, metabolismo, ciclo celular, comunicação

célula-célula, migração celular, transcrição gênica, atividade do canal de íons, resposta imune, fertilização, memória e apoptose (Hunter, 2000). Ações defeituosas ou inapropriadas das atividades dessas enzimas conduzem para fosforilações inadequadas de tirosina, as quais contribuem para o desenvolvimento de muitas doenças humanas incluindo câncer, diabetes, obesidade, auto-imunidade, inflamação, rejeição a transplantes de órgãos, osteoporose, síndrome mieloplásica, injúria neuronal traumática, aterosclerose e desordens genéticas (Harrison *et al*, 1999; Cans *et al*, 2000; Zhang, 2001; Ostman and Böhmer, 2001).

A característica marcante da família PTP é a seqüência assinatura presente no sítio ativo (H/V)C(X)₅R(S/T) e esta seqüência contém um resíduo da cisteína (C) essencial para a catálise (Zhang, 1998; Ostman and Böhmer, 2001). A presença de cisteína no sítio ativo é responsável pela característica comum das proteínas tirosinas fosfatases de serem inibidas pelo vanadato, pervanadato, p-cloromercuribenzoato e outros agentes oxidantes (Tonks and Neel, 1996; Tsiani and Fantus, 1997; Jin *et al*, 2000).

Classificação das PTPs

Estas fosfatases podem ser divididas em três subfamílias: proteínas tirosina específicas, proteínas fosfatases com dupla especificidade (dual) e fosfatases de baixa massa molecular (*B_Mr*) (Zhang, 2001).

Diferente das proteínas fosfatases tirosina específicas e de baixa massa molecular, que têm como alvo apenas proteínas contendo resíduos de tirosina fosforilados, as fosfatases com especificidade dual (tipo SH1/cdc25) utilizam como substratos proteínas que apresentam não só tirosina, como também os aminoácidos serina e treonina fosforilados. Algumas ainda hidrolisam outros substratos além de fosfoproteínas, tais como flavina mononucleotídeo e açúcares fosforilados. No entanto, a especificidade desta

fosfatase por resíduos de aminoácidos é maior (Takagi *et al*, 1997; Maehama and Dixon, 1998; Zhang, 2001).

As PTPs específicas podem ser subdivididas em dois grupos: tipo receptor e citoplasmática. As proteínas tirosina fosfatases tipo receptor, exemplificadas por CD45 e PTP α , geralmente apresentam um segmento extracelular que é caracterizado pela presença de motivos semelhantes àqueles presentes em domínios das moléculas de adesão, como fibronectina. Portanto, estas fosfatases estão envolvidas na comunicação célula-célula e transdução de sinal (Brady-Kalnay *et al*, 1995; Alexander, 2000). As PTPs citoplasmáticas, exemplificadas por PTP1B e SHP-2 participam de vários eventos celulares, tais como antagonistas da ação oncogênica das proteínas quinases Src e Neu, controle da ação da insulina e proliferação das células hematopoéticas (Wood Ford-Thomas *et al*, 1992; Brown-Shimer *et al*, 1992; Kenner *et al*, 1993). Estas enzimas contêm um único domínio PTP catalítico e várias extensões amino ou carboxi-terminais, incluindo os domínios tipo SH2 que são importantes no direcionamento e função da proteína. (Zhang, 2001).

Proteínas tirosina fosfatases de *BMr* parecem desempenhar importante papel na regulação da proliferação celular, uma vez que a alta expressão desta enzima inibe a proliferação de células normais e transformadas (Harrison *et al*, 1999).

1.4.2.2. Proteínas Serina/Treonina Fosfatases

As proteínas serina/treonina fosfatases apresentam mais de uma cadeia polipeptídica, subunidades catalítica e regulatória, tendo como característica comum a dependência de cátions divalentes. Estas fosfatases podem ser agrupadas em duas

subfamílias, PPP e PPM. Os membros da subfamília PPP, por exemplo PP1, PP2A e PP2B (calcineurina) apresentam alta homologia na sequência dos domínios catalíticos, mas diferem na especificidade por substratos e interações com proteínas regulatórias (Zolnierowicz, 2000). PP1 e PP2A não têm uma necessidade absoluta de cátions divalentes, ao passo que PP2B e PP2C são dependentes de Ca^{2+} /calmodulina e Mg^{2+} , respectivamente. PP2C é um membro representativo da outra subfamília de serina/treonina fosfatases, PPM (Barford, 1996; Jia, 1997). Garcia e colaboradores (2000) relataram recentemente, outros tipos de proteínas serina/treonina fosfatases: PP4, PP5 e PP6.

Dados genéticos, farmacológicos e bioquímicos revelaram que PP1 modula o metabolismo do glicogênio em resposta à insulina e adrenalina (Cohen, 1982), mitose (Sakurada *et al*, 1992; Sieder *et al*, 1999), meiose (Huchon *et al*, 1981), contração muscular (Shenolikar, 1994; Wera and Hemmings, 1995), e outros eventos do ciclo celular (Cyert and Thorner, 1989). Tanto PP1 quanto PP2A estão relacionadas à regulação da proteína quinase dependente de Ca^{2+} /calmodulina e são potencial e especificamente inibidas por OKA e microcistina (Mackintosh and Mackintosh, 1994; Harrison *et al*, 1999). Algumas evidências genéticas colocam a PP2A como um regulador da progressão do ciclo celular por atuar sobre proteínas que controlam diferentes fases do mesmo, como por exemplo, atuando sobre a proteína retinoblastoma (pRb), a qual é responsável pelo controle da progressão do ciclo celular da fase G1 para S (Zolnierowicz, 2000).

PP2B, também conhecida como calcineurina, é ativada por um aumento do Ca^{2+} citoplasmático, em linfócitos, causando desfosforilação da forma citoplasmática do fator de transcrição nuclear de células T ativadas (NFAT) o qual inicia a transcrição da interleucina-2, que é um fator de crescimento das células T (Harrison *et al*, 1999; Baksh and Burakoff,

2000). A óxido nítrico sintase (NOS) é um substrato para a PP2B e tem sido proposto que a desfosforilação de NOS reforça sua atividade catalítica, resultando na formação do óxido nítrico e conseqüentemente ação neurotóxica (Dawson *et al*, 1993; Harrison *et al*, 1999).

Em eucariotos, a fosfatase PP2C participa na resposta celular ao estresse, sendo dependente de Mg^{2+} e insensível ao ácido okadáico (Moore *et al*, 1991; Jia, 1997). As fosfatases PP2B também são insensíveis ao ácido okadáico, enquanto a PP1 e PP2A são sensíveis a este inibidor (Mackintosh and Mackintosh, 1994).

A PP4 pertence à mesma subfamília da PP1 e PP2A, por demonstrar aproximadamente 60% de homologia com este grupo. A distribuição celular desta enzima é ampla, sendo encontrada em centrômeros, núcleo e citoplasma sugerindo que PP4 tem funções variadas (Da Cruze *et al*, 1988; Brewis *et al*, 1993; Harrison *et al*, 1999). Devido a sua localização, PP4 pode estar envolvida na duplicação do centrômero, como também foi detectada em vários estágios da mitose (exceto telófase) (Brewis *et al*, 1993; Harrison *et al*, 1999). Sugere-se que a PP5 esteja localizada provavelmente no núcleo (Fischer *et al*, 1989). Esta enzima está envolvida na regulação da síntese de RNA, mitose e na sinalização em resposta aos hormônios esteróides. Foi demonstrado que a PP6 é necessária para a passagem da fase G1 para S do ciclo celular, desta forma havendo um acúmulo de mRNA de ciclina na fase G1. Por isso, PP6 está envolvida na regulação da transcrição. Em células humanas, três formas de mRNA de PP6 são expressas em testículos, coração e músculo esquelético (Harrison *et al*, 1999, Chinkers, 2001)

1.5. Proteínas fosfatases presentes em células HL60

As células HL60 apresentam pelo menos 5 tipos de proteínas fosfatases: proteína serina/treonina fosfatases (PP1 e PP2A), proteínas tirosina fosfatases CD45, SHP-1 e cdc25. A modulação da atividade da CD45 apresenta importante papel na diferenciação e/ou manutenção de várias linhagens de células leucêmicas num estado antiproliferativo (Buzzi *et al.*, 1992). A proteína tirosina fosfatase SHP-1 também está envolvida na regulação da diferenciação destas células (Uesugi *et al.*, 1999). A proteína tirosina nuclear controla a progressão do ciclo celular da fase G1 para S, e a expressão desta fosfatase está associada com um aumento da quantidade da proteína c-myc (Ganapati *et al.*, 2001). A PP1 está envolvida na indução de apoptose pela desfosforilação da proteína retinoblastoma (pRb). A proteína Rb fosforilada é responsável pela progressão do ciclo celular da G1 para S, através da indução da expressão de ciclinas e liberação do fator EF2 (Wang *et al.*, 2001). A PP2A participa na regulação do metabolismo, transcrição, processamento do mRNA (“splicing”), tradução, diferenciação, ciclo celular, transformação oncogênica e transdução de sinal. A atividade desta enzima pode ser modulada por fosforilação e metilação do C-terminal. A ação antiapoptótica das fosfatases PP1 e PP2A foi evidenciada com a utilização de inibidores destas enzimas (ácido okadáico e caliculina, respectivamente) os quais induzem apoptose das células HL60 (Uzunoglu *et al.*, 1999).

1.6. Fosfatases utilizadas como biomarcadores celulares

Biomarcador é definido como qualquer substância biológica capaz de dar indicações sobre o funcionamento célula/órgão (Yamaga *et al.*, 1999).

A participação das fosfatases em diferentes processos celulares sugere que as mesmas podem servir como ferramenta para se avaliar a viabilidade celular através de estudos de citotoxicidade. Neste tipo de estudo se avalia a função celular através da integridade da membrana, funcionamento de organelas (mitocôndria e lisossomo), conteúdo de DNA, além da atividade de certas enzimas como succinato desidrogenase (Loveland *et al*, 1992; Repetto and Sanz, 1993; Olivier *et al*, 1995; Aoyama *et al*, 2000).

Recentemente, Aoyama e colaboradores (2000) propuseram a utilização de proteína fosfatases como biomarcadores da viabilidade de fibroblastos tratados com ácido okadáico (inibidor de proteínas serina/treonina fosfatases), uma vez que os resultados obtidos revelaram uma reprodutibilidade e boa resposta na avaliação da viabilidade celular quando comparado com outros parâmetros usualmente empregados, tais como: conteúdo de proteínas e redução do MTT (Hartree, 1972; Denizot and Lang, 1986).

1.7. Morte Celular

Na década de 90 foram definidos conceitos para os dois tipos de morte celular conhecidos, que são a apoptose e a necrose (Majno and Joris, 1995; Heerder *et al*, 2000).

Apoptose

Apoptose pode ser definida como morte celular geneticamente programada, pois envolve a ativação da expressão de vários genes. A apoptose pode ser induzida como resposta a um processo normal através da sinalização via receptor de morte (receptores da família do fator de necrose tumoral - TNF) ou por estimulação genotóxica provocada por xenobióticos, radicais livres, radiação UV e indisponibilidade de fatores de crescimento

(Uren and Vaux, 1996). As duas vias são responsáveis pela manutenção da homeostasia tecido/órgão.

O destino metabólico de uma célula vai depender da via de sinalização predominante, desencadeada por sinais de proliferação/sobrevivência ou apoptótico (Figura 1). A proliferação celular e/ou sobrevivência pode ser regulada por várias vias de sinalização a partir de um receptor específico, dentre as quais está incluída a sinalização via proteína G, responsável pela ativação da fosfolipase C (PLC), a qual atua sobre fosfatidil – inositol-4,5-bifosfato (PIP₂) produzindo dois segundos mensageiros importantes que são: diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP₃). O IP₃ é responsável pela abertura do canal de cálcio do retículo endoplasmático. Consequentemente, o cálcio liberado juntamente com o DAG ativa a proteína quinase C (PKC) que desencadeia a proliferação celular (Barbazuk and Gold, 1999). Esta via é reforçada pela ativação de proteínas tirosina quinases que atuarão sobre vários substratos intracelulares como bcl-2 e proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs) (Allen *et al*, 1997).

No processo apoptótico também há ativação de proteína quinases, que fosforilam fatores citoplasmáticos deixando-os ativos e portanto responsáveis pela ativação de caspases e inibição da translocase. Desta forma a célula passa por alterações morfológicas, tais como: perda da assimetria da membrana plasmática (presença de fosfatidilserina na camada externa da membrana), formação de bolhas citoplasmáticas, condensação da cromatina e fragmentação do DNA (Wang *et al*, 1999; Chandra *et al*, 2000). Estas alterações culminam na formação de corpos apoptóticos que posteriormente serão fagocitados pelas próprias células vizinhas ou por macrófagos (McConkey, 1998).

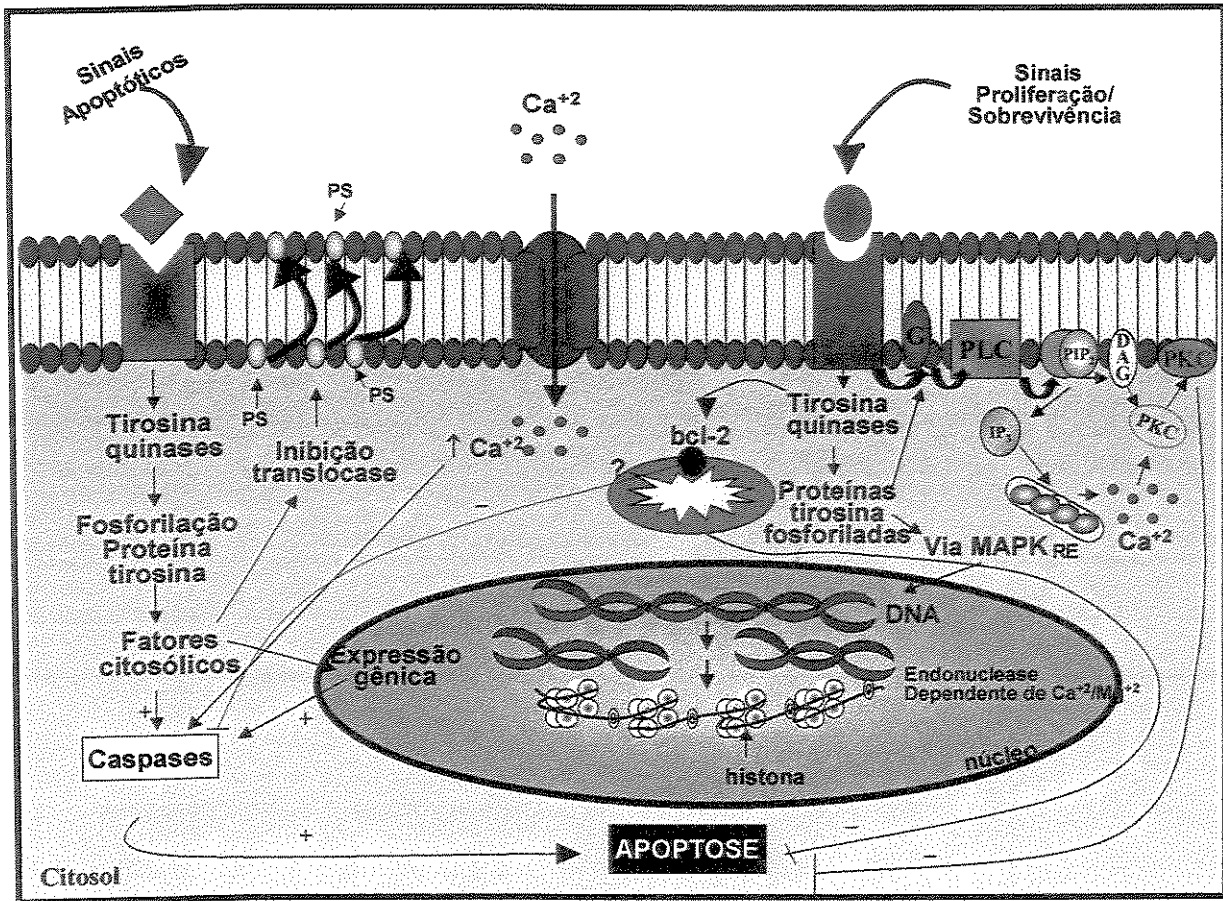


Figura 1. Diagrama esquemático mostrando as vias envolvidas na apoptose em resposta a um sinal apoptótico ou de proliferação/sobrevivência (adaptado do artigo Allen *et al*, 1997).

Indução da apoptose via receptor

A sinalização para a ocorrência da apoptose se dá com a participação de receptores pertencentes à família do TNF, juntamente com a ligação de proteínas específicas a estes receptores (TNF/FasL). Após a ligação do TNF ou FasL (Fas ligante) ao seu receptor ocorre a ligação das proteínas ao domínio de morte destes receptores: TRADD (domínio de morte associado ao receptor para o TNF) ou FADD (domínio de morte associado ao Fas). A trimerização das subunidades dos receptores, juntamente com o recrutamento de proteínas citoplasmáticas levam à ativação de proteases (caspases) que irão atuar sobre diferentes substratos como proteínas do citoesqueleto, polimerase poli-ADP ribose (PARP), lamina B e quinase PAK2 (responsável pela produção dos corpos apoptóticos (McConkey, 1998).

Indução da apoptose via mitocôndria

Além da indução da apoptose via receptores de morte, a mitocôndria exerce importante papel na sinalização da apoptose (Gottlieb, 2000). Vários tipos de agentes estressores (radicais livres, ceramida, UV e drogas) podem alterar a permeabilidade da membrana mitocondrial. Esta alteração na permeabilidade permite a associação de duas proteínas (Bad e Bax) na membrana mitocondrial formando poros que permitem a saída do citocromo C e ATP para o citosol (Wang *et al*, 1999; Tsujimoto *et al*, 2000). O citocromo C juntamente com a proteína Apaf1 (fator de indução da apoptose) e ATP ativam a caspase 9 que por sua vez ativa outras caspases, culminando na apoptose. As proteínas bcl-2 e BAG atuam como proteínas antiapoptóticas por impedirem a formação dos poros na membrana mitocondrial, conseqüentemente, não ocorre o extravazamento do citocromo C e ATP para o citosol (Gottlieb, 2000).

Alguns quimioterápicos apresentam ação anti-tumoral por ativarem a esfingomielinase com consequente produção de ceramida, a qual atua como "indutor" da apoptose também por ativar caspases (Uren and Vaux, 1996).

O fator nuclear Kappa B (NF κ B) é uma proteína citoplasmática que se encontra ligada a uma proteína inibidora (I κ B). Este complexo é dissociado quando a proteína I κ B é fosforilada e posteriormente degradada por proteases ou pela presença de espécies reativas de oxigênio. O NF κ B livre se transloca para o núcleo e ativa a transcrição de vários genes como de receptores (TNFR) e de enzimas como a superóxido dismutase (Kimpinski *et al*, 1999; Allen and Tresini, 2001).

Independente da via de indução da apoptose, a fase final deste processo é a ativação de endonucleases e consequente fragmentação do DNA nuclear (Wyllie, 1980).

Necrose

Outro tipo de morte celular que é completamente diferente da apoptose é a morte por necrose; provocada por injúria celular ou tecidual (Martin, 1993). Nesta condição um grande grupo de células são afetadas e lesadas ao mesmo tempo causando uma resposta inflamatória e alterando o tecido/ órgão (McConkey, 1998).

No início do processo de necrose ocorrem alterações da função mitocondrial diminuindo drasticamente a produção de ATP, o que prejudica o funcionamento das bombas de Na⁺/K⁺ e Ca²⁺, levando à tumefação celular (entrada de água) pelo aumento de Na⁺ citosólico e ativação de fosfolipases e proteases dependente de Ca²⁺ (Wilcock and Hickman, 1988). O aumento de espécies reativas de oxigênio em decorrência da perda da

integridade mitocondrial ou pela presença de xenobióticos também é capaz de ativar proteases. O estresse oxidativo acarreta em rupturas da membrana plasmática e à ativação de proteases é responsável pela desestruturação do citoesqueleto, levando ao extravazamento do conteúdo celular e conseqüentemente, provocando migração de grande quantidade de macrófagos (ativação da resposta imune) – (Allen *et al*, 1997).

Ao contrário da retração (encolhimento) visto em células apoptóticas, na necrose ocorre um rápido entumescimento celular devido, em parte, aos danos no citoesqueleto e inibição das bombas de íons, que levam à perda da permeabilidade da membrana (McConkey, 1998).

1.8. Características gerais dos compostos utilizados neste trabalho

1.8.1. Vanadato e Pervanadato

O vanadato e pervanadato têm sido amplamente utilizados nos estudos de sinalização envolvendo proteínas tirosina fosfatases (Huyer *et al*, 1997). O vanadato altera a atividade de muitas enzimas envolvidas no metabolismo do fosfato, por ter semelhança estrutural com o mesmo. Conseqüentemente, este composto atua como inibidor competitivo das fosfatases ácidas, alcalinas e proteínas tirosina fosfatases (Gresser and Tracey, 1990; Tsiani and Fantus, 1997; Cortizo *et al*, 2000).

Vanadato, o primeiro inibidor de PTPs descoberto, sofre alteração redox intracelularmente e reage com tióis. Verificou-se que o referido inibidor potencializou a fosforilação da tirosina em vias de sinalização ativadas pelo H₂O₂ em vários tipos celulares e tal potencialização pode ser explicada pela combinação dos efeitos inibitórios provocado por ambos oxidantes (Monteiro and Stern, 1996).

Em várias células, a inibição das PTPs pelo vanadato resulta em acúmulo de proteínas fosforiladas em resíduos de tirosina (Gresser and Tracey, 1990). Portanto, estes achados reforçam a capacidade dos compostos derivados do vanádio de regularem diferentes processos fisiológicos, tais como: crescimento celular, diferenciação, metabolismo da glicose e lipídios (Stern *et al*, 1993; Cortizo *et al*, 2000).

Muitos estudos utilizando cultura de células mostraram um estímulo do crescimento celular na presença do vanadato ou um aumento na mitogênese quando ele é combinado com fatores de crescimento (Feldman *et al*, 1990). Por outro lado, certos relatos indicam que o vanadato pode inibir a proliferação celular, e por isto este composto ou seus derivados têm sido propostos como agentes quimioterápicos (Tsiani and Fantus, 1997).

Huyer e colaboradores (1997) propuseram que a inibição de proteínas fosfatases pelo pervanadato era devido à oxidação dos resíduos de cisteína essenciais para catálise presentes na sequência assinatura, tendo como possíveis produtos: pontes de dissulfeto (-S-S-), ácido sulfênico (-SOH), ácido sulfínico (-SO₂H) e ácido sulfônico (-SO₃H) - (Halliwell and Gutteridge, 1999).

1.8.2. Ácido Okadáico

O ácido okadáico (OKA) é um poliéter natural, produto isolado originalmente da esponja marinha *Halichondria okadai* (Daranas *et al*, 2001). É um potente inibidor de proteína serina/treonina fosfatase tipo 1 (PP1) e tipo 2A (PP2A) e essa inibição é devido, provavelmente, a uma interação com domínios hidrofóbicos destas enzimas (Honkanen *et al*, 1996). O processo reversível de fosforilação é um importante mecanismo de regulação de várias vias de sinalização em células eucarióticas, desta forma, a inibição específica por

ácido okadáico induz alteração do citoesqueleto, inibição da migração celular e apoptose em uma variedade de tipos celulares (epitelial, neural, mielóide, osteoblasto e hepatócitos) (Leira *et al*, 2001; Fernandez *et al*, 2002). Além da inibição de proteínas serina/treonina fosfatases, Leira e colaboradores (2001) demonstraram que o ácido okadáico provoca alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial e do estado redox celular.

1.8.3. Desidrocrotonina

Em uma revisão de agentes antineoplásicos derivados de plantas, aproximadamente 50 sesquiterpeno lactonas apresentaram efeito inibitório sobre o crescimento de vários modelos tumorais (Rodriguez *et al*, 1976). Dentre as várias centenas de produtos naturais que apresentam propriedades anti-tumoral, as sesquiterpeno lactonas têm despertado grande interesse no estudo bioquímico, fisiológico e químico das mesmas.

O estudo do mecanismo de ação destes compostos revelou que todas as sesquiterpeno lactonas citotóxicas conhecidas continham como grupo funcional uma lactona, aliada a essa característica, a presença de uma dupla ligação conjugada à γ -lactona, as quais são essenciais para o efeito citotóxico. Sesquiterpenos que apresentam uma ciclopentenona ou uma α -metileno lactona parecem apresentar uma maior citotoxicidade do que outras sesquiterpenos que não apresentam estes grupamentos funcionais (Kupchan *et al*, 1971).

Diversos relatos na literatura indicam que a estrutura e a reatividade destas sesquiterpeno lactonas podem estar associadas com alquilação seletiva de grupos nucleófilos em enzimas (grupos sulfidrilas importantes para catálise), dentre as quais,

proteínas que regulam o ciclo celular (Hanson *et al*, 1970; Rodriguez *et al*, 1976; Schmidt, 1999). Sabe-se ainda, que muitas sesquiterpeno lactonas afetam os níveis intracelulares de GSH por inibirem o seu metabolismo ou por ativarem reações de conjugação envolvendo este tripeptídeo e as sesquiterpeno lactonas, resultando em alteração do metabolismo celular, incluindo a resposta antioxidante (Jodynis-Liebert *et al*, 2000).

Uma característica comum das células tumorais é a presença de alto conteúdo de glutathiona reduzida (GSH) e tioredoxina e/ou enzimas antioxidantes (tioredoxina redutase, superóxido dismutase e glutathiona redutase), as quais são responsáveis pela resistência destas células a quimioterápicos que apresentam ação alquilante e oxidante (Brien and Tew, 1996).

Entre as plantas medicinais, destaca-se a família *Euphorbiaceae*, que apresenta mais de 8.000 espécies amplamente distribuídas em regiões tropicais e temperadas de todo o mundo. É uma família com muitos representantes na Amazônia, sendo que algumas nunca foram estudadas sob o ponto de vista químico e outras ainda não foram classificadas.

O gênero *Croton*, pertence à subfamília Crotonoideae e tribo Crotoneae e é um dos mais numerosos da *Euphorbiaceae*. No Brasil, há mais de 300 das cerca de 700 espécies desse gênero, muitas das quais, têm suas propriedades químicas e/ou farmacológicas conhecidas (Grynberg *et al*, 1999).

O gênero *Croton* tem representantes tanto medicinais, quanto tóxicos (Abreu *et al*, 2001). Diterpenolactonas obtidas das espécies *C. sublyratus* e *C. sonderianus* possuem atividade no tratamento de distúrbios gástricos (Silveira and Mc Chesney, 1994). Entretanto, muitos destes extratos vegetais têm sido utilizados por pessoas sem o

conhecimento dos efeitos colaterais que podem causar sobre a saúde, incluindo distúrbios hepáticos.

Uma das espécies de *Croton* mais conhecida na Amazônia é a *Croton cajucara* Benth (Euphorbiaceae), uma planta medicinal brasileira, popularmente conhecida como “sacaca” e que tem uma história de uso na medicina popular. É uma árvore de 4 a 5 metros de altura, cujas cascas e folhas são usadas, na forma de chá, como antidiarréico, no tratamento de diabetes, inflamações do fígado, vesícula ou rins e também para baixar os níveis de colesterol (Maciel *et al*, 2000; Silva *et al*, 2001).

Um clerodane nor-diterpeno, *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) é um importante composto bioativo da *Croton cajucara* (Farias *et al*, 1997; Grynberg *et al*, 1999). Recentes estudos mostraram que a *t*-DCTN, o principal metabólito secundário presente nas cascas da “sacaca”, possui estrutura semelhante às diterpenolactonas obtidas de outras espécies de *Croton*. Estes compostos apresentam diferentes atividades biológicas tais como, anti-ulcerogênica e antitumoral (Rodriguez, 1998; Souza-Brito *et al*, 1998; Hiruma-Lima *et al*, 1999; Grynberg *et al*, 1999; Maciel *et al*, 2000).

2. OBJETIVOS

A desidrocrotonina, tem despertado grande interesse com relação ao mecanismo das suas atividades biológicas (antiulcerogênica e antineoplásica). Com a finalidade de verificarmos a participação de fosfatases no metabolismo de células HL60 (células de leucemia promielocítica humana) e a citotoxicidade da desidrocrotonina, nos propomos neste trabalho:

- Avaliar a citotoxicidade da desidrocrotonina e da metilprednisolona nestas células;
- Verificar o efeito da desidrocrotonina e da metilprednisolona na atividade da fosfatase predominante destas células;
- Caracterização cinética da fosfatase total das células HL60;
- Realizar estudos de citotoxicidade utilizando a dosagem da fosfatase total como parâmetro;
- Avaliar a indução da diferenciação das células HL60 pela desidrocrotonina, utilizando a metilprednisolona como controle positivo de diferenciação;
- Correlacionar o efeito citotóxico da desidrocrotonina com uma possível indução da apoptose.

Como será mostrado adiante, a maior parte dos resultados obtidos nesta tese foi apresentada na forma de artigo. No entanto, os resultados que não foram incluídos nos artigos, tiveram grande importância para a discussão da tese de uma maneira geral. Desta forma, a metodologia e os resultados obtidos estão descritos separadamente.

3. MATERIAIS E MÉTODOS DA CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DA FOSFATASE TOTAL DAS CÉLULAS HL60

3.1. Materiais

As células HL60 foram generosamente doadas pelo Dr. Rui Curi/Valdemir Vieira Colleone da Universidade de São Paulo (USP). A Desidrocrotonina foi gentilmente cedida pela Dra. Patrícia da Silva Melo (Departamento de Bioquímica/IB - UNICAMP). Os inibidores de fosfatases (pervanadato e ácido okadáico) e demais reagentes foram adquiridos da Sigma.

3.2- Métodos

3.2.1. Obtenção da enzima total

As células (1×10^6 células/mL) foram lavadas duas vezes com solução fisiológica, em seguida lisadas com tampão acetato 0,001 M pH 5,5. Após repouso de 10 minutos realizou-se dosagem da atividade fosfatásica.

3.2.2 Obtenção da enzima (fração citoplasmática e de membrana)

O lisado obtido como descrito no item anterior, foi centrifugado por 25 minutos a 25.000 rpm. O sobrenadante foi utilizado para dosagem da fosfatase citoplasmática e o precipitado obtido (membrana) ressuspendido no mesmo tampão (0,1M), pH 5,5 contendo 0,2% de triton X 100.

3.2.3. Dosagem da atividade fosfatásica

A dosagem da atividade foi determinada por 2 métodos dependendo do substrato utilizado:

a - Dosagem do p-nitrofenol

O meio de reação (volume final, 1,0 mL) continha tampão acetato 100 mM pH 5,5, pNitrofenilfosfato (pNPP) 5 mM e a enzima. Depois de 30 minutos de incubação a 37°C, a reação foi paralisada pela adição de 1,0 mL de NaOH 1M. A quantidade de p-nitrofenol (pNP) liberada foi determinada pela medida da absorbância a 405 nm (Aoyama *et al*, 2000).

b - Dosagem do fosfato

Quando outros substratos foram utilizados (flavina mononucleotídio, tirosina fosfato, treonina fosfato e serina fosfato), a atividade enzimática foi determinada dosando-se o fosfato liberado. A reação foi paralisada 30 minutos após a adição da enzima, com 1 mL de molibdato de amônio 3% (em tampão acetato 0,2 M, pH 4,0). A coloração do complexo fosfo-molíbico foi adquirida pela adição do agente redutor, ácido ascórbico 1% (em tampão acetato 0,2 M, pH 4,0), de acordo com o método descrito por Lowry and Lopez (1945). A absorbância foi medida a 700 nm, 30 minutos após a adição do ácido ascórbico.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO DA CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DA FOSFATASE TOTAL DAS CÉLULAS HL60

4.1. Caracterização Cinética da Fosfatase Total das Células HL60

A fosfatase total das células HL60 foi caracterizada cineticamente sob vários aspectos: pH ótimo para catálise, afinidade pelo substrato, efeito de cátions e de potenciais inibidores.

Estes estudos foram necessários porque não existem relatos na literatura com relação às propriedades cinéticas desta enzima, que são fundamentais para se estudar os efeitos de qualquer composto na atividade da mesma. Além disto, nos ensaios de citotoxicidade mostrados a seguir, um dos parâmetros analisados foi a atividade da fosfatase total presente nas células HL60.

A fosfatase total presente nas células HL60 apresentou um pH ótimo para catálise de 5,5, mostrando semelhança com outras fosfatases de mamíferos, que usualmente apresentam pH ótimo em torno de 5,0 (Granjeiro, 1994).

Como todas as fosfatases podem hidrolisar o p-nitrofenilfosfato (pNPP), um substrato sintético, a atividade enzimática quando o mesmo foi utilizado como substrato foi considerada como sendo 100% (Tsuchiya *et al*, 1997; Kawada *et al*, 1999). Quando foram utilizados outros substratos foi possível observar algumas diferenças. A fosfatase obtida das células HL60 hidrolisou eficientemente a tirosina fosfato (80%), indicando portanto, que esta enzima pode ser uma PTP (Cuncic *et al*, 1999). Entretanto, este dado não é suficiente para se afirmar que a mesma seja uma PTP, pois recentemente Vetter e colaboradores

(2000) relataram que algumas fosfatases podem atuar sobre um aminoácido isolado, no entanto são incapazes de atuar sobre um resíduo de aminoácido em um peptídeo. Além disto, este grupo demonstrou que aminoácidos vizinhos ao resíduo de Tyr poderão determinar a especificidade da enzima. Os outros aminoácidos fosforilados (serina e treonina) também foram hidrolisados por esta enzima, porém em menor proporção.

Dentre os cátions testados, apenas o cobre apresentou efeito inibitório sobre a enzima. A inibição da fosfatase pelo cobre reforça a existência de grupamentos SH essenciais para a catálise (Cuncic *et al*, 1999; Tracey, 2000). Todas as PTP apresentam resíduos SH no sítio ativo e, por isso, agentes oxidantes e alquilantes destes grupos (sulfidrilas) são inibidores irreversíveis desta família de proteínas fosfatases (Zhang and Dixon, 1993; Cuncic *et al*, 1999).

Os cátions divalentes Mg^{2+} e Ca^{2+} não apresentaram efeito ativador sobre a atividade fosfatásica. Diferente de outras proteínas fosfatases, as PTP não requerem íons metálicos para a catálise (Fauman and Saper, 1996; Harrison *et al*, 1999). Sabe-se que a dependência de cátions divalentes é uma característica comum das proteínas serina/treonina fosfatases, sendo PP2B e PP2C dependentes de Ca^{2+} e Mg^{2+} , respectivamente (Honkanen *et al*, 1991; Ingebritsen and Cohen, 1983; Cohen, 1989; Cohen, 1997; Harrison *et al*, 1999), ao passo que, a PP2A não necessita dos referidos íons para sua atividade. Portanto, a insensibilidade a cátions divalentes indica que a principal fosfatase das células HL60 não se trata de uma proteína serina/treonina fosfatase.

O estudo de inibição é uma ferramenta útil para se determinar o tipo predominante de fosfatase presente em um extrato celular (Mackintosh and Mackintosh, 1994; Bernier and Wang, 1996). O fluoreto inibiu somente 40% da atividade enzimática ($p=0.1202$). O

mesmo inibe totalmente a fosfatase ácida de massa molecular relativa intermediária, enquanto as proteínas tirosina fosfatases são pouco sensíveis. O tartarato é um inibidor de fosfatases ácidas de alta massa molecular relativa (Granjeiro, 1994) e não apresentou efeito inibidor sobre a fosfatase das células HL60. A fosfatase obtida das células HL60 foi significativamente inibida pelo vanadato e pelo pCMB ($p < .0001$). A inibição apresentada pelo pCMB (80%), sugere que esta fosfatase é dependente do grupamento SH para catalisar a reação, pois este composto se liga ao referido grupamento, impedindo-o de participar da catálise. Enzimas em que o grupamento SH participa da reação são altamente sensíveis ao pCMB, pois quando o mesmo é adicionado ao meio de reação na ordem de μM , ocorre inibição completa da atividade (Laidler *et al*, 1982; Tracey, 2000). A fosfatase destas células foi completamente inibida pelo m-vanadato e pervanadato, o que reforça a possibilidade desta fosfatase ser uma PTP, uma vez que estes inibidores são específicos desta classe de fosfatases, em concentrações da ordem de mM (Swarup *et al*, 1982; Enz and Pombo Villar, 1997).

O ácido okadáico é um potente inibidor de PP2A, e também, quando usado em altas concentrações, de PP1; inibindo apenas parcialmente a PP2B. Porém, a PP2C não é inibida por este composto (Bialojan and Takai, 1988; Ishihara *et al*, 1989b; Harrison *et al*, 1999). A ausência de inibição da enzima pelo ácido okadáico sugere que a principal fosfatase das células HL60 não se trata de uma proteína serina/treonina fosfatase (PP1, PP2A e PP2B). Mayer (1997) demonstrou que o ácido okadáico aumenta a atividade de tirosina fosfatase isolada de células. No caso específico da fosfatase total isolada das células HL60, houve uma ativação de 20% na presença desta toxina.

Os dados cinéticos da fosfatase total das células HL60 estão resumidos na Tabela 1, os quais revelam que a fosfatase predominante no extrato celular corresponde a uma PTP.

Tabela 1

Estudos cinéticos da fosfatase das células HL60.

Quando o pNPP foi utilizado como substrato e na ausência de compostos a atividade foi considerada como 100%. Os experimentos foram realizados em triplicata e todos os dados apresentados foram expressos em média \pm desvio padrão. Os níveis de significância entre as amostras foram analisados segundo Análise de Multivariância (ANOVA), através do software SAS utilizando como base $p < 0.05$ indicando significância (Teste de Dunnett's).

| Ensaio | Compostos | Concentração | Atividade Relativa (%) |
|-------------------|------------------------------|--------------|------------------------|
| Substratos | PNPP | 5mM | 100 (\pm 6) |
| | TyrP (tirosina fosfato) | 5mM | 80 (\pm 1) |
| | FMN(flavina mononucleotideo) | 5mM | 35 (\pm 5) |
| | ThrP (treonina fosfato) | 5mM | 42 (\pm 2) |
| | SerP (serina fosfato) | 5mM | 37 (\pm 2) |
| Cátions | CuSO ₄ | 1mM | 17 (\pm 2) |
| | NaCl | 1mM | 99 (\pm 1) |
| | KCl | 1mM | 100 (\pm 1) |
| | MgCl ₂ | 1mM | 110 (\pm 1) |
| | CaCl ₂ | 1mM | 105 (\pm 3) |
| Inibidores | Ácido okadáico | 10nM | 125 (\pm 1) |
| | PCMB | 0,1mM | 20 (\pm 1) |
| | Pi | 10mM | 98 (\pm 1) |
| | m-vanadato de sódio | 10mM | 2 (\pm 1) |
| | Pervanadato | 0,1mM | 8 (\pm 2) |
| | NaF | 10mM | 60 (\pm 1) |
| | Tartarato de sódio | 10mM | 83 (\pm 2) |
| | Fosfato | 10mM | 88 (\pm 2) |

4.2. Efeito da desidrocrotina e da metilprednisolona na atividade da fosfatase isolada das células HL60

Com a finalidade de correlacionar a participação da fração predominante isolada das células HL60, uma PTP (altamente sensível a agentes oxidantes), à toxicidade da desidrocrotina e metilprednisolona, analisamos o efeito das mesmas na atividade fosfatásica associada à membrana e citoplasmática presente nestas células.

Nas células HL60 tratadas com desidrocrotina na concentração de 20 μM observou-se uma inibição de 35% ($p < 0.0001$) na atividade da fosfatase da fração membranar. Analisando a fração citosólica houve uma inibição de apenas 25% ($p = 0,130$). Isso demonstra que provavelmente a desidrocrotina está atuando em proteínas fosfatases de membrana. A *t*-DCTN, um agente alquilante, pode interagir covalentemente com os grupamentos sulfidrilas da enzima, alterando a conformação da mesma e portanto, inibindo a sua atividade, devido ao caráter hidrofóbico deste composto. A *t*-DCTN não foi utilizada na mesma concentração dos estudos de diferenciação celular devido ao método utilizado para dosar a enzima.

A metilprednisolona (100 μM) causou inibição da atividade da PTP de 30% ($p < 0.0001$) e 15% ($p = 0,110$) da fração membranar e citoplasmática, respectivamente. Como a modulação da atividade da CD45, uma PTP de membrana, apresenta importante papel na diferenciação de várias linhagens de células leucêmicas (Buzzi *et al*, 1992), podemos supor que a metilprednisolona possa agir por esta via de sinalização.

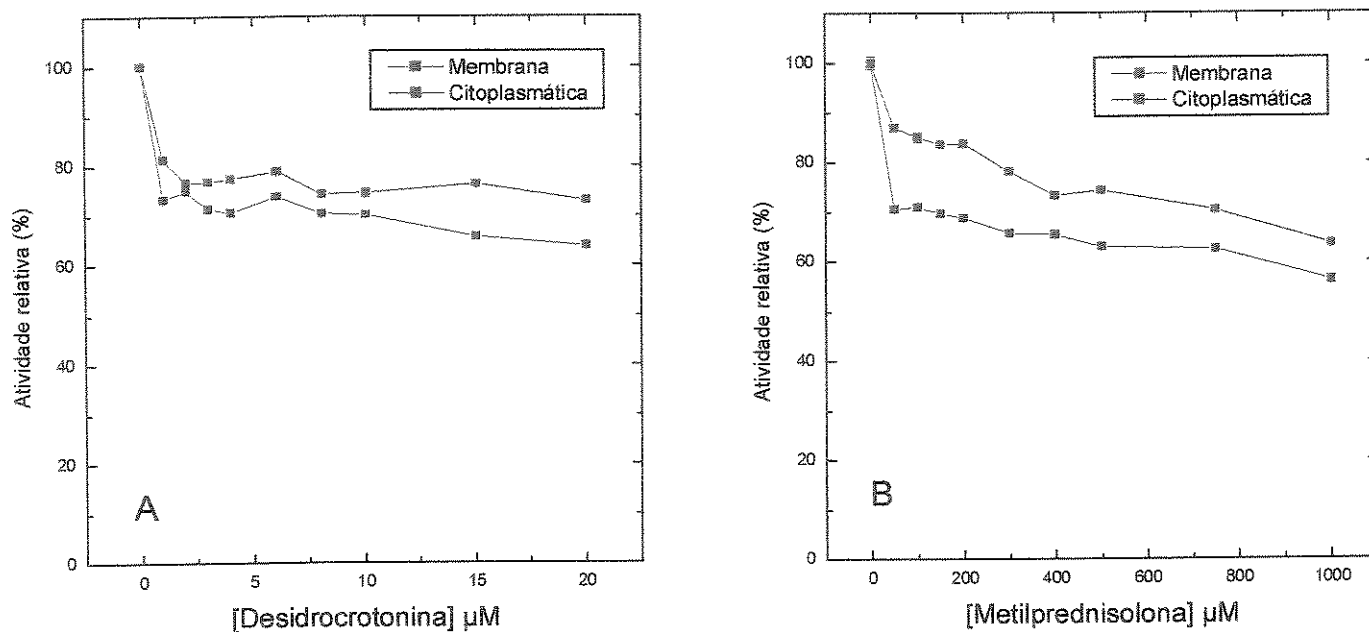


Figura 2. Efeito de diferentes concentrações da Desidrocrotalina (A) e da Metilprednisolona (B) na atividade fosfatásica da fração citoplasmática e de membrana das células HL60. A concentração da desidrocrotalina foi variada de 0 – 20 μM e a metilprednisolona foi utilizada nas concentrações de 0 a 1000 μM . A atividade da enzima foi determinada como descrito em métodos 3.2.3a. Os experimentos foram realizados em triplicata e os pontos mostrados nos gráficos representam as suas médias e os desvios padrões.

1º Artigo (submitted to *Toxicology Letters*)

RELATIONSHIP BETWEEN THE PHOSPHATASE ACTIVITY AND CYTOTOXIC EFFECT OF THE PROTEIN PHOSPHATASE INHIBITORS ON HUMAN MYELOID LEUKEMIA CELL LINE

Ana Claudia Galvão Freire*; Patrícia da Silva Melo*; Marcela Haun*; Hiroshi Aoyama* and Carmen Veríssima Ferreira*

*Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 13083-970 Campinas, São Paulo, Brasil.

ABSTRACT

The cytotoxicity of pervanadate and okadaic acid was evaluated on HL60 cells through the following endpoints of cytotoxicity: phosphatase activity; protein quantification and MTT reduction. Phosphatase activity was determined in HL60 cells after treatment, and lysing with 0,1M acetate buffer (pH 5.5) and using p-nitrophenyl phosphate. The reaction was stopped after 30 minutes with 1M NaOH and the product measured at 405nm. The protein content was decreased 25% when the cells were treated with okadaic acid (100nM) in combination with pervanadate (200µM). In relation to the mitochondrial function and phosphatase activity, the cells presented about 20% of viability in the presence of okadaic acid 100nM and pervanadate 200µM, respectively. These results indicate that the cytotoxic effect presented by pervanadate on the HL60 cells could be due to the action of this compound on the phosphatase. In relation to okadaic acid, among the parameters analyzed, only the mitochondrial function was affected.

Key words: pervanadate, okadaic acid, cytotoxicity, HL60, protein phosphatase.

to whom correspondence should be addressed:

Dr^a. Carmen Veríssima Ferreira

Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 13083-970, Campinas, São Paulo, Brasil

Fax: 55-19-3788-312

email: carmenv@unicamp.br

INTRODUCTION

A variety of cellular functions including gene transcription, cell differentiation, contractility, neurotransmission, and memory regulation involve phosphorylation of proteins which is dependent upon the relative activity of protein kinases and phosphatases (Harrison *et al.*, 1999). Given the importance of protein phosphorylation in the context of cell function, abnormal protein phosphatase activity has been implicated in diseases such as cancer, diabetes and inflammation (Cantley *et al.*, 1991; Taylor *et al.*, 1992; Parnetti *et al.*, 1997).

Protein phosphatases are classified according to their substrate specificity, dependence upon metal ions for activity, and sensitivity to inhibitory or activator agents of which there are two families of protein phosphatases: serine/threonine phosphatases (PP1, PP2A, PP2B, PP2C, PP4, PP5 and PP6) and tyrosine phosphatases. Protein tyrosine phosphatases are a structurally diverse family, comprised of receptors with the ability to transmit signals directly across the membrane and cytoplasmic enzymes which act as positively as negatively in the control of cell function. Protein tyrosine phosphatases can be divided into 4 groups: tyrosine specific phosphatases, like-receptor, dual (*cdc25*) and low molecular weight phosphatases (Jia, 1997; Harrison *et al.*, 1999). The marine toxin (okadaic acid) is a polyether fatty acid that has been reported to cause tumor promotion and reversibly inhibit serine-threonine phosphatase 1 and 2A (Mayer *et al.*, 1997). This toxin is the most potent inhibitor of PP1 and PP2A and now

regarded as a standard reagent for biological studies of protein phosphatases (Konoki *et al.*, 2000). Pervanadate is a typical inhibitor of protein tyrosine phosphatase, presumably by its ability to oxidize irreversibly the thiol groups (Tsiani and Fantus, 1997).

Human myeloid leukemia cell line (HL60) has been used as tool for studying of cytotoxic effect of different drugs, differentiation and cell death (apoptosis). Recently, some authors have reported that protein phosphatases may also be involved in this process (Uzunoglu *et al.*, 1999).

Cytotoxicity can be defined as the measure of the potential toxicity caused by a compound that disrupt the cell homeostasis, depending on the concentration and exposure time. The deleterious effects (cellular damages) usually compromise the cell viability altering morphological and/or metabolic integrity (Groth *et al.*, 1995).

The aim of the present work was to investigate the cytotoxicity of pervanadate and okadaic acid, two inhibitors of protein phosphatases, on HL60 cells. Thus, for evaluate the cell viability treated with these compounds, were used three parameters including reduction of 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) that assesses mitochondrial function through the activity of succinate dehydrogenase (Mosmann, 1983); the protein content that provides an index of the total cell number based on a determination of the cellular macromolecule content (Cingi *et al.*, 1999) and phosphatase activity, evaluating the cell metabolism in relation

to dephosphorylation reaction (Aoyama *et al.*, 2000).

MATERIALS AND METHODS

MATERIALS

HL60 cells were generously supplied by Dr. Rui Curi/Valdemir Vieira Colleone from the University of São Paulo (São Paulo, Brazil). The phosphatases inhibitors (vanadate and okadaic acid) were purchased from Sigma Chemical Company.

METHODS

Preparation of pervanadate solution: Pervanadate was prepared by mixing equal volumes of 1 mM hydrogen peroxide and 1 mM sodium metavanadate and incubating the solution at room temperature for 20 min (Huyer *et al.*, 1997). At the end of the period, the solution was diluted in RPMI medium to the required concentration and used within 30 min.

Cell Culture: HL60 cells were routinely grown in suspension in RPMI medium containing glutamine 0,200g/L, antibiotics (100 IU penicillin/mL, 100 µg streptomycin/mL) and supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, in a 5% CO₂ humidified atmosphere at 37°C. For the MTT, protein quantification and phosphatase activity assays, 24-well tissue culture plates were inoculated with 3 x 10⁵ cells/mL and incubated at 37°C (Uzunoglu *et al.*, 1999). After 72h the cells were treated with pervanadate and

okadaic acid, in concentrations up to 200µM and 100 nM, respectively.

MTT assay: The medium containing pervanadate and okadaic acid was removed and 1 mL of MTT solution (0.5 mg MTT/mL of culture medium) was added to each well. After incubation for 4 h at 37°C, the medium was removed and the formazan solubilized in 1 mL of ethanol. The plate was shaken for 5 min on a plate shaker and the absorbance then measured at 570 nm (Mosmann, 1983).

Protein phosphatase assay: The enzyme was obtained after lysis of the cells with acetate buffer pH 5.5, 0.1 mM. The reaction mixture (final volume, 0.5 mL) contained 100 mM acetate buffer at the pH 5.5, 5 mM pNPP and cell extract enzyme. After a 30 min incubation at 37°C, the reaction was stopped by adding 0.5 mL of 1 M NaOH. The amount of pNP released was determined by measuring the absorbance at 405 nm (Aoyama *et al.*, 2000).

Protein quantification: Protein concentration was determined according to modified Lowry's method (Hartree, 1972).

Statistical evaluation: All experiments were performed in 24-well tissue culture plates, in triplicate and the results shown in graph represent the mean and standard deviation. Statistical significance/variance were determined by Dunnett's test with the level of significance set at $p < 0.05$.

RESULTS

In this work we described the relationship between the phosphatase activity and cytotoxic effect of the protein phosphatase inhibitors on the HL60 cells. The phosphatase activity was strongly inhibited when the cells were treated with pervanadate, after 24h of treatment the enzyme presented 20% of the residual activity (Figure 1A), whereas in the presence of okadaic acid this effect was not observed. In relation to the mitochondrial function the cells presented about 20% of the viability in the presence of okadaic acid 100nM (Figure 1B). As shown in Figure 1C, the total protein content decreased 30% when the cells were treated with okadaic acid (100nM) in combination with pervanadate (200 μ M).

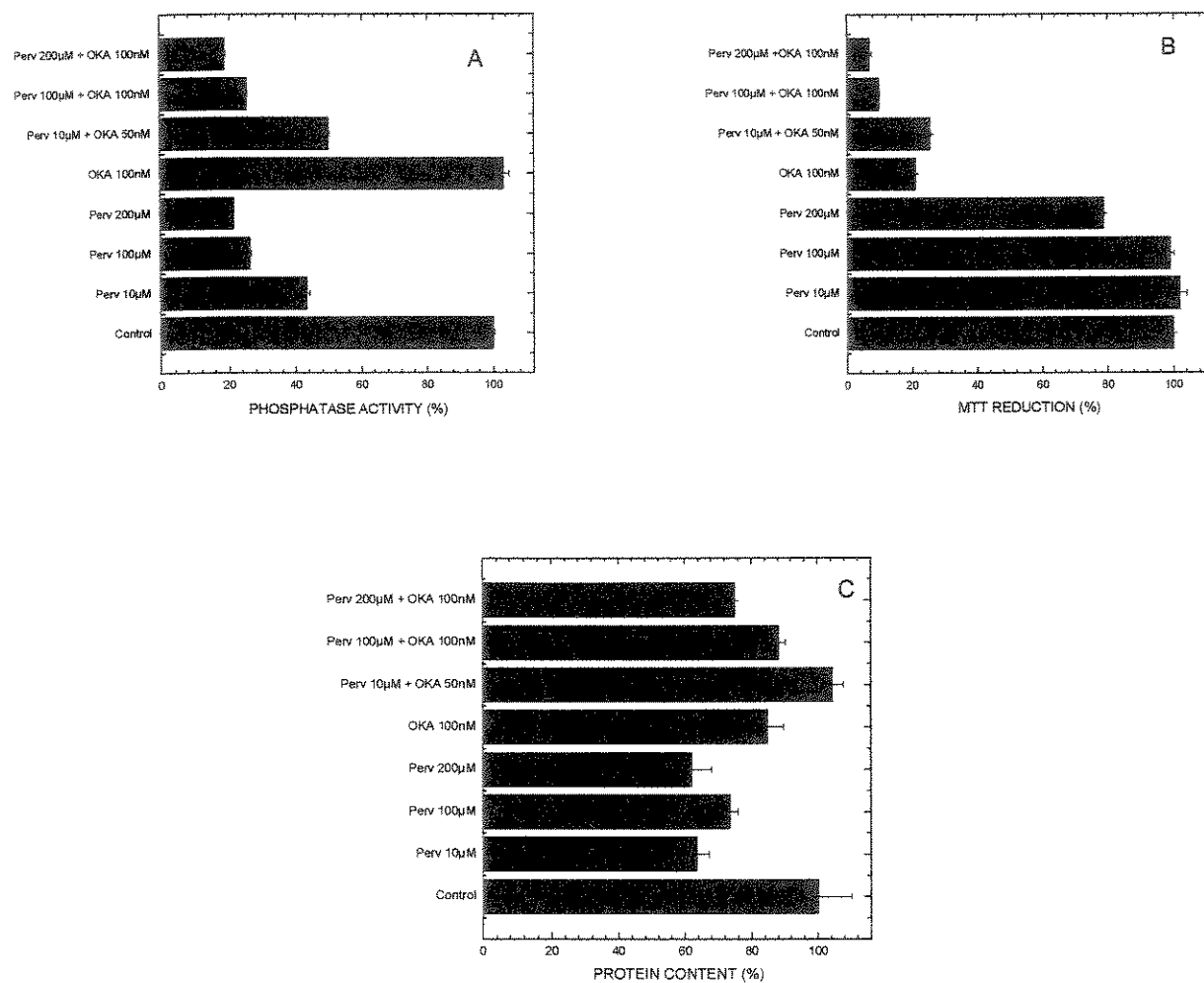


Figure 1 - Cytotoxic effect of pervanadate and okadaic acid on the HL60 cells. The graphics show the effects of the pervanadate (Perv) and okadaic acid (OKA) on the protein phosphatase activity (A), MTT reduction (B) and total protein content (C) on the HL60 cells. In the absence of compounds, all parameters were considered as 100%. All experiments were performed at plate of 24 wells, and the points shown in graph represent the mean \pm standard deviation of at least three experiments run in triplicate ($p < 0.05$)

DISCUSSION

Previous studies in our laboratory showed that the major phosphatase obtained from HL60 cells, was strongly inhibited by pervanadate ($IC_{50} = 5 \mu M$) and this enzyme presented high affinity by the substrate tyrosine phosphate (data not shown). Analyzing the cytotoxicity of the protein phosphatase inhibitors, using the phosphatase activity as parameter, it was observed a significant decrease of the enzyme activity in the presence of pervanadate (Figure 1A). When the cells were treated with this compound at

concentration of $10 \mu M$ the phosphatase activity decreased about 60%. However, protein phosphatase activity was not affected when the HL60 cells were treated with okadaic acid. These results agree with kinetic data indicating that the major phosphatase of HL60 cells is a protein tyrosine phosphatase because of its strong inhibition by pervanadate and the toxic effect of this phosphatase inhibitor could be related to inhibition of protein tyrosine phosphatase (data not shown).

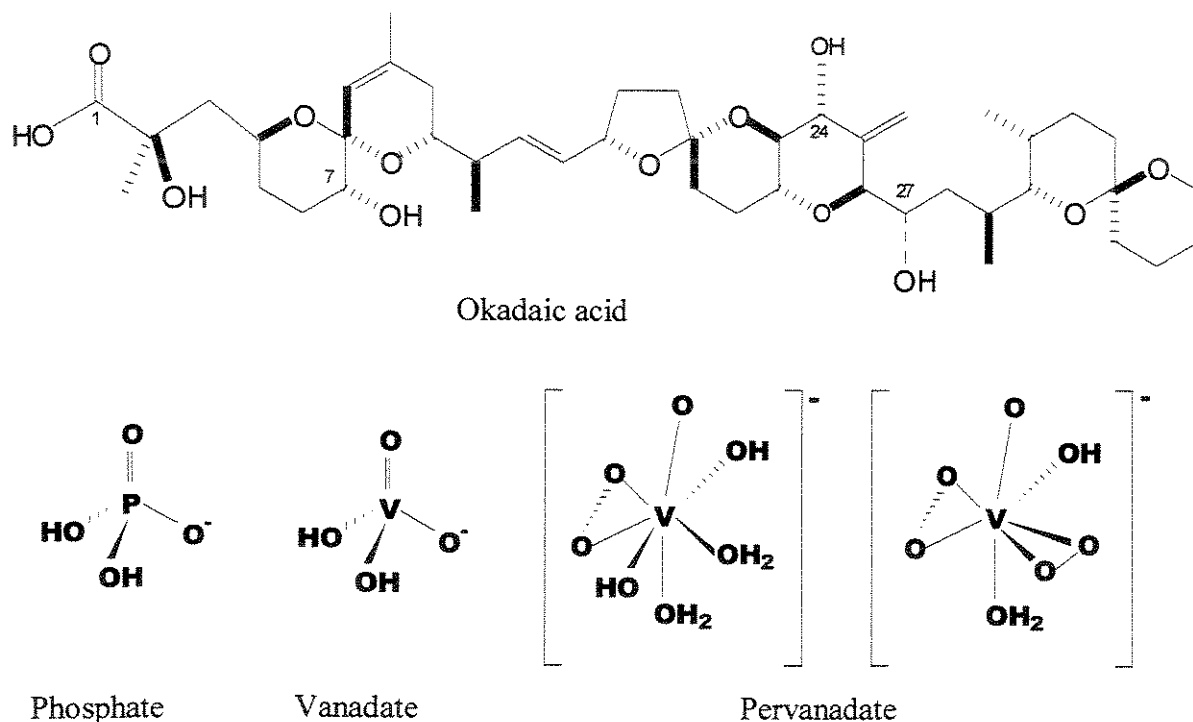


Figure 2 - Chemical structures of protein phosphatase inhibitors.

Protein phosphorylation-dephosphorylation is probably the most crucial chemical reaction taking place in living organisms and is the basis for the control of diverse biological events, such as metabolism regulation, gene expression, cell division and differentiation (Jia, 1997). Reversible protein phosphorylation is catalyzed by the opposing and dynamic action of protein kinases and phosphatases. Given the importance of protein phosphorylation in the context of cell function, abnormal protein phosphatase activity has been implicated in several diseases, as cancer (Harrison *et al.*, 1999). The role of tyrosine phosphorylation in mitogenic signaling is well documented, and one would predict that vanadate and pervanadate may act as a growth stimulator. Several studies often show enhanced tyrosine phosphorylation of various endogenous cellular proteins and/or activation of signaling molecules such as phosphatidylinositol-3-kinase and mitogen-activated protein kinase. At the same time, however, a number of reports indicate that vanadate may inhibit cell proliferation (inhibiting for example, *cdc25*), and vanadium compounds have been proposed as potential chemotherapeutic agents to inhibit tumor cell growth (Kawakami *et al.*, 1996; Bernier and Wang, 1996; Zolnierowicz, 2000).

Mitochondrial function was significantly affected by okadaic acid, which inhibited 80% the MTT reduction at concentration of 100nM (Figure 1B). Some authors reported that this toxin causes the destabilization of this organelle membrane by lipoperoxidation altering the energy production (Cortizo *et al.*, 2000; Leira *et al.*, 2001). Then, the cytotoxic effect of this toxin on the HL60

cells could be due to its action on the mitochondrial membrane potential.

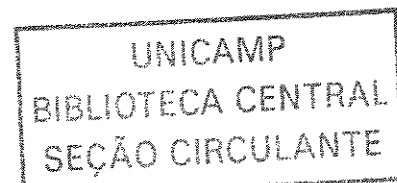
In relation to the action of pervanadate on the MTT reduction analysing the Figure 1B, no significant effect was observed. However, when we compare this result with the cell number, there was a strong stimulation of the MTT reduction, because in the concentration of 100 μ M the cell number decreased about 30% in relation to non-treated cells. Mosmann (1983) demonstrated that MTT reduction is directly proportional to cell number (non treated), however in cytotoxic assays sometimes its not observed. This because a drug can have different cell's targets. However, in the presence of the drug the redox state of mitochondria can increase the succinate dehydrogenase expression causing artefact in the analyse (mitochondrial function) (Penta *et al.*, 2001).

According to these results we can suggest that the cytotoxicity of pervanadate and okadaic acid could be due to the effect on the cell signal pathways in which protein tyrosine phosphatases are involved (Kawakami *et al.*, 1996).

ACKNOWLEDGEMENTS. This work was supported by grants from FAPESP.

REFERENCES

- Aoyama, H., Melo, P.S., Granjeiro, P.A., Haun, M., Ferreira, C.V., 2000. Cytotoxicity of okadaic acid and kinetic characterization of protein tyrosine phosphatase activity in V79



- fibroblasts. *Pharm. Pharmacol. Comm.* 6, 331-334.
- Bernier, L., Wang, E., 1996. A prospective view on phosphatases and replicative senescence. *Exp. Gerontol.* 31, 13-19.
- Cantley, L.C., Auger, K.R., Carpenter, C., Duckworth, B., Graziani, A., Kapeller, R. Soltoff, S., 1991. Oncogenes and signal transduction. *Cell* 64, 281-302.
- Cingi, M.R., Angelis, I., Fortunati, E., Reggiani, D., Bianchi, V., Tiozzo, R., Zucco, F., 1991. Choice and standardization of test protocols in cytotoxicity: a multicentre approach. *Toxic. In Vitro* 5, 119-125.
- Cortizo, A.M., Bruzzone L., Molinuevo, Etcheverry, S.B., 2000. A possible role of oxidative stress in the vanadium-induced cytotoxicity in the MC3T3E1 osteoblast and UMR106 osteosarcoma cell lines. *Toxicology* 147, 89-99.
- Groth, T., Falck, P., Miethke, R.R., 1995. Cytotoxicity of biomaterials – basic mechanisms and in vitro test methods: a review. *ATLA* 23, 790-799.
- Harrison S., Page, C.P., Spina, D., 1999. Airway nerves and protein phosphatases. *Gen. Pharmacol.* 32, 287-298.
- Hartree, E.F., 1972. Determination of proteins: a modification of the Lowry method that give a linear photometric response. *Anal. Biochem.* 48, 422-427.
- Huyer, G., Liu, S., Kelly, J., Moffat, J., Payette, P., Kennedy, B., Tsapralis, G., Gresser, M.J., Ramachandran, C., 1997. Mechanism of inhibition of protein-tyrosine phosphatases by vanadate and pervanadate. *J. Biol. Chem.* 10, 843-851.
- Jia, Z., 1997. Protein phosphatases: structures and implications. *Biochem. Cell Biol.* 75, 17-26.
- Kawakami, N., Shimohama, S., Hayakawa, T., sumida, Y., Fujimoto, S., 1996. Tyrosine phosphorylation and translocation of phospholipase C- γ 2 in polymorphonuclear leukocytes treated with pervanadate. *Biochim. Biophys. Acta* 1314, 167-174.
- Konoki, K., Sugiyama, N., Murata, M., Tachibana, K., Hatanaka, Y., 2000. Development of Biotin-Avidin Tecnology to Investigate Okadaic Acid-Promoted Cell Signaling Pathway. *Tetraedron* 56, 9003-9014.
- Leira, F., Vieites, J.M., Vieytes, M.R., Botana, L.M. 2001. Apoptotic events induced by the phosphatase inhibitor okadaic acid in normal human lung fibroblasts. *Toxicol. in vitro* 15, 199-208.
- Levy Toledano, R., Wertheimer, E., 1992. Mutations in the insulin receptor gene. *Endocrinol. Rev.* 13, 566-595.
- Mayer, A.M.S., Choudhry, M.A., Sayeed, M.M., Spitzer, J.A., 1997. The marine toxin okadaic acid reduces O_2^- generation and tyrosine phosphorylation in Lps-primed rat neutrophils. *Pharmacol. Lett.* 61, 199-204.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Meth.* 65, 55-63.
- Parnetti, L, Senin, U & Meccoci, P (1997). Cognitive enhancement therapy for Alzheimer's disease. The way forward. *Drugs* 53, 752-768.
- Penta, J.S., Johnson, F.M., Wachsman, J.T., Copeland, W.C., 2001. Mitochondrial DNA in human malignancy. *Mut. Res.* 488, 119-133.
- Taylor, S.I., Cama, A., Accili, D., Barbetti, R., Quon, M.J., Sierra, M., Suzuli, Y., Koller, E., Levy Toledano,

- R., Wertheimer, E., 1992. Mutations in the insulin receptor gene. *Endocrinol. Rev.*, 13, 566-595.
- Tsiani, E., Fantus, I.G., 1997. Vanadium compounds biological actions and potential as pharmacological agents. *Trends endocrinol. Metabol.* 8, 51-58.
- Uzunoglu, S., Uslu, R., Tobu, M., Saydam, G., Terzioglu, E., Buyukkececi, F., omay, S.B., 1999. Augmentation of methylprednisolone-induced differentiation of myeloid leukemia cells by serine/threonine protein phosphatase inhibitors. *Leuk. Res.* 23, 507-512.
- Vepa, S., Scribner, W.M., Natarajan, V., 1997. Activation of protein phosphorylation by oxidants in vascular endothelial cells: identification of tyrosine phosphorylation of caveolin. *Free Rad. Biol. Med.* 22, 25-35.
- Zolnierowicz, S., 2000. Type 2A protein phosphatase, the complex regulator of numerous signaling pathways. *Biochem. Pharmacol.* 60, 1225-1235.

2º Artigo (submitted to *Planta Medica*)**CYTOTOXIC EFFECT OF THE DITERPENE LACTONE DEHYDROCROTONIN FROM *CROTON CAJUCARA* ON HUMAN PROMYELOCYTIC LEUKEMIA CELLS**

Ana Claudia Galvão Freire¹; Patrícia da Silva Melo¹; Hiroshi Aoyama¹; Marcela Haun¹; Nelson Durán²; Carmen Veríssima Ferreira¹

¹ Department of Biochemistry, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), CP 6109, Campinas, SP 13083-970, Brazil

² Biological Chemistry Laboratory, Institute of Chemistry, State University of Campinas (UNICAMP), CP 6154, Campinas, SP 13081-970, Brazil

ABSTRACT

Diterpenes present potent antineoplastic properties against human and murine carcinoma cell lines. *Trans*-dehydrocrotonin from *Croton cajucara*, a Brazilian medicinal plant, is a nor-diterpene with antiulcerogenic activity. In this work, we examined the effect of *trans*-dehydrocrotonin (*t*-DCTN) on the vitality of HL60 cells by assessing the MTT reduction, protein content and phosphatase activity of these cells. Protein quantification indicated that *t*-DCTN reduced the number of cells with an IC₅₀ of 500 µM; mitochondrial function (MTT reduction), was also inhibited (IC₅₀ = 300 µM), when the cells were treated for 24h. In contrast, when the cells were treated with this lactone in the initial plating and cultured for 96 h the *t*-DCTN was more toxic for all parameters analyzed: MTT and phosphatase activity (IC₅₀ = 180 µM) and protein content (IC₅₀ = 150 µM). The flavonoid utilized as positive control was the myricetin. and the following IC₅₀ values were obtained after 24h of treatment: 300 and 192 µM for protein content and MTT reduction, respectively. According to chemical characteristics of both compounds, the cytotoxic effect of *t*-DCTN could be explained through two mechanisms: adduct formation with DNA and proteins and/or oxidative stress induction.

Croton cajucara is a plant found in the Amazonian region, where it is used by local populations as a medicinal plant. A 19-nor-clerodane diterpene, *trans*-dehydrocrotonin, is an important bioactive compound isolated from the bark of *Croton cajucara* Benth (Euphorbiaceae), commonly known as sacaca (1). Previous studies have shown that this lactone (*t*-DCTN) - (Figure 1) has a similar diterpenolactone structure to that found in other *Croton* species, and that it has antiulcerogenic (2) and antineoplastic properties against Ehrlich tumour (1). Cytotoxic drug therapy remains the principal method for treating myeloid leukemia. One limitation with this therapy is its serious toxicity, including myelosuppression and immunodeficiency. Cytotoxic drug therapy should ideally achieve a balance between its efficacy and toxicity to leukemic and normal myelocytes (3). Phosphatases are hydrolases that catalyze the hydrolysis of monoester phosphates and are divided into three groups: acid phosphatase, alkaline phosphatase and protein phosphatase. Protein phosphorylation can be reversed by protein phosphatases, which are divided into serine/threonine phosphatases and tyrosine phosphatases, based on their substrate specificity (4). The aim of this work was to examine the cytotoxicity of *t*-DCTN *in vitro* by assessing its effect on MTT reduction [(3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)], protein content and protein tyrosine phosphatase activity. Previous studies in our laboratory showed that the major protein phosphatase from HL60 cell is a protein tyrosine phosphatase.

t-DCTN (Figure 1) was used at concentrations up to 500 μM prepared in

0.8% of DMSO. In this concentration DMSO did not affect the HL60 vitality.

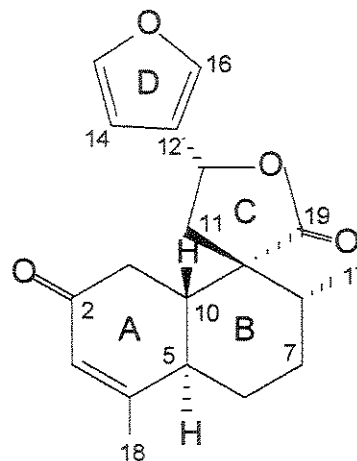


Figure 1 - Chemical structure of *trans*-dehydrocrotonin

As shown in Figure 2A, the IC_{50} values for the effect on protein content and MTT reduction were 500 μM and 300 μM , respectively. The decrease in protein content shown in Figure 2A and B induces cell death, probably through apoptosis. Mitochondrial function was also affected by *t*-DCTN, perhaps through an action on succinate dehydrogenase and/or a decrease in the cells number. In contrast to the other parameters, it was not possible to calculate an IC_{50} value for phosphatase activity. The influence of the length of exposure to *t*-DCTN on the above parameters was also examined. *t*-DCTN was more toxic when the cells were treated with the lactone during plating and for the next 96 h. Under in this condition were obtained the following IC_{50} values: MTT and phosphatase activity (180 μM) and protein content (150 μM) as shown in figure 2B and for myricetin IC_{50} values were 300 and 192 μM for protein content and MTT reduction, respectively (Figure 3).

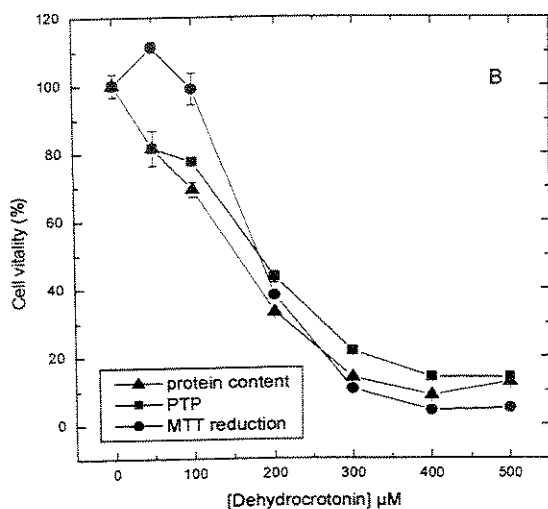
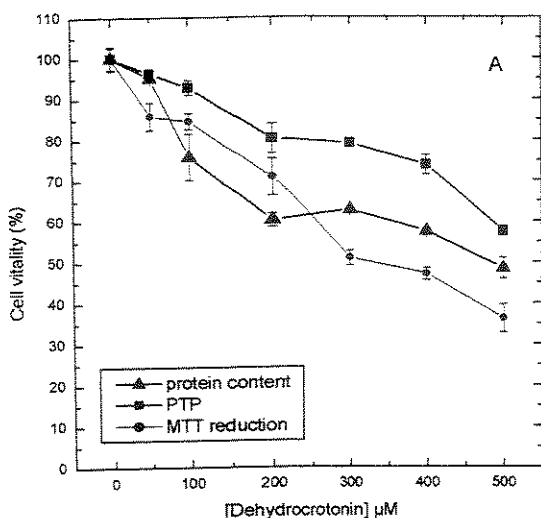


Figure 2 - Effect of *t*-DCTN on cell vitality. The curves show the effects of *t*-DCTN on MTT reduction, protein content and protein tyrosine phosphatase activity in HL60 cells. The inhibition was expressed relative to normal cell vitality (100%) and the points represent the mean \pm SD of at least three experiments run in quadruplicate ($p < 0.05$). Panels A and B show the cell vitality following treatment with *t*-DCTN for 24 h and 96 h, respectively.

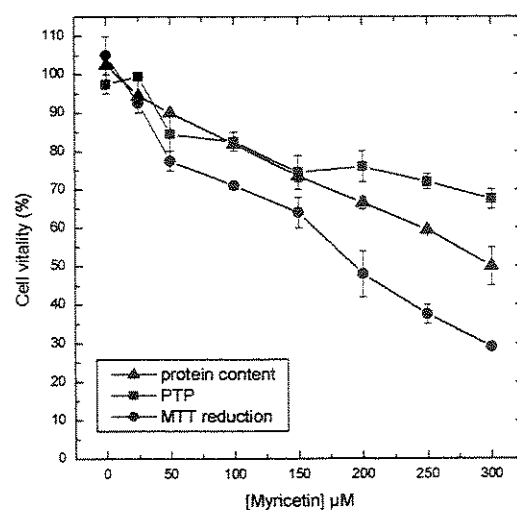


Figure 3 - Effect of myricetin on cell vitality. The curves show the effects of myricetin on MTT reduction, protein content and protein tyrosine phosphatase activity in HL60 cells. The inhibition was expressed relative to normal cell vitality (100%) and the points represent the mean \pm SD of at least three experiments run in quadruplicate. The figure shows the cell vitality following treatment with myricetin for 24 h.

Sesquiterpene lactones have functional groups that are responsible for their biological effects. The structure of *t*-DCTN contains three highly reactive functional groups: O=C-C=C (ring A), a lactone (ring C) and ciclo-pentenone (ring D). Since the structure of *t*-DCTN is not planar, the most available group is O=C-C=C, which can function as a Michael acceptor to interact with the SH groups of proteins, GSH and nitrogen bases, mainly guanine, through nucleophilic attack (5,6). Other diterpenes isolated from *C. incanus* and *Laetia corymbulosa* also presented cytotoxic effect on several tumour cell lines, and the authors suggested that their effect was due to interaction with macromolecules (7), (8). Furthermore, recently, some authors showed that several sesquiterpene lactones may generate a

reactive intermediate capable of damaging cellular constituents (8). The oxidative stress provoked by reaction of these compounds with molecular oxygen results in formation of hydrogen peroxide, altering the intracellular redox equilibrium. These data suggest that oxygen reactive species generated also play an important role in *t*-DCTN cytotoxicity.

In conclusion, analysing these results together, it is possible that the cytotoxic effect of *t*-DCTN could be due to formation of adducts with macromolecules and/or induction of oxidative stress.

MATERIALS AND METHODS

HL60 cells were kindly supplied by Dr. Rui Curi/Valdemir Vieira Colleone of the University of São Paulo (São Paulo, Brazil). The extraction of the powdered bark of *Croton cajucara* was carried out with hexane by a standard method and *t*-DCTN was characterized by spectroscopic methods as IR, UV, MS and ¹H- and ¹³C-NMR and [α]_D + 10.6° (CHCl₃, *c* 0.6) as recently described (1), (9). The purity was over 99% assessed by NMR (10), (11). Myricetin was obtained from Sigma Co. All other chemicals were of the highest purity available.

HL60 cells were routinely grown in suspension in RPMI (Roswell Park Memorial Institute) medium containing glutamine (0.200 g/L) and antibiotics (100 IU penicillin/mL, 100 µg streptomycin/mL) and supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, in a 5% CO₂ humidified atmosphere at 37°C. The cells were treated with *t*-DCTN in different time 96 h and 24 h. HL60 cells were inoculated with 3 x 10⁵ cells/mL (24-well tissue culture plates) and incubated with this drug for 96 h. When

the cells were treated only for 24 h, *t*-DCTN was added after 72 h of the cells plating, in this case the cell density was 9 x 10⁵ cells/mL. In both conditions, after 96 h the cytotoxicity assays (MTT reduction, protein quantification and phosphatase activity) were performed. The lactone was used in the concentration range of 50-500 µM. In all concentrations utilized the *t*-DCTN was prepared in 0.8% DMSO.

MTT assay: The medium containing *t*-DCTN was removed and 1 mL of MTT solution (0.5 mg MTT/mL of culture medium) was added to each well. After incubation for 4 h at 37°C, the medium was removed and the formazan solubilized in 1 mL of ethanol. The plate was shaken for 5 min on a plate shaker and the absorbance then measured at 570 nm (12), (13).

Protein phosphatase assay: The enzyme was obtained by lysing the cells with 1 mM acetate buffer, pH 5.5. The reaction mixture (final volume, 1 mL) contained 100 mM acetate buffer, pH 5.5, 5 mM p-nitrophenylphosphate and enzyme (cell extract). After a 30 min. incubation at 37°C, the reaction was stopped by adding 1 mL of 1 M NaOH. The amount of p-nitrophenol produced was measured at 405 nm (14).

Protein quantification: Protein concentrations were determined by a modification of the Lowry's method (15).

Statistical evaluation: All experiments were performed in triplicate and the results shown in graph represent the mean and standard deviation. Statistical significance/variance were determined by

Dunnett's test with the level of significance set at $p < 0.05$.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Proc. N° 00/09400-1.

REFERENCES

1. Grynberg NF, Echevarria A, Lima JE, Pamplona SSR, Pinto AC, Maciel MAM. Anti-tumour activity of two 19-norclerodane diterpenes, trans-dehydrocrotonin and trans-crotonin, from *Croton cajucara*. *Planta Medica* 1999; 65: 687-89
2. Hiruma-Lima CA, Spadari-Bratfisch RC, Kasisse DM, Souza-Brito ARM. Antiulcerogenic mechanisms of dehydrocrotonin, a diterpene lactone obtained from *Croton cajucara*. *Planta Medica* 1999; 65: 325-30
3. Breitman TR. Growth and differentiation of human myeloid leukaemia cell line HL60. *Methods in Enzymology* 1990; 190: 118-30
4. Krebs EG, Graves JD. Interactions between protein kinases and proteases in cellular signaling and regulation. *Advances in Enzymology and Regulation* 2000; 40: 441-70
5. Jodynis-Liebert J, Murias M, Bloszyk E. Effect of sesquiterpene lactones on antioxidant enzymes and some drug-metabolizing enzymes in rat liver and kidney. *Planta Medica* 2000; 66: 199-205
6. Narashimhan TR, Harindranath N, Premlata S, Kesava Murthy BS, Subba Rao PV. Toxicity of the sesquiterpene lactone Parthenin to cultured bovine kidney Cells. *Planta Medica* 1985; 194-97
7. Dimas K, Kokkinopoulos D, Demetzos C, Vaos B, Marselos M, Malamas M *et al.* The effect of sclareol on growth and cell cycle progression of human leukemic cell lines. *Leukemia Research* 1999; 23: 217-34
8. Beutler JA, McCall KL, Herbert K, Johnson T, Shoemaker RH, Boyd MR. Cytotoxic clerodane diterpene esters from *Laetia corymbulosa*. *Phytochemistry* 2000; 55: 233-36
9. Maciel MAM, Pinto AC, Brabo SN, Silva, MN. Terpenoids from *Croton cajucara*. *Phytochemistry* 1998; 49: 823-28
10. Rodriguez JA, Haun M. Cytotoxicity of trans-dehydrocrotonin from *Croton cajucara* on V79 cells and rat hepatocytes. *Planta Medica* 1999; 65: 522-26
11. Souza-Brito ARM, Rodríguez JA, Hiruma-Lima CA, Haun M, Nunes DS. Antiulcerogenic Activity of trans-Dehydrocrotonin from *Croton cajucara*. *Planta Medica* 1998; 64: 126-29
12. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *Journal of Immunological Methods* 1983; 65: 55-63
13. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods* 1986; 89: 271-77

14. Aoyama H, Melo PS, Granjeiro PA, Haun M, Ferreira CV. Cytotoxicity of okadaic acid and kinetic characterization of protein tyrosine phosphatase activity in V79 fibroblasts. *Pharmacy and Pharmacology Communications* 2000; 6: 331-34
15. Hartree EF. Determination of proteins: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry* 1972; 48: 422-27

Correspondence to: Dr. Carmen Veríssima Ferreira
Departamento de Bioquímica
Instituto de Biologia Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Cidade Universitária
Cep: 13083-970 Campinas, São Paulo
Brasil
Fax: 55-19-3788-6129
Tel: 55-19-3788-6140
e-mail: carmenv@unicamp.br

3º Artigo (submitted to *Leukemia Research*)**INFLUENCE OF PROTEIN PHOSPHATASE INHIBITORS ON HL60 CELLS DEATH INDUCTION BY DEHYDROCROTONIN**

Ana Claudia Galvão Freire*; Cristiane Fernandes de Assis*; Alexander Otto Frick*; Patrícia da Silva Melo*; Marcela Haun*; Hiroshi Aoyama*; Nelson Durán**; Mariana Melillo Sauer***; Ésper George Kallás*** and Carmen Veríssima Ferreira*.

*Department of Biochemistry, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), CP 6109, Campinas, SP 13083-970, Brazil

**Biological Chemistry Laboratory, Institute of Chemistry, State University of Campinas (UNICAMP), CP 6154, Campinas, SP 13081-970, Brazil

***Department of Infectoparasitaries Diseases (DIPA), Immunology Laboratory, EPM/UNIFESP, Brazil

Key words: pervanadate, okadaic acid, dehydrocrotonin, HL60, protein phosphatase, glutathione, differentiation, apoptosis

ABSTRACT

Oxidative stress caused by some compounds can be involved in several cellular responses, such as differentiation, apoptosis and necrosis. Therefore, in this work we evaluated the relationship between cellular redox status and a possible induction of differentiation and cell death, when HL60 cells were treated with dehydrocrotonin (DCTN) and in combination to phosphatases inhibitors (okadaic acid and pervanadate). For this purpose, we determined: total GSH content, differentiation (NBT reduction) and apoptosis induction through DNA fragmentation and phosphatidylserine translocation. Our results showed that DCTN slightly induced NBT-reducing activity (20%), in the presence of pervanadate (PERV) or okadaic acid (OKA) it was observed differentiation of these cells. According to the results obtained we suggest that the differentiation pathway involves the modulation of protein phosphatases. Flow cytometry analysis demonstrated that PERV presented no apoptosis induction. Apoptosis was induced when the cells were treated with okadaic acid (34%) and the addition of plus *t*-DCTN increased this effect (65%). Our data demonstrated the cell death by OKA, support the reported mitotic blockade due to inhibition of protein phosphatases (PP1 and PP2A) and this inhibition promotes the DCTN action on the apoptosis induction. When the cells were treated only with DCTN necrosis was observed. We can conclude that the DCTN effect depends on the PP1 and PP2A inhibition. On the other hand, the necrosis induced by DCTN could be due to oxidative stress, which was not prevented by increase of the GSH content observed in presence of this compound.

INTRODUCTION

Leukemic cell lines are useful tools to study factors and processes associated with their differentiation and apoptosis pathways. Particularly, HL60 cells have been widely used as cell models for studying the molecular and cellular aspects of hematopoietic differentiation (Li *et al.*, 1994). The finding that the terminal differentiation of neoplastic cells can be induced indicates that the malignant state is not an irreversible one and suggests that certain cancers may eventually be treated with agents that initiate terminal maturation, presumably with less morbidity than that produced by cytotoxic agents.

Previous studies have shown that the *trans*-dehydrocrotonin (*t*-DCTN), an important bioactive compound of *Croton cajucara*, presents antiulcerogenic and antitumour activity against Ehrlich tumour (Hiruma-Lima *et al.*, 1999; Grynberg *et al.*, 1999; Maciel *et al.*, 2000).

It has been well established that the reversible phosphorylation of proteins is a major regulatory mechanism in these processes. Accordingly, protein phosphatases may also be involved in the process of HL60 cell differentiation. The recent discovery of protein phosphatases inhibitors has proved invaluable in elucidating the function of protein phosphatases (Harrison *et al.*, 1999). Okadaic acid (OKA), a marine toxin is a potent and specific inhibitor of serine/threonine protein phosphatase PP1 and PP2 (Biajolan and Takai 1988) identified as an apoptosis inducer in several cell systems (Riordan *et al.*, 1998).

Vanadate inhibits protein tyrosine phosphatases, therefore resulting in accumulation of phosphorylated protein tyrosine residues in several cells (Gresser

and Tracey, 1990) thus, showing potential capacity in the regulation of different physiological processes such as cell growth and differentiation (Stern *et al.*, 1993, Cortizo *et al.*, 2000).

Exposure to oxidative stress can induce a wide series of responses ranging from increased mitosis to growth arrest, apoptosis, and finally to necrosis (Cadenas and Davies, 2000).

Therefore, the aim of the present study was investigate if redox changes are involved in a possible induction of differentiation and apoptosis, when HL60 cells were treated with dehydrocrotonin combined with phosphatases inhibitors. For this purpose, we determined: redox state (GSH quantification), cell differentiation (NBT reduction) and cell death induction (DNA fragmentation and phosphatidylserine translocation).

MATERIALS AND METHODS

MATERIALS

HL60 cells were generously supplied by Dr. Rui Curi/Valdemir Vieira Colleone from the University of São Paulo (São Paulo, Brazil). The phosphatases inhibitors (vanadate and okadaic acid) were purchased from Sigma Chemical Company.

METHODS

Preparation of pervanadate solution

Pervanadate was prepared by mixing equal volumes of 1 mM hydrogen peroxide and 1 mM sodium metavanadate and incubating the solution at room temperature for 20 min (Huyer *et al.*,

1997). At the end of this period, the solution was diluted in RPMI medium to the required concentration and used within 30 min.

Cell Culture

HL60 cells were routinely grown in suspension in RPMI medium containing glutamine 0.200g/L, antibiotics (100 IU penicillin/mL, 100 µg streptomycin/mL) and supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, in a 5% CO₂ humidified atmosphere at 37°C. For the following assays cells were inoculated with 3×10^5 cells/mL and incubated at 37°C (Uzunoglu *et al*, 1999). After 72h the cells were treated with pervanadate and okadaic acid.

Determination of GSH

The concentration of reduced glutathione of HL60 cells was determined after treatment of these cells for 24 hours. The cells (3×10^5 cells/mL) were washed with physiologic solution and lysed with water. To the lysate (2mL) were added 3 mL of precipitant solution [1.67g glacial metaphosphoric acid, 0.2g tetracetic ethilenediamine acid (EDTA) and 30g NaCl in 100mL milliQ water]. After 5 minutes, this mixture was centrifuged and 0.4 mL of the supernatant obtained was added to 1.6 mL of the reaction medium (0.2M Na₂HPO₄ buffer, pH8.0; 0.5mM DTNB dissolved in 1% sodium citrate), after 5 minutes the absorbance of the product (NTB) was measured at 412 nm. The GSH concentration was calculated using the extinction coefficient $\epsilon=13.6 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Torsoni and Ogo, 1998).

NBT reduction assay

After treatment of the HL60 cells with DCTN (360 µM), OKA (100 nM) and PERV (25 µM) for 24 h, the cells (1×10^6 cells/mL) were harvested by centrifugation and suspended in 100µL of NBT solution (4mg/mL). After the addition of 100µL of TPA (2 µg/mL) the cell suspension was incubated at 37°C for 20 minutes, 200µL of 1N HCl was added at 4°C to terminate the reaction. After centrifugation, 600µL of DMSO was added to the cell pellets to solubilize the formazan deposits. The amount of formazan was assayed spectrophotometrically at 560 nm (Kohroki *et al*, 1998).

Assessment of Apoptosis

Quantitative analysis of DNA fragmentation

The cell pellets (5×10^6) were lysed in 0.5mL of lysis buffer containing 5mM tris-HCl, 20mM EDTA and 0.5% triton X100 and then centrifuged at 5000rpm for 10 min. The pellet was resuspended in 250µL of lysis buffer. To the supernatants (S) 20µL de perchloric acid 6M were added. To the pellets (P) 500µL of 10% trichloroacetic acid (TCA) were added. The samples were centrifuged for 10 min at 5000 rpm and the pellets were resuspended in 250µL of 5% TCA, followed by incubation at 100°C for 15 min. Subsequently, to each sample, 500µL of solution [15mg/mL DPA in glacial acetic acid, 15µL/mL of sulfuric acid and 15µg/mL acetaldehyde were added and incubated at 37°C for 18 hours (Zhu *et al*, 1998).

The proportion of fragmented DNA was calculated from absorbance reading at 594nm using the formula:

% fragmented DNA = 100 X amount of the fragmented DNA in the supernatant / (amount of fragmented DNA in the supernatant + amount DNA in the pellets X 100.

Flow cytometry (using FITC-labeled Annexin V + PI)

HL60 cells cultured for 24 hours in absence or presence of DCTN, pervanadate and okadaic acid were washed twice in ice-cold PBS. 1×10^5 cells were then resuspended once in 200 μ L Binding Buffer (0,1M HEPES, pH 7.4, 14 M NaCl, 25mM CaCl₂) and annexin V-FITC (5 μ L) and PI (5 μ L) were added. Cells were then incubated for 15 minutes at room temperature in the dark and subsequently diluted with 400 μ L of Binding Buffer for flow cytometric analysis. Bivariate analysis was performed on a FACS Calibur (Becton Dickinson, Mountain View, USA) equipped with a single laser emitting excitation light at 488nm (Wyllie *et al*, 1980; Fadok *et al*, 1992a).

STATISTICAL EVALUATION: All experiments were performed in triplicate and the results shown in graph represent the mean and standard deviation. Statistical significance/variance were determined by Dunnett's or Tukey's test with the level of significance set at $P < 0.05$.

RESULTS

Differentiation Induction of the Human Promyelocytic Leukemia Cell by different compounds

HL60 cells were incubated with methylprednisolone (100 μ M), dehydrocrotonin (180 μ M), pervanadate (25 μ M) and okadaic acid (10nM) for 24 hours. Then, the maturation process of these cells was monitored by NBT reduction ability, which is a typical marker for the differentiation of myeloid leukemia cells (Breitman, 1990; Kohroki *et al*, 1998).

As shown in Figure 1, Methylprednisolone was considered as positive control, presenting 76,8% of differentiation. Dehydrocrotonin (DCTN) slightly induced NBT-reducing activity (20%). The addition of pervanadate and okadaic acid, two phosphatase inhibitors, to HL60 cells resulted in their differentiation. Pervanadate alone induced NBT reduction of 44,5% and okadaic acid caused increasing of NBT reduction of 118,7%.

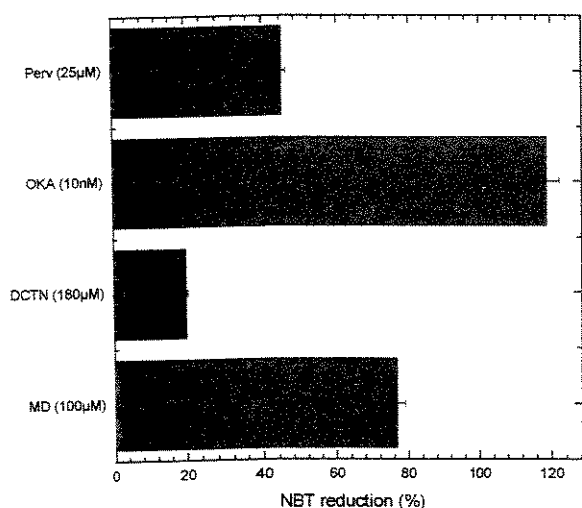


Figure 1 – Evaluation of differentiation induction of HL60 cells by DCTN and protein phosphatase inhibitors. Methylprednisolone (MD) was used as positive control of differentiation and percentages were calculated through of same. Cells were cultured with various compounds as indicated, for 24 hours. Values are means +/- SD. of three determinations ($p < 0.05$).

Assessment of apoptosis by dehydrocrotonin and phosphatase inhibitors

The DNA fragmentation was evaluated according to Zhu *et al*, 1998. HL60 cells DNA fragmentation was not observed after treatment with all compounds for 24h (data not shown).

However, it has been shown that morphologically evident apoptosis is not always necessarily accompanied by DNA fragmentation (Cohen *et al*, 1992). Double staining of cells with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated annexin V and propidium iodide (PI) in association with flow cytometry has been

proven to be a simple, rapid and valuable method for the quantification of apoptosis (Vermes *et al*, 1995). Annexin V binding detects loss of membrane phospholipid asymmetry due to exposure of phosphatidylserine on the outer leaflet of the plasma membrane occurring in the early phase of apoptosis, apparently regardless of the initiating stimulus (Martin *et al*, 1995). Moreover, a strong correlation of annexin V binding and morphological changes has been reported (Homburg *et al*, 1995). Concomitant staining with PI adds further information to this assay-system by identifying cells with the loss of membrane integrity that is characteristic for later phases of cell death (Schindl *et al*, 1998). To discriminate between apoptotic and necrotic cells, the annexin V-FITC binding assay was combined with PI vital staining. Figure 2 shows that positive stain for annexin V was observed with okadaic acid (34%). Other authors have demonstrated the okadaic acid-induced apoptosis of HL60 (Riordan *et al*, 1998).

After treatment with okadaic acid in combination with dehydrocrotonin almost all of HL60 cells were positive for annexin V (65, 28%).

Pervanadate, a protein tyrosine phosphatase inhibitor, presented no apoptosis induction.

It must be noted critically that completely fragmented cells are not included in flow cytometric analysis since cell debris is excluded from analysis by appropriate FLS threshold setting (Schindl *et al*, 1998). This can explain the fact of dehydrocrotonin although have presented quantity elevated of cell debris, not induced apoptosis or necrosis.

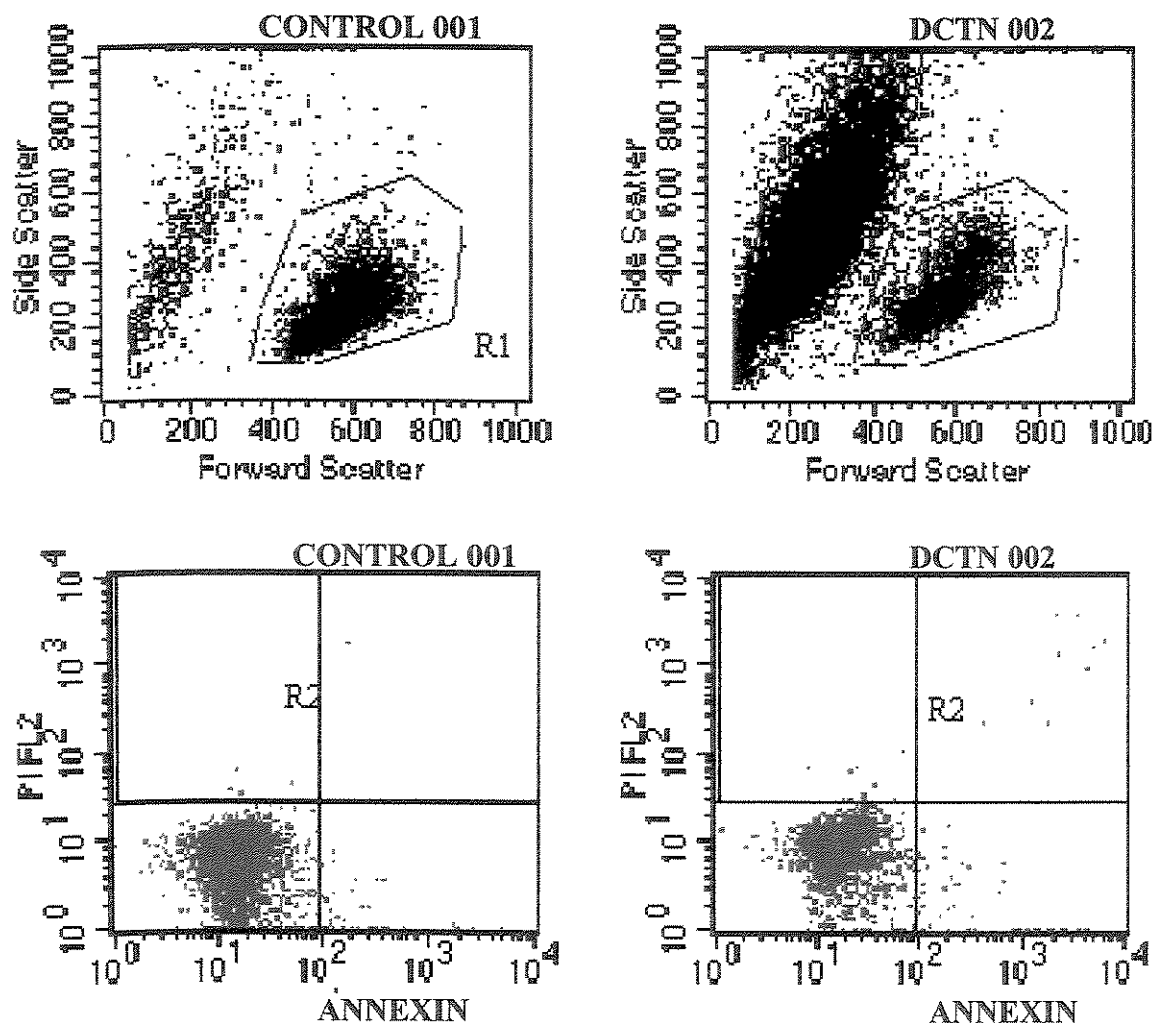


Figure 2A

Figure 2A, 2B and 2C – Flow cytometric analysis of HL60 cells treated with several compounds. Flow cytometry dot plots of the simultaneous binding of annexin V-FITC and propidium iodide (PI) uptake by HL60 cells maintained for 24h in DCTN (360 μ M), OKA (100 nM), PERV (25 μ M) and their combination. The lower left quadrant of each panel contains the viable cells (annexin -/PI -), the lower right quadrant represents the early apoptotic cells (annexin +/PI-) and the upper right quadrant shows the late apoptotic and necrotic cells (annexin +/PI +).

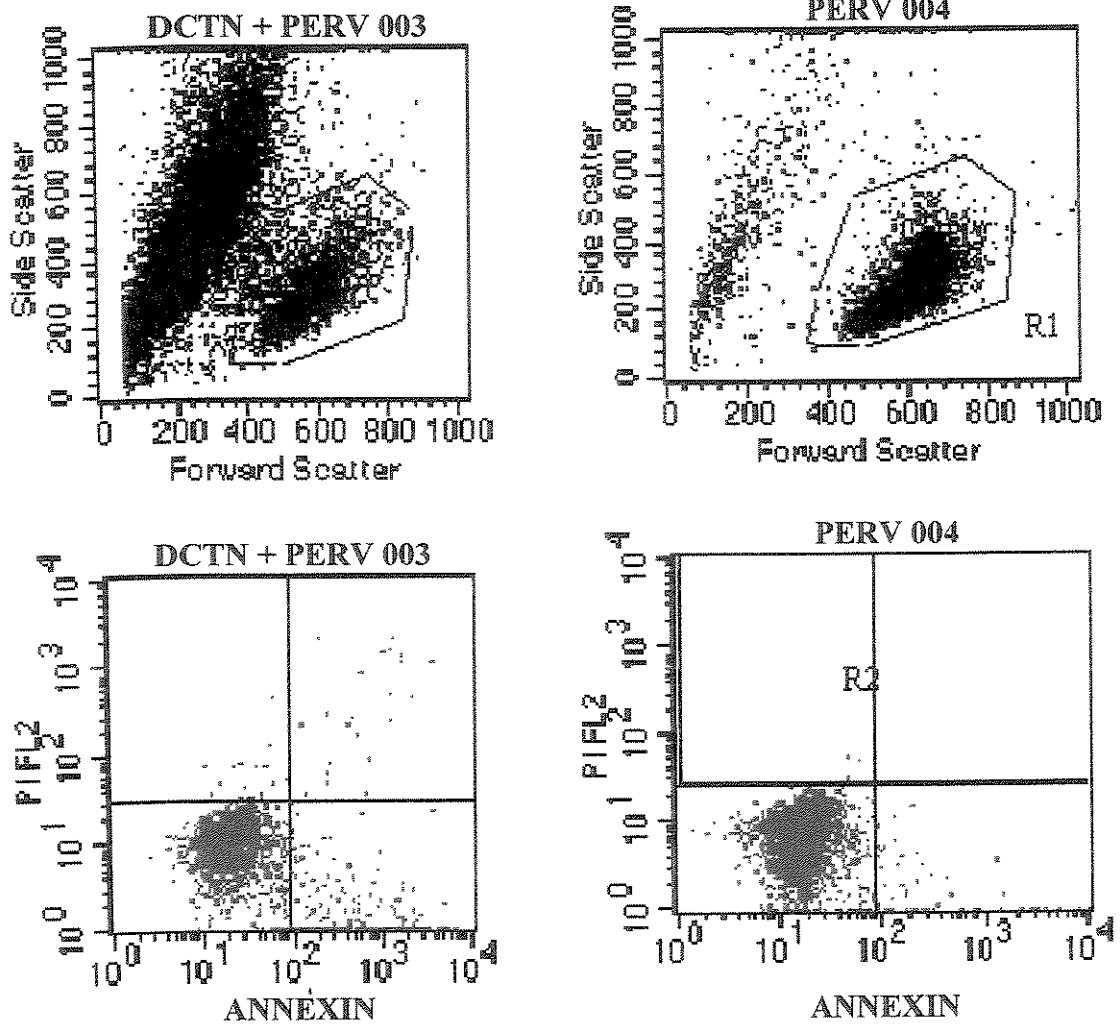


Figure 2B

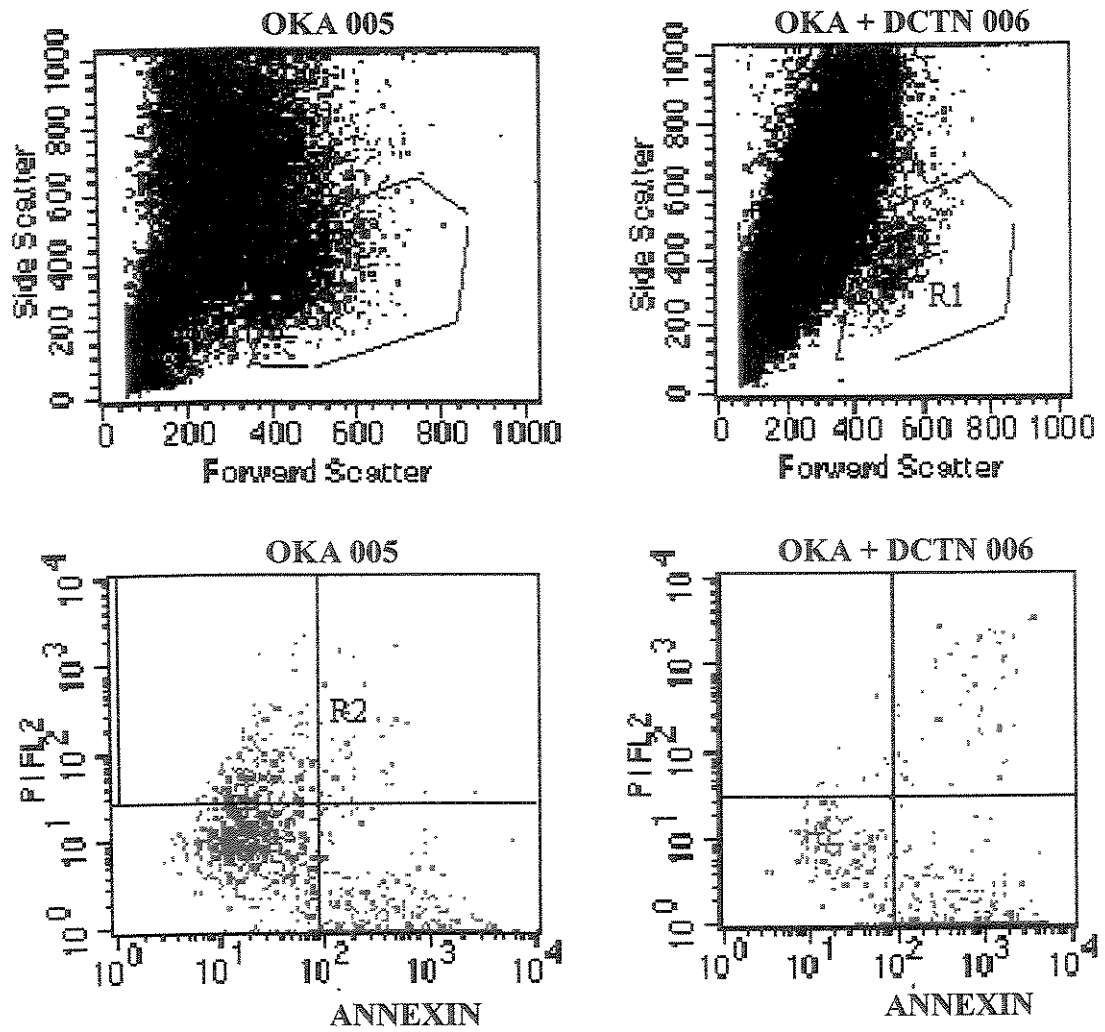


Figure 2C

Intracellular GSH measurements

Cellular GSH in HL60 has previously been determined (Xu and Thornalley, 2001). HL60 cells were incubated for 24 hours in presence of dehydrocrotonin (360 μ M), m-vanadate (25 μ M) and pervanadate (25 μ M), which caused a progressive elevation of reduced glutathione: 100% for dehydrocrotonin and m-vanadate, and 200% for pervanadate (Figure 3).

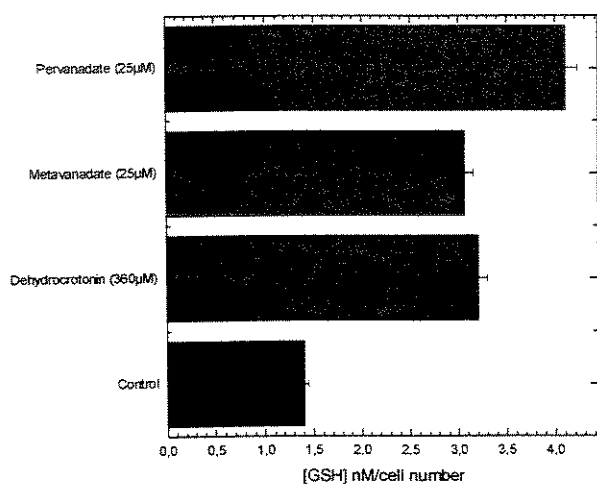


Figure 3 - Determination of reduced glutathione in HL60 cells. Cells were cultured with various compounds as indicated, for 24 hours. Values are means \pm SD. of three determinations ($p < 0.05$).

DISCUSSION

Most studies on the mechanism of induced differentiation in leukemia cells have used promyelocytic leukemia HL60 cells, but the discrete molecular events underlying early hematopoiesis are still

poorly understood. This is a useful system for analysis of the mechanism of granulocytic differentiation in hematopoietic cells (Shimizu *et al*, 1999).

Pervanadate, a protein tyrosine phosphatase inhibitor, induced 44,5% of differentiation. Such observation suggests that the pathway of induced differentiation involves the modulation of protein phosphatases. This because, in myeloblastic leukemia ML-1 cells which are at an earlier stage than HL60 cells, was detected remarkable decrease in *cdc 2A* gene expression during granulocytic differentiation (Shimizu *et al*, 1999).

Our results showed that OKA alone induced differentiation in HL60 cells as reported by others investigators (Uzunoglu *et al*, 1999).

Since most inducers of differentiation in leukemia cells are known to induce apoptosis (Kohroki *et al*, 1998); we examined whether the cell death caused by some compounds in HL60 cells was due to apoptosis. Then, analyzed cell death by DNA fragmentation and translocation of phosphatidylserine. During the normal maturation process of myeloid, apoptosis occurs as a physiological event. It is well known that matured granulocytes and erythrocytes undergo spontaneous apoptosis at the end of their lifespan (Steller, 1995; Kohroki *et al*, 1998).

In according to the results achieved in Figures 1 and 2, we can hypothesize that the poor induction of differentiation caused by dehydrocrotonin might be associated with the high concentration used (180 μ M). This because, in concentration of 360 μ M there are can indicative of necrosis and dead cells do not reduce NBT (Breitman, 1990). Perhaps, if we had used lower concentrations of this compound, had

been observed differentiation and apoptosis, instead of necrosis.

Some authors demonstrated that sesquiterpene lactones induce apoptosis in leukemic cells (Dirsch *et al*, 2001). We can suggest that necrosis occurred due to oxidative stress, which was not prevented by increase of the GSH content observed in presence of dehydrocrotonin. According to GSH quantification, is possible that the cytotoxic effect of sesquiterpene lactone could be due to changing in the redox state in these cells and as protein tyrosine phosphatases are modulated by oxidant agents, this DCTN action could be directly related to inhibition of PTP (Figure 3).

Our data demonstrating the increase cell death by okadaic acid, a phosphatase inhibitor (PP1 and PP2A) support the reported mitotic blockade due to this inhibition (Vandre and Wills, 1992). Okadaic acid has inhibitory effect on cdc-2 and cyclin A, which may contribute to its enhancing effects on methylprednisolone resulting in differentiation and cell death (Uzunoglu *et al*, 1999).

Protein phosphatases are involved in maintaining the expression of bcl-2 family genes as part of the survival machinery of the cells (Benito *et al*, 1997) and previous results demonstrating the augmentation of cell death by okadaic acid and caliculin-A may be explained by this mechanism (Uzunoglu *et al*, 1999). HL60 cells treated with DCTN died by necrosis, however, the combination of OKA with DCTN increased cell death by apoptosis. Therefore, we can suggest that the apoptosis induction by dehydrocrotonin depended on inhibition of protein serine/threonine phosphatases. Thus, this result provides information about the importance of protein

phosphatase activities modulation in leukemia treatment.

Apoptosis is required for proper tissue homeostasis. Defects in apoptosis signaling pathways, thus, contribute to carcinogenesis and chemoresistance. A major goal in chemotherapy is, therefore, to find cytotoxic agents that restore the ability of tumour cells to undergo apoptosis (Dirsch *et al*, 2001).

It is important to elucidate what kind of chemical mechanism of okadaic acid and pervanadate interfere with such cellular functions. This may reveal common pathway for the triggering of the induction of differentiation and/or apoptosis in cancer cells by chemical agents (Kohroki *et al*, 1998).

ACKNOWLEDGEMENTS. This work was supported by grants from FAPESP

REFERENCES

- Benito, A., Lerga, A., Silva, M., Leon, J. and Fernandez-Luna, J. L. (1997) **Apoptosis of human myeloid leukemia cells induced by an inhibitor of protein phosphatase (okadaic acid) is prevented by Bcl-2 and Bcl-X (L).** *Leukemia*. 11: 940-944.
- Bialojan, C. and Takai, A. (1988) **Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatase.** *Biochem*. 250: 283-290.
- Breitman, T. R. (1990) **Growth and differentiation of human myeloid leukemia cell line HL60.** *Method. In Enzymol*. 190: 118-130.
- Cadenas, E. and Davies, K. J. A. (2000) **Mitochondrial free radical**

- generation, oxidative stress, and aging.** *Free Radic. Biol. Med.* 29: 222-230.
- Cohen, G., Sun, X. M., Snowden, R. T., Dinsdale, D. and Skilleter, D. N. (1992) **Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation.** *Biochem. J.* 286: 331-334.
- Cortizo, A. M., Bruzzone, L., Molinuevo, S. and Etcheverry, S. B. (2000) **A possible role of oxidative stress in the vanadium-induced cytotoxicity in the MC3T3E1 osteoblast and UMR106 osteosarcoma cell lines.** *Toxicol.* 147: 89-99.
- Dirsch, V. M., Stuppner, H. and Vollmar, A. M. (2001a) **Helenalin triggers a CD95 death receptor-independent apoptosis that is not affected by overexpression of Bcl-X-L or Bcl-2.** *Cancer Research.* 61: (15) 5817-5823.
- Fadok, V. A., Voelker, D. R., Campbell, P. A., Cohen, J. J., Bratton, G. L. and Henson, P. M. (1992a) **Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages.** *J. Immunol.* 148: 2207-2216.
- Gresser, M. J., Tracey, A. S. (1990) **Vanadate as phosphate analogs in biochemistry.** In: Chasteen, N. D. (Ed.), *Vanadium in Biological Systems.* Kluwer, Dordrecht, Netherlands, pp.63-79.
- Grynberg, N. F., Echevarria, A., Lima, J. E., Pamplona, S. S. R., Pinto, A. C., Maciel, M. A. M. (1999) **Anti-tumour activity of two 19-norclerodane diterpenes, trans-dehydrocrotonin and trans-crotonin, from Croton cajucara.** *Planta Medica.* 65: 687-689.
- Harrison, S., Page, C. P. and Spina, D. (1999) **Airway nerves and protein phosphatases.** *Gen. Pharmacol.* 32: 287-298.
- Hiruma-Lima, C. A., Spadari-Bratfisch, R. C., Kasisse, D. M. and Souza-Brito, A. R. M. (1999) **Antiulcerogenic mechanisms of dehydrocrotonin, a diterpene lactone obtained from croton cajucara.** *Planta Med.* 65: 325-330.
- Homburg, C. H., Haas, M., von dem Borne, A.J., Reutelingsperger, C. P. and Roos, D. (1995) **Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire annexin V binding sites during apoptosis in vitro.** *Blood.* 85: 532-540.
- Huyer, G., Liu, S., Kelly, J., Moffat, J., Payette, P., Kennedy, B., Tsaprailis, G., Gresse, M. J. and Ramachandran, C. (1997) **Mechanism of inhibition of protein-tyrosine phosphatases by vanadate and pervanadate.** *J. Biol. Chem.* 10: 843-851.
- Kohroki, J., Muto, N., Tanaka, T., Itoh, N., Inada, A. and Tanaka, K. (1998). **Induction of differentiation and apoptosis by dithizone in human myeloid leukaemia cell lines.** *Leukemia Res.* 22: 405-412.
- Li, Y., Lafuente, A. and Trush, M. A. (1994) **Characterization of quinone reductase, glutathione and glutathione S-transferase in human myeloid cell lines: induction by 1,2-dithiole-3-thione and effects on hydroquinone-induced cytotoxicity.** *Life Sciences.* 54: 901-916.
- Maciel, M. A. M., Pinto, A. C., Arruda, A. C., Pamplona, S. G. S. R., Vanderlinde, F. A., Lapa, A. J., Echevarria, A., Grynberg, N. F., Cólus, I. M. S., Farias, R. A. F., Luna

- Costa, A. M. and Rao, V. S. N. (2000) **Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology: a successful combination in the study of *Croton cajucara***. *J. Ethnopharmacol.* 70: 41-55.
- Martin, S. J., Reutelingsperger, C. P. M., McGahon, A. J., Rader, J. A., vanSchie, R. G. A., LaFace, D. M., Green, D. R. (1995) **Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of bcl-2 and Abl**. *J. Exp. Med.* 182:1545-1556.
- Riordan, F. A., Foroni, L., Hoffbrand, A. V., Mehta, A. B., Wickremasinghe, R. G. (1998) **Okadaic acid-induced apoptosis of HL60 leukemia cells is preceded by destabilization of bcl-2 mRNA and downregulation of bcl-2 protein**. *Febs. Lett.* 435: 195-198.
- Schindl, A., Klosner, G., Hönigsman, H., Jori, G., Calzavara-Pinton, P.C. and Trautinger, F. (1998) **Flow cytometric quantification of UV-induced cell death in human squamous cell carcinoma-derived cell line: dose and kinetics studies**. *J. Photoch. Photobiol. B. Biol.* 44:97-106.
- Shimizu, T., Oka, Y., Awai, N. and Takeda, K. (1999) **Hypophosphorylation of pRB and repression of cyclin D3 and cdc25A during the granulocytic differentiation of human myeloblastic leukemia ML-1 cells**. *Leukemia Res.* 23: 901-907.
- Steller, H. (1995) **Mechanisms and genes of cellular suicide**. *Science.* 267: 1445.
- Stern, A., Yin, X., Tsang, S.-S., Davison, A. and Moon, T. (1993) **Vanadium as a modulator of cellular regulatory cascade and oncogene expression**. *Biochem. Cell. Biol.* 71:103:112.
- Torsoni, M. A., Viana, R. I. and Ogo, S. H. (1998) **Sulphydryl groups and their relation to the antioxidant enzymes of chelonian red blood cells**. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 46: 147-156.
- Uzunoglu, S., Uslu, R., Tobu, M., Saydam, G., Terzioglu, E., Buyukkececi, F. and Omay, S. B. (1999) **Augmentation of methylprednisolone-induced differentiation of myeloid leukemia cells by serine/threonine protein phosphatase inhibitors**. *Leukemia. Res.* 23: 507-512.
- Vandre, D. D. and Wills, V. L. (1992) **Inhibition of mitosis by okadaic acid: possible involvement of a protein phosphatase 2A in the transition from metaphase to anaphase**. *J. Cell. Sci.* 101: (1) 79.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., Reutelingsperger, C. (1995) **A novel assay for apoptosis. Flow cytometry detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V**. *J. Immunol. Methods.* 184: 39-51.
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F. and Currie, A. R. (1980) **Cell death: The significance of apoptosis**. *Intl. Rev. Cytol.* 68: 251-306.
- Xu, K. and Thornalley, P. J. (2001) **Involvement of glutathione metabolism in the cytotoxicity of the phenethyl isothiocyanate and its cysteine conjugate to human leukaemia cells *in vitro***. *Biochem. Pharmacol.* 61: 165-177.
- Zhu, W.-H., Majluf-Cruz, A. and Omburo, G. A. (1998) **Cyclic AMP-specific phosphodiesterase inhibitor**

rolipram and RO-20-1724 promoted apoptosis in HL-60 promyelocytic leukemic cells via cyclic AMP-independent mechanism. *Life sci.* 63: (4) 265-274.

5. DISCUSSÃO GERAL

5.1. CITOTOXICIDADE DE COMPOSTOS EM CULTURA DE CÉLULAS HL60

Como já foi dito anteriormente, a citotoxicidade de uma determinada substância pode ser avaliada através de vários parâmetros, os quais analisam a integridade da membrana, taxa de proliferação celular, metabolismo e funcionamento de organelas.

Neste trabalho analisamos a citotoxicidade da desidrocrotonina e inibidores de proteínas fosfatases sobre a cultura das células HL60, que por ser uma cultura em suspensão, os parâmetros utilizados foram: redução do MTT, dosagem de proteínas e atividade fosfatásica. Na tabela 2 estão resumidos os valores de IC₅₀ encontrados para cada um destes parâmetros.

Tabela 2

Efeito de compostos na viabilidade das células HL60

As células HL60 foram tratadas com desidrocrotonina (50-500 µM), pervanadato (25-250 µM) e ácido okadáico (10-100 nM) por 24h.

| Compostos | IC ₅₀ | | |
|----------------|------------------|-----------|----------|
| | MTT | Fosfatase | Proteína |
| DCTN | 300 µM | NE* | 500 µM |
| Pervanadato | 50 µM | 20 µM | 170 µM |
| Ácido Okadáico | 38 nM | NE | NE |

NE* = não encontrado

Os valores de IC₅₀ encontrados para as células HL60 quando tratadas com a desidrocrotina foram 500 e 300 µM para a quantificação de proteína e redução do MTT, respectivamente. Tais resultados indicam diminuição do número de células, bem como da função mitocondrial. Este efeito citotóxico foi tempo-dependente uma vez que o tratamento por 96h resultou na diminuição dos valores de IC₅₀. Esta inibição do crescimento celular por sesquiterpenos tem sido demonstrada para diversas linhagens tumorais (Lawrence *et al*, 2001).

O mecanismo de ação das sesquiterpeno lactonas tem sido atribuído a grupos específicos destas moléculas que podem atuar como agentes alquilantes e/ou oxidantes, alterando a função de macromoléculas e conseqüentemente, o metabolismo celular (Kupchan *et al*, 1971; LyB *et al*, 1998).

A metilprednisolona, um importante membro da família dos hormônios esteróides, é bem conhecida pelos vários efeitos nas células hematopoéticas e no microambiente da medula óssea (Hicsonmez *et al*, 1996). Este composto induz a diferenciação das células HL60 numa concentração de 10 µM (Uzunoglu *et al*, 1999). No entanto, como esta droga iria ser utilizada como controle positivo no estudo da capacidade de induzir diferenciação, tivemos como objetivo analisar a citotoxicidade deste glicocorticóide não esteroidal sobre as células HL60.

Embora clinicamente bem conhecida, os efeitos *in vitro* da metilprednisolona em diferentes linhagens de leucemia mielóide e os mecanismos para entender os seus efeitos ainda não estão esclarecidos. Este anti-inflamatório não esteroidal não apresentou efeito citotóxico sobre estas células (dados não mostrados), corroborando os dados previamente encontrados na literatura (Uzunoglu *et al*, 1999).

Inibidores de proteínas fosfatases (pervanadato e ácido okadáico) foram utilizados neste estudo com o objetivo de correlacionar a atividade destas fosfatases com o possível efeito citotóxico dos mesmos, já que estas enzimas estão envolvidas na regulação de diversos processos celulares, incluindo controle da divisão.

O pervanadato apresentou efeito citotóxico sobre as células HL60 quando analisamos a atividade fosfatásica total como parâmetro da viabilidade celular.

Alguns autores demonstraram que o vanadato potencializou a fosforilação da tirosina dependente de H_2O_2 em vários tipos celulares; tal potencialização pode ser explicada pela combinação dos efeitos inibitórios provocados por ambos oxidantes. De fato, a recente identificação e caracterização do complexo pervanadato gerado depois da mistura do vanadato com H_2O_2 , foi acompanhado por estudos demonstrando suas propriedades insulínomiméticas e foram os inibidores mais potentes de PTPs já identificados (Monteiro and Stern, 1996). Isto porque sabe-se que as proteínas tirosina fosfatases são altamente sensíveis a agentes oxidantes, por apresentarem uma sequência assinatura da qual faz parte um resíduo de cisteína, que é essencial para a catálise (Huyer *et al.*, 1997; Allen and Tresine, 2000). Estes resultados confirmam os dados cinéticos mostrados anteriormente, indicando que a fosfatase predominante das células HL60 é uma proteína tirosina fosfatase devido a forte inibição pelo pervanadato. Portanto, o efeito citotóxico deste inibidor poderia estar relacionado com a inibição desta enzima.

A atividade da fosfatase total não foi afetada quando as células HL60 foram tratadas com ácido okadáico até a concentração de 100 nM. Em relação à função mitocondrial, as células apresentaram apenas 20% de viabilidade na presença do ácido okadáico 100 nM. O efeito citotóxico desta toxina nas células HL60 poderia ser devido à sua ação na

mitocôndria uma vez que foi demonstrado que este forbol éster pode alterar o potencial da membrana mitocondrial (Leira *et al.*, 2001; Cortizo *et al.*, 2000). O ácido okadáico não apresentou efeito significativo sobre o número de células. No entanto, quando se compara a função mitocondrial e o conteúdo de proteína das células tratadas com pervanadato, houve uma estimulação da redução do MTT porque na concentração de 100 μ M de pervanadato o número de células diminuiu aproximadamente 30% em relação às células não tratadas, nesta mesma concentração a redução do MTT foi de 100%.

De acordo com Mosmann, a redução do MTT é diretamente proporcional ao número de células, porém em ensaios de citotoxicidade nem sempre esta linearidade é observada, pois existem vários fatores envolvidos. Podemos citar como exemplo, o local celular alvo para o efeito da droga, o poder oxidante ou redutor da droga, polaridade e biotransformação da droga.

5.2. PAPEL DO ESTRESSE OXIDATIVO NUMA POSSÍVEL INDUÇÃO DE DIFERENCIAÇÃO E APOPTOSE DAS CÉLULAS HL60

Os radicais livres são produzidos em níveis fisiológicos estando envolvidos em processos normais tais como divisão e diferenciação celular. Devido ao fato dos mesmos poderem causar danos nos ácidos nucleicos, proteínas ou fosfolipídios de membrana, vários processos patológicos estão relacionados com alterações do estado redox celular.

A resposta antioxidante celular define a consequência da ação dos radicais livres, pois dependendo da concentração dos mesmos, pode haver sinalização da diferenciação e morte celular por apoptose ou necrose.

Em relação ao conteúdo de GSH total das células HL60 tratadas com DCTN e pervanadato, observou-se um aumento significativo. Este resultado indica uma resposta celular antioxidante, pois alguns autores têm reportado que estes compostos podem induzir estresse oxidativo em diferentes tipos celulares. Os resultados obtidos na análise do tipo de morte celular por citometria de fluxo mostrou que o pervanadato não induziu apoptose nem necrose das células HL60 na concentração de 25 μ M. Este resultado reforça os dados previamente encontrados por LundJohansen e colaboradores (1996), que demonstraram que em presença deste inibidor de proteína tirosina fosfatase a apoptose de células hematopoiéticas foi inibida. Além disto, nestas condições foi observado um aumento significativo na concentração do GSH, o que também pode ter contribuído para a inibição da morte celular.

Desta forma, podemos hipotetizar que as células tratadas com a DCTN não apresentaram uma resposta antioxidante eficaz, uma vez que foi observada morte por necrose.

O ácido okadáico induziu apoptose das células HL60, este resultado já era esperado uma vez que este composto altera o potencial da membrana mitocondrial por causar mudança na permeabilidade da mesma, o que é uma das condições para a indução da apoptose. No entanto, a indução da apoptose pelo OKA foi estimulada na presença da DCTN. Podemos sugerir que para a DCTN induzir apoptose é necessário que haja inibição das proteínas serina/treonina fosfatases.

Os mecanismos de diferenciação de células mielóides são extremamente complexos e envolvem vários eventos regulatórios dependendo do indutor usado. Porém, as vias de indução da diferenciação não estão bem elucidadas, não havendo uma via comum para o mecanismo de ação de vários compostos, incluindo alguns agentes antineoplásicos (Chénais *et al*, 2000).

Como mostrado na tabela 3, se compararmos a capacidade de indução da diferenciação das células HL60 pela DCTN, ácido okadáico e pervanadato com a metilprednisolona, somente a DCTN não atuou como um efetivo agente indutor.

Tabela 3**Efeito de compostos na indução da diferenciação das células HL60**

As células HL60 foram tratadas por 24 horas com as concentrações indicadas de cada composto e a capacidade de reduzir o NBT foi determinada. O experimento foi realizado em triplicata.

| Composto | Redução do NBT (% Positividade) |
|---------------------------------|--|
| Metilprednisolona (100 μ M) | 76,8 (\pm 2) |
| Desidrocrotonina (180 μ M) | 20,0 (\pm 2) |
| Ácido okadáico (10nM) | 118,7 (\pm 1) |
| Pervanadato (25 μ M) | 44,5 (\pm 2) |

6. CONCLUSÕES

A metodologia utilizada na padronização da cultura de células HL60 foi adequada, uma vez que após 72h de incubação, as células HL60 estavam viáveis, já que menos de 5% das células incorporaram o corante azul de tripan (indicador da integridade da membrana).

Os estudos cinéticos revelaram que a fosfatase predominante no extrato obtido das células HL60 se trata de uma PTP.

A viabilidade celular analisada pela redução do MTT, conteúdo total de proteína e dosagem de fosfatase mostrou que a citotoxicidade do pervanadato pode ter sido devido principalmente à inibição da PTP. O ácido okadáico e a DCTN afetaram basicamente a função mitocondrial. Os ensaios de citotoxicidade revelam que a PTP das células HL60 pode servir como um parâmetro de viabilidade celular, podendo fornecer informações importantes sobre o metabolismo celular no que diz respeito ao balanço entre atividade quinásica e fosfatásica (fosforilação/desfosforilação) que é essencial para vários tipos de respostas celulares como: divisão, diferenciação, desenvolvimento celular e apoptose e regulação do metabolismo.

Dentre os compostos utilizados, somente o ácido okadáico mostrou uma eficiente capacidade de indução da apoptose das células HL60. Já a DCTN, na concentração de 360 μM , causou necrose.

No estudo de diferenciação, o melhor indutor foi o ácido okadáico, porém, a DCTN não apresentou efeito significativo.

Os níveis de GSH aumentaram em presença dos compostos utilizados neste estudo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu, A. S., Barbosa, P. S., Muller, A. H. and Guilhon, G. M. S. P. (2001). **Constituintes químicos do caule e das cascas do caule de *Croton Pullei* Var. *Glabrior* (Euphorbiaceae).** *Revista Virtual de Iniciação Acadêmica da UFPA*. 1: (2) 1-9.
- Alexander, A. (2000) **The CD45 tyrosine phosphatase: a positive and negative regulator of immune cell function.** *Sem. Immunol.* 12: 349-359.
- Allen, R. T., Hunter III, W. J. and Agrawal, D. K. (1997) **Morphological and Biochemical Characterization and analysis of apoptosis.** *J. Pharm. Toxic. Method.* 37: 215-228.
- Allen, R.G. and Tresini, M. (2000) **Oxidative stress and gene regulation.** *Free Radic. Biol. Med.* 28: 463-499.
- Aoyama, H., Melo, P. S., Granjeiro, P. A., Haun, M. and Ferreira, C. V. (2000) **Cytotoxicity of okadaic acid and kinetic characterization of protein tyrosine phosphatase activity in V79 fibroblasts.** *Pharm. Pharmacol. Comm.* 6: 331-334.
- Baksh, S. and Burakoff, S. J. (2000). **The role of calcineurin in lymphocyte activation.** *Sem. Immunol.*, 12: 405-415.
- Barbazuk S. M and Gold M. R. (1999) **Protein Kinase C-delta is a target of B-cell antigen receptor signaling.** *Immunology Letters.* 69: 259-267.
- Barford, D. (1996) **Molecular mechanism of the protein serine/threonine phosphatases.** *Trends Biochem. Sci.* 21: 407-412.
- Benito, A., Lerga, A., Silva, M., Leon, J. and Fernandez-Luna, J. L. (1997) **Apoptosis of human mieloid leukemia cells induced by an inhibitor of protein phosphatase (okadaic acid) is prevented by Bcl-2 and Bcl-X (L).** *Leukemia.* 11: 940-944.
- Bernier, L. and Wang, E. (1996) **A prospective view on phosphatase and replicative senescence.** *Experimen. Gerontol.* 31: 13-19.
- Beutler, J. A., McCall, K.L., Herbert, K., Johnson, T., Shoemaker, R. H. and Boyd, M. R. (2000) **Cytotoxic clerodane diterpene esters from *Laetia corymbulosa*.** *Phytochemistry.* 55: 233-236.
- Bialojan, C. and Takai, A. (1988) **Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatase.** *Biochem. J.* 256: (1) 283-290.

- Blagosklonny, M. V., Alvarez, M., Fojo, A. and Neckers, L. M. (1995) **bcl-2 protein downregulation is not required for differentiation of multidrug resistant HL60 leukemia cells.** *Leukemia Research.* 20: (2) 101-107.
- Brady-Kalnay, S. M., Rimm, D. L. and Tonks, N. K. (1995) **Receptor protein tyrosine phosphatase PTP μ associates with cadherins and catenins in vitro.** *J. Cell Biol.* 130: 977-986.
- Breitman, T. R. (1990) **Growth and differentiation of human myeloid leukemia cell line HL60.** *Method. In Enzymol.* 190: 118-130.
- Brewis, N. D., Street, A. J., Prescott, A. R. and Cohen, P. T. (1993) **PPX, a novel protein serine/threonine phosphatase localized to centrosomes.** *EMBO J.* 12: 987-996.
- Brien, M. L. O and Tew, K. D. (1996) **Glutathione and Related Enzymes in Multidrug Resistance.** *European Journal of Cancer.* 32A: (6) 967-978.
- Brown-Shimer, S., Johnson, K. A., Hill, D. E. and Bruskin, A. M. (1992) **Effect of protein tyrosine phosphatase 1B expression on transformation by the human neu oncogene.** *Cancer Res.* 52: 478-482.
- Buzzi, M., Lu, L., Lombardi, A. J., Posner, M. R., Brautigan, D. L., Fast, L. D. and Frackelton, A. R. (1992) **Differentiation-Induced Changes in Protein-Tyrosine Phosphatase-Activity and Commensurate Expression of CD45 in Human Leukemia-Cell Lines.** *Cancer Res.* 52: (14) 4027-4035.
- Cadenas, E. and Davies, K. J. A. (2000) **Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging.** *Free Radic. Biol. Med.* 29: 222-230.
- Cans, C.; Magano, R; Baribá, D.; Neubauer, G. and Surpeti-Furga, G. (2000) **Nuclear tyrosine phosphorylation: the beginning of a map.** *Biochem. Pharmacol.* 60: 1203-1215.
- Cantley, L.C., Auger, K.R., Carpenter, C., Duckworth, B., Graziani, A., Kapeller, R. Soltoff, S. (1991) **Oncogenes and signal transduction.** *Cell* 64: (2) 281-302.
- Chandra, J., Samali, A and Orrenius S. (2000) **Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress.** *Free Radical Biology & Medicine.* 29 (3/4) 323-333.

- Chénais, B., Andriollo, M., Guiraud, P., Belhoussine, R. and Jeannesson, P. (2000) **Oxidative stress involvement in chemically induced differentiation of K562 cells.** *Free Radical Biol. Med.* 28: (1) 18-27.
- Chinkers, M. (2001) **Protein phosphatase 5 in signal transduction.** *Trends Endocrinol. Met.* 12: 28-32.
- Chu, I. (1995) **Alternative methods to animal testing: A canadian health protection branch perspective.** *ATLA.* 23: 257-261.
- Cingi, M. R., De Angelis, I., Fortunati, E., Reggiani, D., Bianchi, V., Tiozzo, R. and Zucco, F. (1991) **Choice and standardization of test protocols in cytotoxicology: a multicentre approach.** *Toxicol. In Vitro.* 5: (2) 119-125.
- Clemedson, C., Mc Farlane-Abdulla, E., Andersson, M., Barile, F. A., Calleja, M. C., Chesné, C., Clothier, R., Cottin, M., Curren, R., Daniel-Szolgay, E., Dierickx, P., Ferro, M., Fiskesjo, G., Garza-Ocanäs, L., Gómez-Lechón, M. J., Gulden, M., Isomaa, B., Janus, J., Judge, P., Kahru, A., Kemp, R. B., Kerszman, G., Kristen, U., Kunimoto, M., Karenlampi, S., Lavrijsen, K., Lewan, L., Lilius, H., Ohno, T., Persoone, G., Roguet, R., Romert, L., Sawyer, T. W., Seibert, H., Shrivastava, R., Stamatii, A., Tanaka, N., Torres-Alanis, O., Voss, J. U., Wakuri, S., Walum, E., Wang, X., Zucco, F. and Ekwall, B. (1996) **MEIC evaluation of acute systematic toxicity. Part I: Methodology of 68 In Vitro toxicity assays used to test the first 30 reference chemicals.** *ATLA.* 24: 251-272.
- Cohen, G., Sun, X. M., Snowden, R. T., Dinsdale, D. and Skilleter, D. N. (1992) **Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation.** *Biochem. J.* 286: 331-334.
- Cohen, P. (1982) **The role of protein phosphorylation in neural and hormonal control of cellular activity.** *Nature.* 296: 613-620.
- Cohen, P. (1985) **The role of protein phosphorylation in the hormonal control of enzyme activity.** *Eur. J. Biochem.* 151: 439-448.
- Cohen, P. (1988) **Protein phosphorylation and hormone action.** *Proc. Roy. Soc. Lond. (Biol).* 234: 115-144.

- Cohen, P. (1989) **The structure and regulation of protein phosphatase.** *Annu Rev. Biochem.* 58: 453-508.
- Cohen, P. T. (1997) **Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life.** *Trends Biochem. Sci.* 22: 245-251.
- Collins, S. J., Ruscetti, F. W.; Gallagher, R. E. and Gallo, R. C. (1978) **Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75: 2458-2462.
- Cortizo, A. M., Bruzzone, L., Molinuevo, S. and Etcheverry, S. B. (2000) **A possible role of oxidative stress in the vanadium-induced cytotoxicity in the MC3T3E1 osteoblast and UMR106 osteosarcoma cell lines.** *Toxicol.* 147: 89-99.
- Cuncic, C., Desmarais, S., Detich, N. and Tracey, A. S. (1999). **Bis(N,N-dimethylhydroxamido)hydroxooxovanadate Inhibition of Protein Tyrosine Phosphatase Activity in Intact Cells.** *Biochem. Pharmacol.* 58: 1859-1867.
- Cyert, M. S. and Thorner, J. (1989) **Putting it on and taking it off: phosphoprotein phosphatase involvement in cell cycle regulation.** *Cell.* 57: 891-893.
- Da Cruze, B., Da Cruze, F. and Cohen, P. T. (1988) **Identification of a novel protein phosphatase catalytic subunit by cDNA cloning.** *FEBS Lett.* 242: (1) 106-110.
- Daranas, A.H; Norte, M. and Fernández, J.J. (2001) **Toxic marine microalgae.** *Toxicon.* 39: 1101-1132.
- Dawson, T. M., Steiner, J. P., Dawson, V. L., Dinerman, J. L., Uhl, G. R. and Snyder, S. H. (1993) **Immunosuppressant FK506 enhances phosphorylation of nitric oxide synthase and protects against glutamate neurotoxicity.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 9808-9812.
- Denizot, F. and Lang, R. (1986) **Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability.** *J. Immunol. Meth.* 89: 271-277.
- Denu, J. M., Stuckey, J. A. and Dixon, J. E. (1996) **Form and function in protein dephosphorylation.** *Cell,* 87: 361-364.

- Dimas K., Kokkinopoulos D., Demetzos C., Vaos B., Marselos M., Malamas M. and Tzavaras, T. (1999) **The effect of sclareol on growth and cell cycle progression of human leukemic cell lines.** *Leukemia Res.* 23: 217-234.
- Dirsch, V. M., Stuppner, H. and Vollmar, A. M (2001) **Helenalin triggers a CD95 death receptor-independent apoptosis that is not affected by overexpression of Bcl-X-L or Bcl-2.** *Cancer Research.* 61: (15) 5817-5823.
- Duff, S. M. G., Sarath, G. and Plaxton, W. C. (1994) **The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism.** *Physiol. Plant.* 90: 791-800.
- Enz, A. and Pombo Villar, E. (1997) **Class II pyrethroids: noninhibitors calcineurin.** *Biochem. Pharmacol.* 54: 321-323.
- Fadok, V. A., Voelker, D. R., Campbell, P. A., Cohen, J. J., Bratton, G. L. and Henson, P. M. (1992a) **Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers a specific recognition and removal by macrophages.** *J. Immunol.* 148: 2207-2216.
- Farias, R. A. F., Rao, V. S. N., Viana, G. S. B., Silveira, E. R., Maciel, M. A M and Pinto, A C. (1997) **Hypoglycemic effect of trans-dehydrocrotonin, a Nor-Clerodane Diterpene from Croton cajucara.** *Planta Medica.* 63: 558-560.
- Fauman, E. B. and Saper, M. A. (1996). **Structure and function of the protein phosphatases.** *Trends Biochem. Sci.*, 21: 413-417.
- Feldman, R. A., Lowy, D. R. and Vass, W. C. (1990) **Selective potentiation of C-fps/fes transforming activity by a phosphatase inhibitor.** *Oncogene Res.* 5: 187-197.
- Fernandez, J. J., Candenas M. L., Souto, M. L., Trujillo M. M. and Norte M. (2002). **Okadaic acid, useful tool for studying cellular processes.** *Current Medicinal Chemistry.* 9 (2): 229-262.
- Ferreira, C.V.; Granjeiro, J. M.; Taga, E. M. and Aoyama, H. (1998) **Soybean seed acid phosphatases: unusual optimum temperature and thermal stability studies.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 242: 282-286.
- Fischer, E. H., Charbonneau, H. and Tonks, N. K. (1991) **Protein tyrosine phosphatases: a diverse family of intracellular and transmembrane enzymes.** *Science.* 253: 401-406.

- Fischer, G., Witman Liebold, B., Lang, K., Kiefhaber, T. and Schmid, F. X. (1989) **Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins.** *Nature*. 337: 476-478.
- Freshney, R. I. (1994) **In culture of animal cells. A manual of Basic Techniques.** 3rd. Ed. *Wiley-Liss*.
- Ganapati, U., Gupta, S., Radha, V., Sudhakar, C., Manogaran, P.S. and Swarup, G. (2001) **A nuclear protein tyrosine phosphatase induces shortening of G1 phase and increase in c-myc protein level.** *Exp. Cell Res.* 265: 1-10.
- Garcia, A., Cayla, X. and Sontag, E. (2000) **Protein phosphatase 2A: a definite player in viral and parasitic regulation.** *Microbes and Infection*. 2: 401-407.
- Genoux, D., Haditsh, U., Knobloch, M., Michalon, A., Storm, D., Mansuy, I. M. (2002). **Protein phosphatase 1 is a molecular constraint on learning and memory.** *Nature*. 418 (6901): 970-975.
- Gottlieb, R. A. (2000) **Mitochondria: execution central.** *Febs Lett.* 482: 6-12.
- Granjeiro, J. M. (1994) **Purificação e caracterização da fosfatase ácida do rim bovino.** *Tese de Mestrado, Instituto de Biologia/UNICAMP*.
- Gresser, M. J., Tracey, A. S. (1990) **Vanadate as phosphate analogs in biochemistry.** In: *Chasteen, N. D. (Ed.), Vanadium in Biological Systems. Kluwer, Dordrecht, Netherlands,* pp.63-79.
- Groth, T., Falck, P. and Miethke, R. R. (1995) **Cytotoxicity of biomaterials—basic mechanisms and in vitro test methods: a review.** *ATLA*. 23: 790-799.
- Grynberg, N. F., Echevarria, A., Lima, J. E., Pamplona, S. S. R., Pinto, A. C. and Maciel, M. A. M. (1999) **Anti-tumour activity of two 19-norclerodane diterpenes, trans-dehydrocrotonin and trans-crotonin, from *Croton cajucara*.** *Planta Med.* 65: 687-689.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (1999) **Free radicals, 'reactive species' and toxicology.** In: *Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (Eds.), Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, Nova Iorque,* pp.544-616.

- Hanson, R. L., Lardy, H. A. and Kupchan, S. M. (1970) **Inhibition of phosphofruktokinase by quinone methide and alpha-methylene lactone tumor inhibitors.** *Science.*,168: 368-378
- Harrison, S., Page, C. P. and Spina, D. (1999) **Airway nerves and protein phosphatases.** *Gen. Pharmacol.* 32: 287-298.
- Hartree, E. F. (1972) **Determination of proteins: a modification of the Lowry method that give a linear photometric response.** *Anal. Biochem.* 48: 422-427.
- Heeder van, W.L., Robert-Offerman, S., Dumond, E., Hofstra, L., Doevendans, P.A., Smits, J.F.M., Daemen, M.J.A.P. and Reutelingsperger, C.P.M.(2000). **Markers of apoptosis in cardiovascular tissues: focus on annexin V.** *Cardiovasc. Res.* 45:549-559.
- Hicsonmez, G., Erdemli, E. and Tekelioglu, M. (1996) **Morphologic evidence of apoptosis in childhood acute myeloblastic leukemia treated with high-dose methylprednisolone.** *Leuk. Lymphoma.* 22: 91-98.
- Hiruma-Lima, C. A. , Spadari-Bratfisch, R. C., Kasisse, D. M. and Souza-Brito, A. R. M. (1999) **Antiulcerogenic mechanisms of dehydrocrotonin, a diterpene lactone obtained from croton cajucara.** *Planta Med.* 65: 325-330.
- Homburg, C. H., Haas, M., von dem Borne, A.J., Reutelingsperger, C. P. and Roos, D. (1995) **Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire annexin V binding sites during apoptosis in vitro.** *Blood.* 85: 532-540.
- Honkanen, R. E., Stapleton, J. D., Bryan, D. E. and Abercrombie, J. (1996) **Development of a protein phosphatase-based assay for the detection of phosphatase inhibitors in crude whole cell and animal extracts.** *Toxicol.* 34: (11) 1385-1392.
- Huchon, D, Ozon, R. and Demaille, J. G. (1981) **Protein phosphatase-1 is involved in Xenopus oocyte maturation.** *Nature.* 294: 358-359.
- Hunter, T. (2000) **Signaling—2000 and beyond.** *Cell.* 100:113–127.
- Huyer,G., Liu, S., Kelly, J., Moffat, J., Payette, P., Kennedy, B., Tsapralis, G., Gresse, M. J. and Ramachandran, C. (1997) **Mechanism of inhibition of protein-tyrosine phosphatases by vanadate and pervanadate.** *J. Biol. Chem.* 10: 843-851.

- Ingebritsen, T. S. and Cohen, P. (1983) **Protein phosphatases: properties and role in cellular regulation.** *Science.* 221: 331-338.
- Ishihara, H., Ozaki, H., Sato, K., Hori, M., Karaki, H., Watabe, S., Kato, Y., Fusetani, M., Hashimoto, K. and Uemura, D. (1989b) **Calcium-independent activation of contractile apparatus in smooth muscle by calyculin-A.** *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 250: 388-396.
- Jia, Z. (1997) **Protein phosphatase: structure and implications.** *Biochem. Cell Biol.* 75: 17-26.
- Jin, N.; Hatton, N.D.; Harrington, M.A.; Xia, X.; Larsen, S.H. and Rhoades, R.A. (2000) **H₂O₂-induced EGR-1, Fra-1, and C-Jun gene expression is mediated by tyrosine kinase in aortic smooth muscle cells.** *Free Rad. Biol. Med.* 29: 736-746.
- Jodynis-Liebert, J., Murias, M., Bloszyk, E. (2000) **Effect of sesquiterpene lactones on antioxidant enzymes and some drug-metabolizing enzymes in rat liver and kidney.** *Planta Medica.* 66: 199-205.
- Kawada, M., Amemiya, M., Ishizuka, M. and Takeuchi, T. (1999) **Cytostatin, an inhibitor of cell adhesion to extracellular matrix, selectively inhibits protein phosphatase 2A.** *Biochim. Biophys. Acta.* 1452: 209-217.
- Kawakami, N., Shimohama, S., Hayakawa, T., Sumida, Y., Fujimoto, S. (1996) **Tyrosine phosphorylation and translocation of phospholipase C- γ 2 in polymorphonuclear leukocytes treated with pervanadate.** *Biochim. Biophys. Acta.* 1314: 167-174.
- Kenner, K. A., Hill, D. E., Olefsky, J. M. and Kuasri, J. (1993). **Regulation of protein tyrosine phosphatases by insulin and insulin-like growth factor I.** *J. Biol. Chem.* 268: 25455-25462.
- Kimpinski, K., Jelinski, S. and Mearow, K. (1999) **The anti-P75 antibody, MC192, and brain-derived neurotrophic factor inhibit nerve growth factor-dependent neurite growth from adult sensory neurons.** *Neuroscience.* 93: (1) 253-263.
- Kitajima, K., Haque, M., Nakamura, H., Hirano, T. and Utiyama, H. (2001). **Loss of irreversibility of granulocytic differentiation induced by dimethyl sulfoxide in HL-60 sublines with a homogeneously staining region.** *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 288:1182-1187.

- Kohroki, J., Muto, N., Tanaka, T., Itoh, N., Inada, A. and Tanaka, K. (1998). **Induction of differentiation and apoptosis by dithizone in human myeloid leukaemia cell lines.** *Leukemia Res.* 22: 405-412.
- Konoki, K., Sugiyama, N., Murata, M., Tachibana, K. and Hatanaka, Y. (2000) **Development of Biotin-Avidin Tecnology to Investigate Okadaic Acid-Promoted Cell Signaling Pathway.** *Tetrahedron.* 56: 9003-9014.
- Krebs, E. G. and Graves, J. D. (2000) **Interactions between protein kinases and proteases in cellular signaling and regulation.** *Advan. Enz. Regul.* 40: 441-470.
- Kupchan, S. M., Eakin, M. A. and Tomas, A. M. (1971) **Tumor inhibitors. 69. Structure-Cytotoxicity Relationships among the Sesquiterpene Lactones.** *J. Med. Chem.* 14: 1147-1152.
- Laidler, P.M.; Taga, E.M. and Van Etten, R.L. (1982) **Human liver acid phosphatases: Cysteine residues of the low-molecular-weight enzyme.** *Arch. Biochem. Biophys.* 216: 512-521.
- Lawrence, N. J., McGown, A. T., Nduka, J., Hadfield, J. A. and Pritchard, R. G. (2001) **Cytotoxic Michael-type amine adducts of α -methylene lactones alantolactone and isoalantolactone.** *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11: 429-431.
- Lee, R.B. (1988) **Phosphate influx and extracellular phosphatase activity in barley roots and rose cells.** *New Phytol.* 109: 141-148.
- Leira, F., Vieites, J. M., Vieytes, M. R., Botana, L. M. (2001) **Apoptotic events induced by the phosphatase inhibitor okadaic acid in normal human lung fibroblasts.** *Toxicol. in Vitro* 15, 199-208.
- Levy Toledano, R., Wertheimer, E. (1992) **Mutations in the insulin receptor gene.** *Endocrinol. Rev.* 13: 566-595.
- Li, Y., Lafuente, A. and Trush, M. A. (1994) **Characterization of quinone reductase, glutathione and glutathione S-transferase in human myeloid cell lines: induction by 1,2-dithiole-3-thione and effects on hydroquinone-induced cytotoxicity.** *Life Sciences.* 54: 901-916.
- Lorenzi, T. F. (1999). *Manual de Hematologia - Propedêutica e Clínica*, cap.: 4, pág. 337.

- Loveland, B. E., Johns, T. G., Mackay, I. R., Vaillant, F., Wang, Z. X. and Hertzog, P. J. (1992) **Validation of the MTT dye assay for enumeration of cells in proliferative and antiproliferative assays.** *Biochem. Int.* 27: 501-510.
- Lowry, O. H. and Lopez, J. A. (1945) **The determination of inorganic phosphate in the presence of labile phosphate esters.** *J. Biol. Chem.* 162:421-424.
- LundJohansen, F., Frey, T., Ledbetter, J. A. and Thompson, P. A. (1996) **Apoptosis in hematopoietic cells is associated with an extensive decrease in cellular phosphotyrosine content that can be inhibited by the tyrosine phosphatase antagonist pervanadate.** *Cytometry.* 25: (2) 182-190.
- LyB, G., Knorre, A., Schimidt, T.J., Pahl, H.L. and Merfort, I. (1998). **The anti-inflammatory sesquiterpene lactone helenalin inhibits the transcription factor NF- κ B by directly targeting p65.** *J. Biol. Chem.* 273:33508-33516.
- Maciel, M. A. M., Pinto, A. C., Brabo, S. N. and Silva, M. N. (1998) **Terpenoids from *Croton cajucara*.** *Phytochemistry.* 49: 823-28.
- Maciel, M. A. M., Pinto, A. C., Arruda, A. C., Pamplona, S. G. S. R., Vanderlinde, F. A., Lapa, A. J., Echevarria, A., Grynberg, N. F., Côlus, I. M. S., Farias, R. A. F., Luna Costa, A. M. and Rao, V. S. N. (2000) **Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology: a successful combination in the study of *Croton cajucara*.** *J. Ethnopharmacol.* 70: 41-55.
- MacKintosh, C. and MacKintosh, R. W. (1994) **Inhibition of protein kinases and phosphatases.** *Trends Biochem. Sci.* 17: 444-447.
- Maehama, T. and Dixon, J. E. (1998) **The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate.** *J. Biol. Chem.* 273: 13375-13378.
- Majno, G. and Joris, I. (1995) **Apoptosis, oncosis and necrosis.** *Am. J. Pathol.* 146: 3-15.
- Martin, S. J. (1993) **Apoptosis: suicide, execution or murder?** *Trends. Cell Biol.* 3: 141-144.
- Martin, S. J., Reutelingsperger, C. P. M., McGahon, A. J., Rader, J. A., vanSchie, R. G. A., LaFace, D. M., Green, D. R. (1995) **Early redistribution of plasma membrane**

- phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of bcl-2 and Abl.** *J. Exp. Med.* 182:1545-1556.
- Mayer, A. M. S., Choudhry, M. A., Sayeed, M. M. and Spitzer, J. A. (1997) **The marine toxin okadaic acid reduces O_2^- generation and tyrosine phosphorylation in Lps-primed rat neutrophils.** *Pharmacol. Lett.* 61: 199-204.
- McCarthy, D. M., San Miguel, J. F., Freake, H. C., Green, P.M., Zola, H., Catovsky D. and Goldman, J. M. (1983) **1.25-Dihydroxyvitamin D_3 inhibits proliferation of human promyelocytic leukaemia (HL60) cells and induces monocyte-macrophage differentiation in HL60 and normal human bone marrow cells.** *Leuk. Res.* 7: 51-55.
- McConkey, D. J. (1998) **Biochemical determinants of apoptosis and necrosis.** *Toxicol. Lett.* 99: (3) 157-168.
- Monteiro, H. P. and Stern, A. (1996) **Redox modulation of tyrosine phosphorylation-dependent signal transduction pathways.** *Free Radic. Biol. Med.* 21: 323-333.
- Moore, F., Weekes, J. and Hardie, D. G. (1991) **Evidence that AMP triggers phosphorylation as well as direct allosteric activation of rat liver AMP-activated protein kinase.** *Eur. J. Biochem.* 199:691-697.
- Mosmann, T. (1983) **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.** *J. Immunol. Meth.* 65: 55-63.
- Narasimhan, T. R., Harindranath, N., Premlata, S., Kesava Murthy, B. S. and Subba Rao, P. V. (1985) **Toxicity of the Sesquiterpene Lactone Parthenin to Cultured Bovine Kidney Cells.** *Planta Med.* 16: 194-197.
- Newburger, P. E., Chovoniec, M. E., Greenberger, J. S. and Cohen, H. J. (1979) **Functional changes in human leukemic cell line HL-60.** *J. Cell Biol.* 82: 315-322.
- Olivier, P., Testard, P., Marzin, D. and Abbott, D. (1995) **Effect of high polyol concentrations on the neutral red absorption assay and tetrazolium-MTT test of rat hepatocytes in primary culture.** *Toxicol. Vitro.* 9: 133-138.
- Östman, A and Böhmer, D.F. (2001) **Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatases.** *Trends Cell Biol.* 11: 258-266.

- Pan, Q., Granger, J., O'Connell, T., Somerman, M. J. and Simpson, R. U. (1997) **Promotion of HL60 cell differentiation by 1,25 dihydroxyvitamin D₃ regulation of protein kinase C levels and activity.** *Biochemical Pharmacology* 54: 909-915.
- Parnetti, L., Senin, U. and Meccoci, P. (1997) **Cognitive enhancement therapy for Alzheimer's disease. The way forward.** *Drugs* 53: 752-768.
- Penta, J. S., Johnson, F. M., Wachsmann, J. T. and Copeland, W. C. (2001) **Mitochondrial DNA in human malignancy.** *Mut. Res.* 488: 119-133.
- Renzi, D.; Valtonila, M. and Foster, R. (1993) **The evaluation of a multi-endpoint citotoxicity assay system.** *ATLA.* 21: 89-96.
- Repetto, G. and Sanz, P. (1993) **Neutral red uptake, cellular growth and lysosomal function: in vitro effect of 24 metals.** *ATLA.* 21: 501-507.
- Riordan, F. A., Foroni, L., Hoffbrand, A. V., Mehta, A. B., Wickremasinghe, R. G. (1998) **Okadaic acid-induced apoptosis of HL60 leukemia cells is preceded by destabilization of bcl-2 mRNA and downregulation of bcl-2 protein.** *Febs. Lett.* 435: 195-198.
- Rodriguez, E., Towers, G. H. N. and Mitchell, J. C. (1976) **Biological Activities of Sesquiterpene Lactones.** *Phytochem.* 15: 1573-1580.
- Rodriguez, J. A. and Haun, M. (1999) **Cytotoxicity of trans-dehydrocrotonin from *Croton cajucara* on V79 cells and rat hepatocytes.** *Plant. Med.* 65: 1-5.
- Rodriguez, J. A., (1998). **Desidrocrotonina: atividade antiulcerogênica, toxicidade e metabolização in vivo e in vitro.** Tese de Doutorado I.B.- Universidade Estadual de Campinas, Campinas, pp. 138.
- Sakurada, K., Zheng, B. and Kuo, J. F. (1992) **Comparative effects of protein phosphatase inhibitors (okadaic acid and calyculin A) on human leukemia HL60, HL60/ADR and K562 cells.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187: 488-492.
- Schindl, A., Klosner, G., Hönigsmann, H., Jori, G., Calzavara-Pinton, P.C. and Trautinger, F. (1998) **Flow cytometric quantification of UV-induced cell death in human squamous cell carcinoma-derived cell line: dose and kinetics studies.** *J. Photoch. Photobiol. B. Biol.* 44:97-106.

- Schmidt, T. J. (1999) **Toxic activities of sesquiterpene lactones: Structural and biochemical aspects.** *Current Organic Chemistry*. 3: (6) 577-608.
- Shenolikar, S. (1994) **Protein serine/threonine phosphatases—new avenues for cell regulation.** *Annu. Rev. Cell Biol.* 10: 55-86.
- Shimizu, T., Oka, Y., Awai, N. and Takeda, K. (1999) **Hypophosphorylation of pRB and repression of cyclin D3 and cdc25A during the granulocytic differentiation of human myeloblastic leukemia ML-1 cells.** *Leukemia Res.*23: 901-907.
- Sieder, S., Richter, E., Becker, K., Heins, R. and Steinfelder, H. J. (1999) **Doxorubicin-resistant LoVo adenocarcinoma cells display resistance to apoptosis induction by some but not all inhibitors of ser/thr phosphatases 1 and 2A.** *Toxicology*. 134: 109-115.
- Silva, R. M., Santos, F. A., Maciel, M. A. M., Pinto, A. C. and Rao, V. S. N. (2001) **Effect of trans-Dehydrocrotonin, a 19-Nor-Clerodane Diterpene from Croton cajucara on Experimental Hypertriglyceridaemia and Hypercholesterolaemia Induced by Triton WR 1339 (Tyloxapol) in Mice.** *Plant. Med.* 67: 763-765.
- Silveira, E. R. and Mc Chesney, J. (1994). **6,7-Oxygenated neo-clerodane furan diterpene from croton sonderianus.***Phytochem.* 36: 1457-1463.
- SoKoloski, J. A. and Sortorelli, A. C. (1997) **Induction of the differentiation of HL-60 promyelocytic leukemia cells by nonsteroidal anti-inflammatory agents in combination with low levels of vitamin D₃.** *Leukemia. Res.*, 22: 153-161.
- Souza-Brito, A. R. M., Rodriguez, J. A., Hiruma-Lima, C. A., Haun, M. and Nunes, D. S. (1998). **Antiulcerogenic Activity of trans-Dehydrocrotonin from Croton cajucara** *Planta Med.* 64: 126-129.
- Steller, H. (1995) **Mechanisms and genes of cellular suicide.** *Science*. 267: 1445-1449.
- Stern, A., Yin, X., Tsang, S.-S., Davison, A. and Moon, T. (1993) **Vanadium as a modulator of cellular regulatory cascade and oncogene expression.** *Biochem. Cell. Biol.* 71:103:112.
- Swarup, G., Cohen, S. and Garbers, D. L. (1982). **Inhibition of membrane phosphotyrosil-protein phosphatase activity by vanadate.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107: 1104-1109.

- Takagi, T., Moore, C. R., Diehn, F. and Buratowski, S. (1997) **An RNA 5'-triphosphatase related to the protein tyrosine phosphatase.** *Cell.*, 89: 867-873.
- Taylor, S. I., Cama, A., Accili, D., Barbetti, R., Quon, M. J., Sierra, M., Suzuli, Y., Koller, E., Levy Toledano, R. and Wertheimer, E. (1992) **Mutations in the insulin receptor gene.** *Endocrinol. Rev.* 13, 566-595.
- Tonks, N. K. and Neel, B. G. (1996) From form to function: signaling by protein tyrosine phosphatases. *Cell.* 87: 365-368.
- Torsoni, M. A., Viana, R. I. and Ogo, S. H. (1998) **Sulphydryl groups and their relation to the antioxidant enzymes of chelonian red blood cells.** *Biochem. Mol. Biol. Int.* 46: 147-156.
- Tracey, A. S. (2000) **Hydroxamino vanadates: aqueous chemistry and function in protein tyrosine phosphatase and cell cultures.** *J. Inorg. Biochem.* 80: 11-16.
- Tsiani, E., and Fantus, I.G. (1997) **Vanadium compounds: Biological Actions and Potential as Pharmacological Agents.** *Trends Endocrinol. Metabol.* 8: 51-58.
- Tsuchiya, T., Ikeda, N., Obara, K. and Hartshorne, D. J. (1997) **A type 2A protein phosphatase from Clam Smooth Muscle. Use of 4-methylumbelliferyl phosphate as substrate.** *Comp. Biochem. Physiol.* 118B: 17-21.
- Tsujimoto, Y. and Shimizu, S. (2000) **Bcl-2 family: Life-or-death switch.** *Febs. Lett.* 466: 6-10.
- Uesugi, Y., Fuse, I., Toba, K., Kishi, K., Furukawa, T., Koike, T. and Aizawa, Y. (1999) **Involvement of SHP-1, a phosphotyrosine phosphatase, during myeloid cell differentiation in acute promyelocytic leukemia cell lines.** *Eur. J. Haematol.* 62: (4) 239-245.
- Uren, A.G. and Vaux, D.L. (1996) **Molecular and Clinical Aspects of Apoptosis.** *Pharmacol. Ther.*, 1: 37-50.
- Uzunoglu, S., Uslu, R., Tobu, M., Saydam, G., Terzioglu, E., Buyukkececi, F. and Omay, S. B. (1999) **Augmentation of methylprednisolone-induced differentiation of myeloid leukemia cells by serine/threonine protein phosphatase inhibitors.** *Leukemia. Res.* 23: 507-512.

- Vandre, D. D. and Wills, V. L. (1992) **Inhibition of mitosis by okadaic acid: possible involvement of a protein phosphatase 2A in the transition from metaphase to anaphase.** *J. Cell. Sci.* 101: (1) 79.
- Vepa, S., Scribner, W. M., Natarajan, V. (1997) **Activation of protein phosphorylation by oxidants in vascular endothelial cells: identification of tyrosine phosphorylation of caveolin.** *Free Radical Biol. Med.* 22: 25-35.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., Reutelingsperger, C. (1995) **A novel assay for apoptosis. Flow cytometry detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V.** *J. Immunol. Methods.* 184: 39-51.
- Vetter, S. W., Keng, Y. F., Lawrence, D. S. and Zhang, Zhong-Yin. (2000) **Assessment of protein-tyrosine phosphatase 1B substrate specificity using "Inverse alanine scanning".** *J. Biol. Chem.* 275: 2265-2268.
- Wall, N. R., Mohammad, M. and Al-Katib, A. M. (1999) **Bax: Bcl-2 ratio modulation by bryostatin 1 and novel antitubulin agents is important for susceptibility to drug induced apoptosis in the human early pre-B acute lymphoblastic leukemia cell line, Reh.** *Leuk. Res.* 23: 881-888.
- Walton, K. M. and Dixon, J. E. (1993) **Protein tyrosine phosphatases.** *Annu Rev. Biochem.* 62: 101-120.
- Wang, I.-K., Lin-Shiau, S.-Y. and Lin, J.-K. (1999) **Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL60 cells.** *Eur. J. Cancer.* 35: (10) 1517-1525.
- Wang, R. H., Liu, C. W. Y., Avramis, V. I. and Berndt, N. (2001) **Protein phosphatase 1 alpha-mediated stimulation of apoptosis is associated with dephosphorylation of the retinoblastoma protein.** *Oncogene.* 20: 6111-6122.
- Wera, S. and Hemmings, B. A. (1995) **Serine/Threonine protein phosphatases.** *Biochem. J.* 311: 17-29.
- Wilcock, C. and Hickman, J. A (1988). **Characterization of a Na⁺/ K⁺/ Cl⁻ cotransporter in alkylation agent-sensitive L1210 murine leukemia cells.** *Biochim. Biophys. Acta.* 946: 359-369.

- Woodford-thomas, T. A., Rhodes, J. D. and Dixon, J. E. (1992) **Expression of a protein tyrosine phosphatase in normal and v-src transformed mouse 3T3 fibroblasts.** *J. Cell Biol.* 117: 401-414.
- Wu, F. Y. and Sun, T. P. (1999) **Vitamin K₃ Induces Cell Cycle Arrest and Cell Death by Inhibiting Cdc25 Phosphatase.** *Eur. J. Cancer.* 35: 1388-1393.
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F. and Currie, A. R. (1980) **Cell death: The significance of apoptosis.** *Intl. Rev. Cytol.* 68: 251-306.
- Xu, K. and Thornalley, P. J. (2001) **Involvement of glutathione metabolism in the cytotoxicity of the phenethyl isothiocyanate and its cysteine conjugate to human leukaemia cells *in vitro*.** *Biochem. Pharmacol.* 61: 165-177.
- Yamaga, A.; Taga, M.; Hashimoto, S. and Ota, C. (1999). **Comparison of bone metabolic markers between maternal and cord blood.** *Hormone Res.* 51: 277-279.
- Zhang, Z. Y. (1998) **Protein tyrosine phosphatase: biological function, structural characteristics, and mechanism of catalyses.** *CRC Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 33: 1-52.
- Zhang, Z. Y. and Dixon, J. E. (1993) **Active site labeling of the *Yersinia* protein tyrosine phosphatase: The determination of the pK_a of the active site cysteine and the function of the conserved histidine 402.** *Biochemistry.* 32: 9340-9345.
- Zhang, Z. Y. (2001) **Protein tyrosine phosphatases: prospects for therapeutics.** *Current.Opinion in Chemical Biology.* 5: 416-423.
- Zhang, Z.Y., Zhou, B., Xie, L. (2002). **Modulation of protein kinase signaling by protein phosphatases and inhibitors.** *Pharm.Therap.* 1:1-11.
- Zhu, W-H., Majluf-Cruz, A. and Omburo, G. A. (1998) **Cyclic AMP-specific phosphodiesterase inhibitor rolipram and RO-20-1724 promoted apoptosis in HL-60 promyelocytic leukemic cells via cyclic AMP-independent mechanism.** *Life sci.* 63: (4) 265-274.
- Zolnierowicz, S. (2000) **Type 2A Protein Phosphatase, the Complex Regulator of Numerous Signaling Pathways.** *Biochem. Pharmacol.* 60: 1225-1235.