

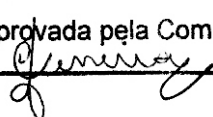
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Biologia



Alexandre Donizeti Martins Cavagis

"MODULAÇÃO DE MAPKs EM CÉLULAS DE LEUCEMIA HUMANA INDUZIDAS A APOPTOSE E DIFERENCIAÇÃO"

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <u>ALEXANDRE DONIZETI MARTINS CAVAGIS.</u> _____ e aprovada pela Comissão Julgadora. 
--

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Biologia Funcional e Molecular na área de Bioquímica

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

Co-orientador: Prof. Dr. Hiroshi Aoyama

Campinas

2005

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	HUNICAMP
	C313m
V	EX
TOMBO BC/	65091
PROC.	16-P-00086-05
C	☐
D	☒
PREÇO	11,00
DATA	03/08/05
Nº CPD	

BIB ID - 359572

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

C313m

Cavagis, Alexandre Donizeti Martins
Modulação de MAPKs em células de leucemia
humana induzidas a apoptose e diferenciação /
Alexandre Donizeti Martins Cavagis. – Campinas, SP:
[s.n.], 2005.

Orientadora: Carmen Veríssima Ferreira.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. MAPKs. 2. Apoptose. 3. Leucemia.
4. Células HL60. 5. Tetrahydroquinona.
6. Violaceína. 7. Diferenciação celular. I. Carmen
Veríssima Ferreira. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdet/ib)

Título em inglês: Modulation of MAPKs in human leukaemia cells induced to apoptosis and differentiation.

Palavras-chave em inglês (Keywords): MAPKs, apoptosis, leukaemia, HL60 cells, tetrahydroxyquinone, violacein, cell differentiation.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Doutorado.

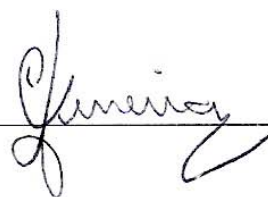
Banca examinadora: Carmen Veríssima Ferreira, Ana Claudia Galvão Freire, Armindo Antonio Alves, Marília Afonso Rabelo Buzalaf, Stephen Hyslop.

Data da defesa: 03/06/2005.

Campinas, 25 de maio de 2005

BANCA EXAMINADORA

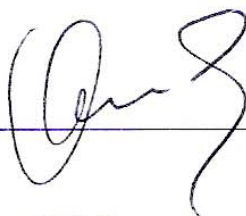
Prof. Dr. Carmen Veríssima Ferreira (Orientadora)



Profª. Drª. Ana Claudia Galvão Freire



Prof. Dr. Armindo Antonio Alves



Prof. Dr. Marília Afonso Rabelo Buzalaf



Prof. Dr. Stephen Hyslop



Prof. Dr. Paulo Afonso Granjeiro

Prof. Dr. Sérgio Marangoni

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela oportunidade de poder vencer mais esta etapa com saúde, e à minha família pelo incentivo durante todo o período do Doutorado;

À Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) e à Universidade de Amsterdam (UvA) pela valiosa formação acadêmica adquirida e pela oportunidade de realização da parte experimental do curso;

À Professora Dra. Carmen Veríssima Ferreira pela orientação e pelo inestimável auxílio durante toda a minha formação na área de Bioquímica, desde a iniciação científica, Mestrado e Doutorado, etapas que me proporcionaram excelentes oportunidades de crescimento acadêmico e evolução pessoal;

Ao Professor Dr. Hiroshi Aoyama por ter me recebido em seu laboratório desde o período de graduação e pela orientação durante a primeira parte deste trabalho;

Ao Professor Dr. Maïkel P. Peppelenbosch pela excelente recepção no Department of Experimental Internal Medicine do Academisch Medisch Centrum (AMC), na Universidade de Amsterdam, por sua orientação durante os trabalhos bem como pelas sugestões fundamentais durante a elaboração dos manuscritos;

Aos professores que fizeram parte do Exame de Qualificação: Prof. Dr. José Camillo Novello, Prof. Dr. Paulo Afonso Granjeiro e Profa. Dra. Fernanda Ramos Gadelha, por todas as excelentes colocações que contribuíram muito no sentido de melhorar a qualidade de apresentação dos resultados descritos nesta tese;

Aos membros da banca examinadora pela leitura crítica da tese, sugestões e avaliação;

À Telma pela amizade e pelo grande incentivo no início do curso que foi muito importante para que eu acreditasse na possibilidade de realização deste trabalho;

Aos colegas do Laboratório de Enzimologia, especialmente Érika e Marilena, e aos demais colegas do Departamento de Bioquímica pelo agradável convívio durante a realização do curso;

A Ana Carolina e Karla pelo grande auxílio nas pesquisas bibliográficas e também pelas orientações nos assuntos relacionados;

Ao amigo Karim pelo companheirismo e incentivo;

Aos demais colegas do AMC, especialmente aos técnicos que tiveram um papel fundamental na execução de experimentos;

À Marina, por sempre ter me recebido na secretaria com muita simpatia e bastante atenciosamente no auxílio referente às questões institucionais, e também à Andréia ;

Aos funcionários da gráfica da Unicamp que trabalharam na impressão final desta tese;

A todas as demais pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho,

Meus sinceros Agradecimentos

Dedicatória:

À Áurea, Neide, Vânia e Alessandra.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	vii
RESUMO	x
SUMMARY.....	xi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Apoptose.....	2
1.1.1. Caspases e as diferentes vias de apoptose	2
1.1.2. Regulação da apoptose.....	3
1.1.3. Mecanismos alternativos de apoptose.....	5
1.1.4. Apoptose e câncer	7
1.2. Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos (MAPKs)	7
1.2.1. Transdução de sinal <i>versus</i> MAPKs	8
1.2.2. Classificação das MAPKs	9
1.2.2.1. Quinases ativadas por sinal extracelular (ERKs).....	10
1.2.2.2. JNK.....	14
1.2.2.3. p38 - MAPK	17
1.2.3. MAPKs e câncer	17
1.3. Células de leucemia mielocítica humana (HL60).....	18
1.3.1. Diferenciação de células de leucemia humana.....	20
1.4. Violaceína	21
1.5. Tetrahydroquinona (THQ).....	23
2. OBJETIVOS.....	25
3. CAPÍTULO 1 - <i>Reactive oxygen species induce apoptosis via the mitochondrial pathway due to diminished survival signalling</i>.....	27
4. CAPÍTULO 2 - <i>Kinome profiling for studying the effects of violacein in human leukaemia cells</i>	40
5. CAPÍTULO 3 - <i>Riboflavina: uma vitamina multifuncional</i>.....	49
6. DISCUSSÃO GERAL	61
7. CONCLUSÃO	69
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

ABREVIATURAS

AIF	Fator de indução de apoptose
Apaf-1	Ativador de protease apoptótica fator 1
ASK	Quinase reguladora de sinal de apoptose (MAPKKK)
ATF2	Ativador de fator de transcrição 2
BAD	Antagonista do Bcl-2 associado a morte celular
Bax	Proteína X associada a Bcl-2
Bcl-2	Proteínas de células B (Linfoma tipo 2)
Bid	Antagonista de domínio de morte associado a BH3
cdc25	Ciclo de divisão celular 25
cdc42	Ciclo de divisão celular 42 (proteína ligante a GTP de 25 kDa)
CDK	Quinase dependente de ciclina
c-Myc	Homólogo ao oncogene de mielocitomatose viral
CREB	Proteína ligante ao elemento de resposta a AMP cíclico
DCFH-DA	Diclorofluorasceína diacetato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPA	Difenilamina
DTNB	Ácido 5,5-ditio-bis (2-nitrobenzóico)
DTT	Ditiotreitol
E2F	Fator de transcrição E2F
EGTA	Ácido etilenoglicol tetracético
<i>elk-1</i>	Gene ETS-like 1 (membro da família de oncogenes ETS)
ELK-1	Fator de transcrição ETS-like 1
ERK	Quinase ativada por sinal extracelular
EROs / ROS	Espécies reativas de oxigênio
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FADD	Domínio de morte associado ao Fas

Fas	Membro da superfamília de receptores TNF (ou CD95, ou APO-1)
FBS	Soro fetal bovino
FMN	Flavina mononucleotídeo
GADD153p-1	Proteína 153 induzida por bloqueio de crescimento e danos ao DNA
GSH	Glutathiona reduzida
HL60	Células de leucemia mielocítica humana
IAP	Proteína inibidora de apoptose
IC ₅₀	Concentração que inibe 50% da atividade enzimática ou viabilidade celular
IL-1	Interleucina-1
IRS-1	Substrato receptor de insulina-1
I-κB	Proteína inibidora do NF-κB
JNK	Proteína quinase NH ₂ - terminal de c-Jun
MAPK (s)	Proteína (s) quinase (s) ativada (s) por mitógeno (s)
MAPKAPK	Proteína quinase ativada por MAPK
MEF	Fibroblasto embrionário de rato
MEF2	Fator 2 de ativação de miócitos
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NFAT4	Fator nuclear 4 de células T ativadas
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NGF	Fator de crescimento neuronal
NTB	Tionitrobenzoato
p21	Inibidor de quinase dependente de ciclina 1A (ou CDKN1A)
p53	Proteína supressora de tumor p53
p90RSK	Quinase S6 ribossomal p90 (ou proteína ribossomal quinase S6 de 90 kDa)
PAK	Quinase ativada por p21
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PKB	Proteína quinase B
PKC	Proteína quinase dependente de cálcio (proteína quinase C)

PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
pNP	<i>p</i> -nitrofenol
pNPP	<i>p</i> -nitrofenilfosfato
Proteína G	Proteína trocadora de guanilatonucleotídeos
PTP (s)	Proteína (s) tirosina fosfatase (s)
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
Rac	Pequena GTPase
Raf	Serina-treonina quinase implicada na sinalização de crescimento e sobrevivência celular.
Ras	Proteína G de baixo peso molecular (nome devido ao fato de ter sido primeiramente isolada de sarcoma de rato, "rat sarcoma")
Rb	Proteína retinoblastoma
Rf	Riboflavina
RPMI	"Roswell Park Memorial Institute" (meio de cultura)
SAP-1	Proteína acessória SRF-1
Ser	Resíduo de aminoácido serina
SOS	"Son of sevenless"
Src	Proteína tirosina quinase (oncogênica)
STAT	Transdutor de sinal e ativador de transcrição
TAK1	Quinase 1 ativada por TGF-beta
TBS	Tampão salino Tris-HCl
TBST	Tampão salino Tris-HCl suplementado com Tween 20
THQ	Tetrahidroquinona
Thr	Resíduo de aminoácido treonina
TNF	Fator de necrose tumoral
TRADD	Domínio de morte associado ao receptor TNF
Tyr	Resíduo de aminoácido tirosina

RESUMO

O objetivo central deste trabalho foi avaliar a modulação de MAPKs em células de leucemia humana induzidas a apoptose e diferenciação.

No capítulo 1, estudou-se o efeito da tetrahidroquinona (THQ), uma molécula que pode participar de um ciclo redox formando radicais semiquinona e, conseqüentemente, espécies reativas de oxigênio (EROs). A citotoxicidade da THQ, mediada pela formação de EROs, foi revertida por tratamento das células com glutathione e N-acetil-L-cisteína. A produção de EROs ocorreu concomitantemente com a apoptose das células HL60 através da via mitocondrial e com redução na atividade de várias moléculas anti-apoptóticas da via de sobrevivência celular, inclusive da proteína quinase B (PKB). A transfecção das células HL60 com a PKB levou à diminuição da citotoxicidade dependente de EROs gerada pela THQ.

No capítulo 2, demonstrou-se que a análise de um arranjo simultâneo de 1176 substratos com seqüências de consenso de diferentes quinases permitiu identificar a via de sinalização das MAPKs como principal alvo da violaceína, um pigmento com propriedades antitumorais *in vitro* produzido pela *Chromobacterium violaceum* do rio Amazonas e que induz diferenciação de células HL60 em monócitos e granulócitos. Os resultados também indicaram que a análise do quinoma empregando arranjos metabólicos é uma ferramenta promissora na elucidação do modo de ação de fármacos em nível molecular.

O capítulo 3 corresponde a um artigo de revisão em português sobre a riboflavina, componente do complexo vitamínico B₂ que participa de importantes eventos bioquímicos, como reações redox envolvendo transferência de um ou dois elétrons, e também agindo como fotossensibilizador. Este artigo mostra que o comportamento peculiar e multifuncional da riboflavina permite que ela atue como nucleófilo ou eletrófilo e também descreve a associação deste composto com diferentes doenças como o câncer e doenças cardiovasculares.

SUMMARY

The principal aim of this work was to assess the MAPKs family status in human leukaemia cells induced to undergo apoptosis and differentiation.

In chapter one, the effect of tetrahydroxyquinone (THQ), a highly redox active molecule which can participate of a redox cycle with semiquinone radicals leading to the formation of reactive oxygen species (ROS), was investigated in HL60 cells. THQ caused substantial ROS formation followed by cytotoxicity that was sensitive to glutathione and N-acetyl-L-cysteine. Furthermore, ROS production coincided with HL60 cell apoptosis through the mitochondrial pathway and was followed by reduced activity of various anti-apoptotic survival molecules, including the protein kinase B pathway. Importantly, transfection of protein kinase B into HL60 cells leading to an artificial increase in protein kinase B activity inhibited ROS-dependent cytotoxicity.

In chapter two, peptide arrays of 1176 different kinase consensus substrates unambiguously identified the MAP kinase pathway as a major target for violacein, the anti-leukemic purple-colored pigment produced by *Chromobacterium violaceum* from the Amazon River that stimulates HL60 cells to differentiate into monocytes and granulocytes. The results also indicate that kinome profiling using metabolic arrays is a promising and suitable tool for studying the molecular mechanisms of drug action.

Chapter three is a review article in Portuguese about riboflavin, a component of the vitamin B₂ complex, that has important roles in biochemistry, especially in redox reactions due to its ability to participate in both one- and two-electron transfers as well as acting as photosensitizer. This article describes the peculiar and multifunctional behavior of riboflavin which allows it to take part in several biochemical pathways both as nucleophile and electrophile. Moreover, the association of this vitamin with different diseases, including cancer and cardiovascular diseases, is also discussed.

Este trabalho foi viabilizado com recursos das seguintes instituições:



Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP



Academisch Medisch Centrum - AMC
University of Amsterdam - The Netherlands



Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FAPESP

1. *INTRODUÇÃO*

1.1. Apoptose

Apoptose é uma forma de morte celular morfológica e bioquimicamente distinta que ocorre em células eucarióticas em resposta a uma variedade de condições fisiológicas e patológicas [1]. Células que sofrem apoptose geram os chamados 'corpos apoptóticos', através do encolhimento e condensação, levando a um colapso ordenado do citoesqueleto e da membrana plasmática com manutenção da integridade das organelas e fragmentação do DNA, seguida de remoção através de fagocitose [2,3]. Já a morte celular por necrose corresponde a uma forma rápida de degeneração que afeta as células vizinhas gerando uma resposta inflamatória. As células necróticas são caracterizadas por inchamento do citoplasma, destruição de organelas e ruptura da membrana plasmática com extravasamento do conteúdo intracelular e, conseqüentemente, produzindo a resposta inflamatória.

A morte celular com características morfológicas relacionadas à apoptose pode ocorrer em resposta a vários estímulos, incluindo estresse intracelular e sinalização mediada por receptores específicos, sendo que falhas neste sistema de morte celular têm sido relacionadas ao surgimento de uma ampla variedade de doenças humanas como o desenvolvimento de tumores e resistência à quimioterapia [4]. Por isso, o entendimento deste mecanismo de morte, bem como o domínio da manipulação de fatores que o controlam são imprescindíveis para o planejamento de novas terapias no tratamento do câncer e outras doenças.

1.1.1. Caspases e as diferentes vias de apoptose

Na literatura, a abordagem clássica das vias de sinalização apoptótica estabelece a correlação deste tipo de morte celular a uma cascata muito bem conservada na qual atua uma família de cisteína-proteases denominadas caspases, de modo que a morte celular por apoptose mediada pelas caspases tem sido extensivamente revisada na literatura [5-10]. As caspases são sintetizadas como precursores inativos (pró-caspases ou zimogênios) que, em resposta a vias de ativação, são então convertidos em proteases ativas [11-13]. As caspases

são classificadas em *iniciadoras* (caspase 1-, -2, -4, -5, -8, -9, -10 e -14), que são ativadas após agregação por proteínas adaptadoras seguida de um processo de autoclivagem, e *efetoras* (caspase-3, -6 e -7) que são ativadas por outras proteases, incluindo caspases iniciadoras e granzima B.

Três vias principais de indução do processo apoptótico têm sido consideradas, de acordo com a caspase iniciadora: via receptor de morte, com ativação de caspase-8, via de estresse do retículo endoplasmático, atribuído à ativação da caspase-12 [14], e via mitocondrial, na qual vários sinais podem levar ao extravazamento de fatores apoptogênicos mitocondriais, levando à ativação de caspase-9 e de caspases efetoras como a caspase-3, -6 ou -7. Na via mitocondrial, a liberação de citocromo c leva a uma grande amplificação da cascata, pois o citocromo c se liga à proteína adaptadora presente no citosol, Apaf-1, e o complexo então formado leva à agregação e conseqüente ativação de pró-caspase-9 a qual, por sua vez, ativará caspases efetoras como a caspase-3 [15-18].

1.1.2. Regulação da apoptose

A regulação da apoptose é um processo altamente conservado, sendo que muitos dos genes que participam de determinados processos em diferentes espécies são os mesmos [19-21]. Apesar de o sinal de morte poder ser regulado por expressão gênica, a cascata pode ser disparada através de diversos estímulos, tais como danos genotóxicos (como quimioterapia e radiação) ou privação de citocinas. Danos ao DNA como, por exemplo, a quebra de uma das fitas (ou de ambas) ou até mesmo a falta de nucleotídeos podem disparar a via apoptótica através do fator de transcrição p53. Este fator de transcrição exerce um papel fundamental ativando genes que codificam proteínas indutoras de apoptose (como, por exemplo, proteínas que levam à liberação de citocromo c) ou relacionadas à interrupção do ciclo celular [22-24].

A proteína p53, além de funcionar como reguladora de apoptose e transcrição do DNA, também é mediadora de outro importante processo que é a

retenção do ciclo celular em G₁. Se o dano celular for reparável, a p53 induz interrupção do ciclo celular permitindo, assim, que haja tempo para o reparo do DNA. No entanto, no caso de danos celulares mais complicados de se reverter, para que não sejam replicados clones defeituosos ou mesmo malignos, a proteína p53 induz a célula à apoptose.

A proteína p53 se encontra normalmente no citosol, porém, em baixa concentração. Ela promove a retenção do ciclo celular em um ponto de restrição em G₁ que é "guardado" pela proteína retinoblastoma (Rb). A fosforilação de Rb permite que a célula transpasse esse ponto de transição e entre na fase S. A p53 exerce controle sobre o ciclo celular através da superexpressão de p21 que é um inibidor de quinases dependentes de ciclinas (CDKs). O complexo ciclinaD/CDK4 normalmente promove a fosforilação de Rb. Todavia, quando desfosforilado, Rb se liga ao E2F que é um fator de transcrição necessário à passagem de G₁ para S. Uma vez fosforilado Rb pela ação do complexo ciclinaD/CDK4, o fator E2F é liberado, transloca-se para o núcleo e induz a transcrição de proteínas que permitem a progressão do ciclo celular [25].

Família de genes Bcl-2/Bax

Um importante regulador de apoptose é a família de genes *Bcl-2/Bax*. Algumas proteínas transcritas por essa família (como Bcl-2 e Bcl-X_L) são reconhecidamente inibidoras de apoptose, enquanto outras (como Bax, Bad e Bid) são promotoras de apoptose [22, 26-31]. Uma alta expressão das proteínas Bax promove apoptose, enquanto que uma alta expressão do grupo Bcl-2 inibe apoptose. A p53 provavelmente funciona regulando a relação entre esses dois grupos de proteínas sendo, portanto, uma proteína chave na regulação da apoptose. A proteína Bcl-2 se encontra na membrana mitocondrial externa estando, desta maneira, orientada para o citosol; ela governa o transporte de íons e tem efeito protetor contra vazamentos na membrana. Já a proteína Bax se encontra no citosol e, uma vez disparada a cascata de apoptose, ela migra e se liga no poro de transição de permeabilidade da membrana mitocondrial levando à perda de permeabilidade íon-

seletiva. Como resultado, há liberação de conteúdo presente no espaço intermembrana, incluindo liberação de citocromo c (o que gera amplificação da cascata, conforme discutido) e também do fator de indução de apoptose (AIF), o qual se move diretamente para o núcleo onde leva à condensação da cromatina e fragmentação nuclear.

A Figura 1 mostra, resumidamente, algumas vias envolvidas na sinalização de apoptose e também na sobrevivência / proliferação celular.

1.1.3. Mecanismos alternativos de apoptose

Apesar de a abordagem clássica do modelo de apoptose sempre ter correlacionado este estilo de morte celular à atuação de caspases, existem mecanismos alternativos de apoptose que podem ser independentes de caspases [1,32]. Por exemplo, sabe-se que a caspase-3 é amplamente envolvida na execução de apoptose mas estudos têm demonstrado que essa caspase é dispensável em determinados tipos de morte celular com características morfológicas semelhantes às presentes na apoptose [33]. Além disso, a utilização de inibidores e a realização de “knockouts” têm demonstrado que as células podem apresentar mecanismos alternativos de morte. Neurônios desprovidos de fator de crescimento neuronal (NGF) morrem através de um mecanismo apoptótico dependente de caspase-2, enquanto que os mesmos neurônios derivados de uma linhagem de cobaias submetida a knockout de caspase-2 sofrem apoptose dependente de caspase-9 [34]. Desta maneira, em vez de um mecanismo único e linear, vias alternativas mediadas por diferentes caspases podem ser ativadas levando à apoptose, dependendo do bloqueio de determinada caspase preferencial. Além disso, a inibição de caspases não evita a morte celular com morfologia característica de apoptose em vários outros modelos experimentais, e vias de morte celular programada independente de ativação de caspases têm sido descritas envolvendo a ação de diferentes proteases [35-39].

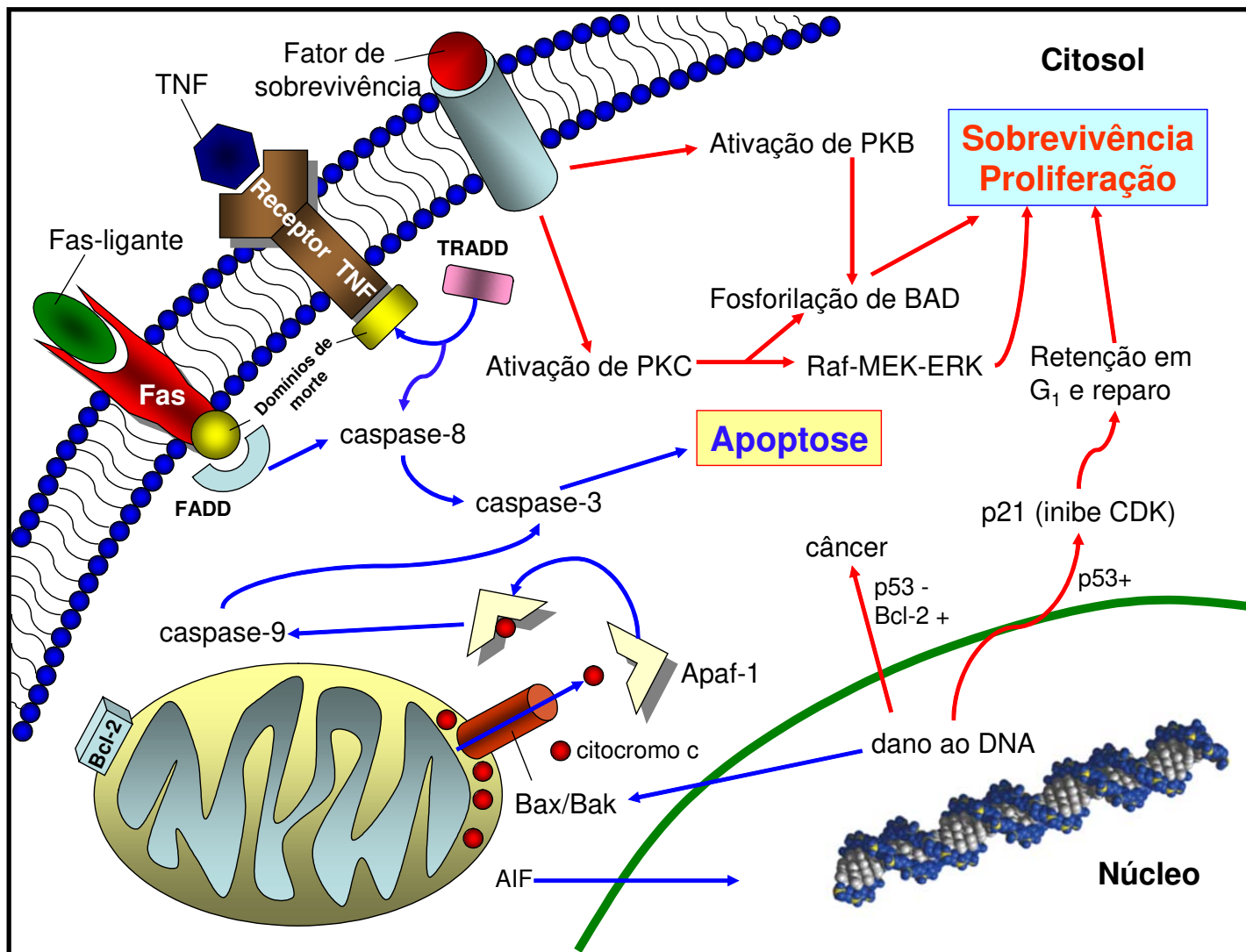


Figura 1. Resumo de algumas vias de sinalização de apoptose e sobrevivência / proliferação celular. (Fonte: Direta)

1.1.4. Apoptose e câncer

O desenvolvimento de câncer se dá devido a um aumento descontrolado no número de células, que pode ser devido a um aumento na proliferação ou a um decréscimo na morte celular. Um decréscimo na apoptose pode resultar da ausência ou mutação dos genes supressores de tumor *p53* ou *Rb* (o que ocorre, respectivamente, em cerca de 50% e 40% dos tumores humanos) [19]. Além disso, um acréscimo na expressão de Bcl-2 ou um decréscimo na expressão de Bax podem comprometer o bom funcionamento da via apoptótica e, no caso particular de leucemia linfocítica crônica, o acúmulo de células linfóides também pode ser atribuído à baixa expressão do receptor de morte Fas na membrana celular.

Muitos quimioterápicos e agentes citotóxicos utilizados no tratamento do câncer funcionam ativando apoptose, alguns pela ativação direta de pró-caspases, outros através de danos ao DNA que induzem a um aumento nos níveis de p53.

Proteínas Inibidoras de Apoptose (IAPs), que levam a um acréscimo nos níveis de Bcl-2 ou inibem caspases, também podem desempenhar um importante papel no crescimento de tumores, bem como na resistência a determinados tipos de drogas [39-43].

Além do câncer, é importante lembrar que o decréscimo na via apoptótica também está relacionado a outras infecções como no caso do adenovírus, o qual codifica uma proteína similar à Bcl-2 levando a um decréscimo na via apoptótica a fim de preservar a célula hospedeira. Já uma estimulação apoptótica excessiva está relacionada a outros tipos de doenças como a AIDS, que é caracterizada pela morte de células CD4⁺ T, e também doenças degenerativas como Alzheimer e Parkinson. [19]

1.2. Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos (MAPKs)

As proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) representam uma família de serina-treonina quinases envolvidas na regulação de uma ampla variedade de respostas celulares [44]. As MAPKs transmitem sinais extracelulares captados por receptores de membrana até o núcleo em resposta aos mais

variados estímulos, inclusive estresse e, através da fosforilação de substratos específicos em resíduos de serina e treonina, essas enzimas podem regular positiva ou negativamente o substrato, modulando, assim, a expressão gênica, mitose, motilidade, metabolismo, proliferação, diferenciação, sobrevivência, interrupção do ciclo celular e apoptose [45].

1.2.1. Transdução de sinal *versus* MAPKs

A transdução de sinal em nível celular se refere à transmissão de sinal de fora para dentro da célula culminando numa resposta específica. Essa transmissão de sinal pode ser simples (alguns receptores funcionam como canais após interação com ligantes específicos permitindo, por exemplo, a passagem de íons que agem como segundos mensageiros) ou complexa (a interação ligante-receptor está acoplada a muitos eventos celulares que envolvem, principalmente, fosforilação de proteínas) [46].

A fosforilação de proteínas é realizada pelas proteínas tirosina quinases e serina/treonina quinases. Essa modificação pós-tradução altera a atividade de enzimas e, desta forma, regula vários processos celulares [47]. Dentre os diversos tipos de proteínas quinases, as proteínas serina/treonina quinases [proteína quinase dependente de AMPc, proteína quinase C (PKC) e proteínas quinases ativadas por mitógenos] participam de várias vias de sinalização [48].

A principal via para regulação do crescimento e diferenciação celular se dá através de cascatas envolvendo as MAPKs, as quais transmitem sinais da membrana plasmática ao núcleo a partir da ligação de mensageiros externos (estímulo extracelular) a receptores específicos os quais, por sua vez, apresentam atividade quinase intrínseca ou estão acoplados à proteína G [proteína trocadora de guanilatonucleotídeos (GDP/GTP)]. A cascata altamente conservada de proteínas quinases ativadas por mitógenos é composta de 3 quinases: MAPK quinase (MAPKKK), MAPK quinase (MAPKK) e MAPK [49]. Normalmente, a proteína G ou a PKC servem como disparadores desta cascata e ativam a MAPKKK (proteína Raf). A MAPKKK ativada fosforila a MAPKK em dois resíduos de serina.

A MAPKK fosforilada, por sua vez, atua como uma treonina/tirosina quinase e fosforila MAPK em 2 sítios conservados. Finalmente, a MAPK ativa atua sobre diferentes substratos, principalmente sobre proteínas do citoesqueleto, outras quinases, fosfatases, fosfolipases e fatores de transcrição [50].

O arranjo em cascata das MAPKs permite não somente a amplificação do sinal mas também é responsável pela cinética da via, ou seja, pela duração e amplitude do sinal. Essas três etapas da cascata estão presentes em todas as células eucarióticas e desempenham várias funções como resposta ao estresse, controle do ciclo celular, crescimento e diferenciação [51].

1.2.2. Classificação das MAPKs

Convencionalmente, as MAPKs são distribuídas em três famílias: a quinase regulada por sinal extracelular (ERK), a quinase c-Jun NH₂-terminal (JNK) e a p38-MAPK. Cada uma dessas famílias apresentam subfamílias: ERKs (ERK1 e ERK2), JNK (JNK1, JNK2 e JNK3) e p38 (p38 α , p38 β , p38 γ e p38 δ) [52-55]. Cada família apresenta a respectiva quinase “upstream” e os respectivos substratos (Figura 2).

Uma outra MAPK denominada ERK5 foi clonada, sendo agrupada como membro de uma família à parte que também inclui a ERK8. No entanto, as funções, nem tão pouco as vias de ativação dessas duas últimas MAPKs foram totalmente elucidadas [56, 57]. ERK1 e ERK2 são MAPKs bem caracterizadas e ativadas em resposta a estímulos de crescimento. As MAPKs JNK e p38 são simultaneamente ativadas em resposta a uma variedade de estresses celulares e ambientais, tais como, irradiação UV, alterações osmóticas e metabólicas, danos ao DNA, choque térmico e mecânico, citocinas inflamatórias, isquemia, estresse oxidativo e xenobióticos [58-63]. Enquanto a p38 e a JNK são MAPKs relacionadas a estresse, muitos dos estímulos que induzem a ativação dessas quinases, como os já mencionados, também podem levar à ativação de outras cascatas de MAPK.

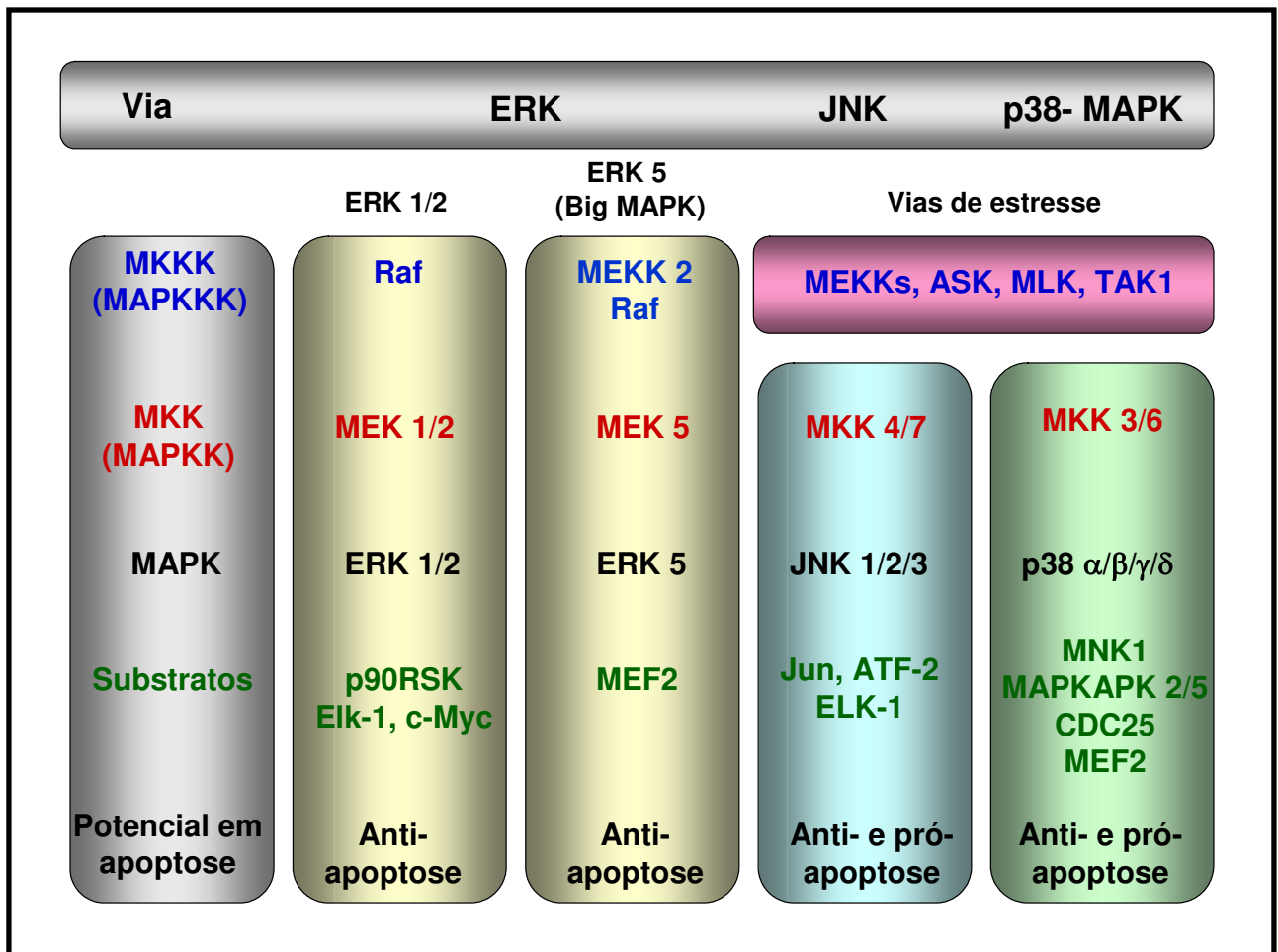


Figura 2. Vias de sinalização envolvendo as principais MAPKs, incluindo as respectivas famílias e diferentes tipos de estímulo. As moléculas de maior representatividade em cada cascata são mostradas. (*Fonte: Direta*)

1.2.2.1. Quinases ativadas por sinal extracelular (ERKs)

As quinases reguladas por sinal extracelular ERK1 e ERK2 são estimuladas por fatores de crescimento e de diferenciação através de receptores tirosina quinases, receptores acoplados à proteína G e receptores de citocinas [64,65]. As ERKs 1 e 2 são enzimas com 44 e 42 kDa, respectivamente, que se tornam ativas pela fosforilação de dois resíduos adjacentes de treonina e serina (T183-G-Y185, em

ERK2). A ativação das ERKs 1 e 2 é mediada pela fosforilação de um resíduo de treonina e tirosina pelas MAPKs duais MEK1 e MEK2 que, por sua vez, são ativadas pela Raf e esta última pela Ras (Figura 2). Uma vez ativadas, as ERKs fosforilam um amplo espectro de substratos citosólicos e nucleares, incluindo fatores de transcrição como c-Myc, Elk-1 e, possivelmente, proteínas STAT, além de proteínas do citoesqueleto. Em células em repouso, a localização das ERKs é predominantemente citosólica, contudo, quando as células são tratadas com fatores de crescimento ou soro, uma fração das ERKs se transloca para o núcleo onde é requerida para fosforilação de fatores de transcrição e modulação da expressão gênica [66-68]. As ERKs 1 e 2 são ativadas por vários fatores de crescimento e induzem a transição do estado quiescente para o ciclo celular. As vias de sinalização das ERKs também estão envolvidas na proliferação, diferenciação, reorganização da actina do citoesqueleto e migração celular.

Dependendo do tipo de célula e do estímulo, a ativação da ERK pode levar a proliferação ou diferenciação. A duração e a magnitude da ativação da ERK são o resultado da ação combinada e antagônica de quinases “upstream” e de proteínas fosfatases, as quais inativam as ERKs por desfosforilação dos sítios regulatórios [65].

Erks 5, 7 e 8

Enquanto as massas moleculares dos demais membros da família das MAPKs se encontra entre 38 e 54 kDa, a ERK5 apresenta uma massa de 90 kDa sendo, por isso, denominada de “Big MAPK” (ou BMK1) [69,70]. A ERK5 é amplamente expressa em muitos tecidos, incluindo o cérebro, sendo ativada pela MEK5 mas não pelas MEKs 1 e 2. Em contrapartida, a MEK5 é específica para ativação da ERK5 e não fosforila nenhum outro tipo de MAPK. Apesar de a ERK5 apresentar um motivo para fosforilação TEY similar ao das ERKs 1 e 2 e de metade do N-terminal apresentar homologia com outros membros da família de MAPKs, o tamanho da região C-terminal e uma única sequência na alça-12 diferenciam a ERK5 das ERKs 1 e 2 e de outros membros da família MAPK.

Um número expressivo de substratos tem sido identificado para a ERK5, incluindo o fator ativador de miócitos (MEF2C) [71, 72]; o ácido okadáico (inibidor de proteínas serina/treonina fosfatases PP1 e PP2A) bloqueia a ativação de ERK5 induzida por fatores de crescimento e estresse oxidativo.

Devido à similaridade entre as ERKs 1/2 e a ERK5, propõe-se que as vias de sinalização envolvendo a ERK5 devam aumentar o crescimento e sobrevivência, o que de fato tem se constatado, por exemplo, em células de câncer de mama nas quais a MEK5 demonstra um efeito protetor contra a ação de agentes quimioterápicos e contra a ativação de receptores de morte [73]. Além disso, outros trabalhos recentes em diferentes linhagens celulares também demonstram que a via MEK5-ERK5 está diretamente relacionada ao controle da sobrevivência celular [72].

Uma outra big MAPK denominada ERK7 é ativada por autofosforilação, regulada através de interações no seu próprio domínio C-terminal, sendo que este domínio também é requerido para localização da ERK7 no núcleo para atuar como supressor do crescimento celular [56]. A ERK8 compartilha 69% de homologia com a ERK7 e possui regiões C-terminal extendidas, apresentando também distintas quinases “upstream” para sua ativação [57]. Porém, pouco se conhece a respeito das funções biológicas das ERKs 7 e 8 em apoptose ou crescimento celular.

Via de sinalização com participação da ERK

A Figura 3 mostra a via de sinalização envolvendo Ras-Raf-MEK-ERK. Dois genes codificadores desta via são proto-oncogenes (*Ras* e *Raf*). Uma variedade de hormônios, fatores de crescimento e fatores de diferenciação, bem como substâncias promotoras de tumores, atuam nesta via [74].

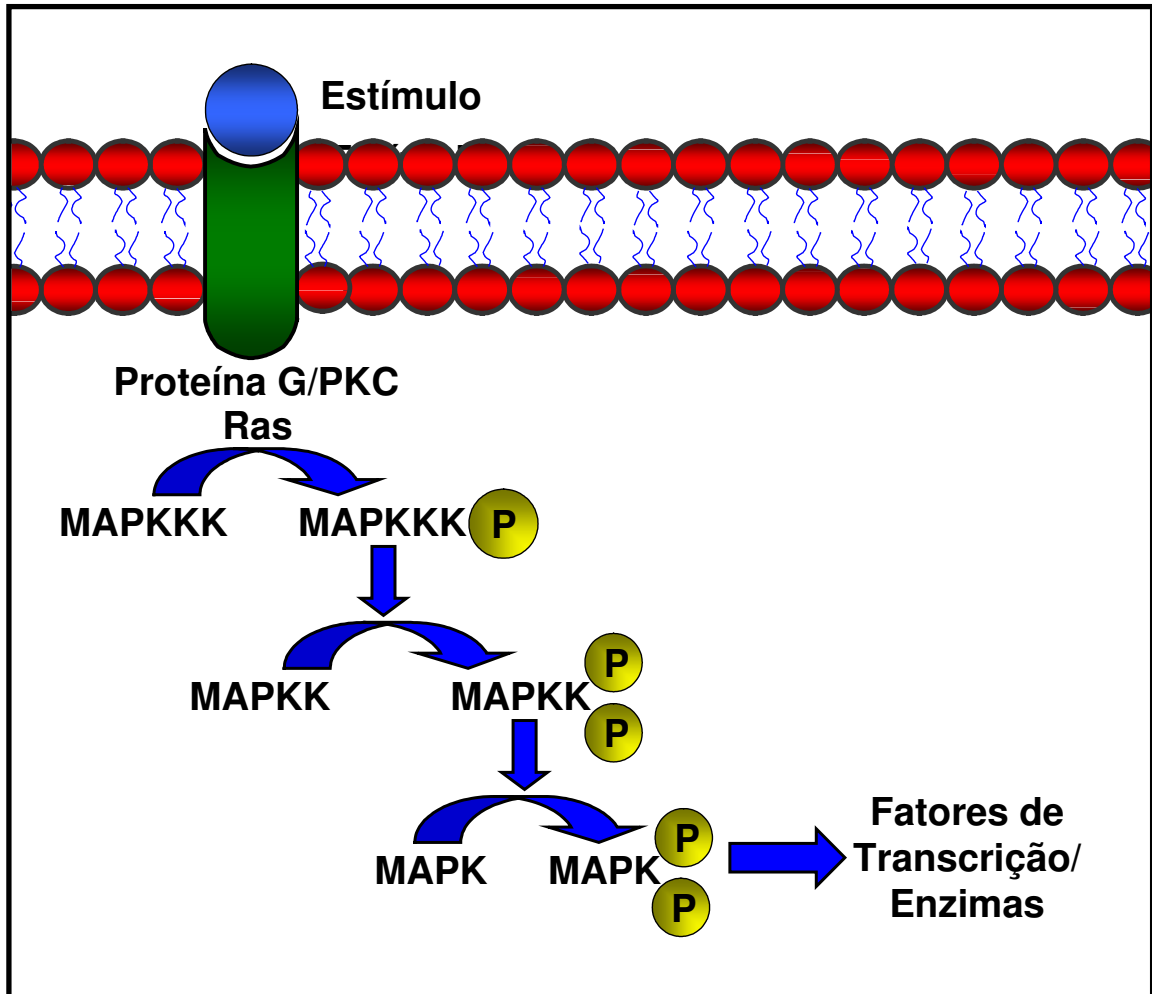


Figura 3. Via de sinalização com participação das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs). MAPKKK = Raf; MAPKK = MEK; MAPK = ERK.
(Fonte: Direta)

A maioria dos estímulos ativa a proteína Ras pela indução da troca de GDP por GTP, que converte a Ras para sua forma ativa [75]. A troca de GDP por GTP é regulada por fatores de troca (SOS), os quais são recrutados para a membrana celular onde a proteína Ras está ligada, logo após o estímulo. O fator de troca SOS é atraído para a membrana pela proteína adaptadora (proteína 2, ligada ao receptor do fator de crescimento), que reconhece os sítios de ancoragem tirosina-

fosfato localizados no próprio receptor ou nas proteínas que agem como substratos para o receptor. Em seguida, a proteína SOS estimula a troca GDP/GTP pela proteína Ras. A fosforilação de SOS pela ERK desfaz o complexo SOS e finaliza a ativação da Ras [76].

A proteína Ras funciona como um adaptador que se liga à Raf quinase (MAPKKK) com alta afinidade e causa sua translocação para a membrana celular, onde a Raf ativa atuará [77]. A proteína serina/treonina fosfatase (PP2A) remove fosforilações inibitórias que mantêm a Raf inativa, enquanto várias quinases, incluindo PAK e Src fosforilam a Raf, ativando-a [78]. A Raf ativa, irá atuar sobre a MEK (MAPKK). Em seguida, a MEK fosforila as ERKs 1 e 2 (p44 e p42-MAPK, respectivamente) no motivo Thr-Glu-Tyr, presente na alça de ativação. A ERK é uma serina/treonina quinase no final da via e atua sobre mais de 50 tipos de substratos como, por exemplo, c-Jun, c-Myc, ATF2, SAP-1 e MEF2C [58, 79-82].

1.2.2.2. JNK

As JNKs também são conhecidas como proteínas quinases ativadas por estresse (SAPKs). Proteínas JNKs de mamíferos são sintetizadas a partir de 3 genes: *jnk1*, *jnk2* e *jnk3*. No entanto, o “splicing” alternativo dá origem de 10 a 12 isoformas que podem apresentar 46 ou 54 kDa [83-85]. Os genes *jnk1* e *jnk2* são expressos ubiquamente, enquanto o *jnk3* é expresso primariamente no cérebro [83].

Como todas as MAPKs, a JNK requer fosforilação para se tornar ativa. As principais MAPKKs da via JNK são MKK4 e MKK7, as quais se tornam ativas a partir da cascata que se inicia com a proteína G (Rac e/ou Cdc42) [86]. A ativação das JNKs ocorre pela fosforilação de resíduos de tirosina e treonina diretamente pela MKK4 e MKK7 (também conhecidas como SEK1/JNKK1 e SEK2/JNKK2, respectivamente) mas não se dá pela ação de nenhuma outra MKK conhecida. Apesar de MKK4 e MKK7 serem estruturalmente relacionadas às MEKs 1 e 2, respectivamente, estas não ativam as JNK e nem as MKK 4 e 7 são capazes de ativar as ERKs. Isto implica a existência de cascatas paralelas e independentes

para essas diferentes MAPKs, a fim de permitir uma dicotomia funcional entre as diferentes vias de sinalização de quinases [87]. Também já foi demonstrado que MKK 4 e 7 são necessárias concomitantemente para que haja completa ativação das JNKs [88].

Tem sido proposto na literatura que a ativação das JNKs dispara a apoptose em resposta a muitos tipos de estresse, incluindo radiação UV, radiação- γ , inibidores de síntese protéica (como a anisomicina), choque osmótico, toxinas, isquemia/reperfusão, ataque cardíaco, choque térmico, drogas antineoplásicas, ceramida, peróxidos e citocinas inflamatórias (como, por exemplo, TNF- α e interleucina 1, IL-1) [89-93].

A proteína quinase quinase ativada pela proteína p21 (PAKK) também pode sofrer ativação pelas proteínas Rac e/ou Cdc42 ou diretamente por agentes estressores. Uma vez ativada, a PAKK fosforila a MEKK, culminando na ativação da JNK (Figura 4), fato que confirma, como mencionado, o importante papel dessas MAPKs na regulação da proliferação, desenvolvimento e apoptose [94-97].

As JNKs fosforilam fatores de transcrição como c-Jun, c-Myc, p53, ATF2, IRS-1, NFAT4, e Elk-1 (os quais controlam crescimento celular e apoptose) [98] e também proteínas que não são fatores de transcrição, como Bcl-2 e Bcl-X_L. Além disso, as JNKs têm sido extensivamente estudadas em modelos genéticos (ratos), sendo que todos os alelos da JNK já foram deletados. Diferentes células derivadas do knockout de JNK 1 ou 2 mostraram-se resistentes à apoptose [45]. No entanto, é importante ressaltar que outros estudos também têm revelado que as JNKs podem estar envolvidas em processos anti-apoptóticos e relacionadas, em muitos casos, à proliferação celular, expressão gênica via fatores de transcrição, indução do ciclo celular e, mesmo após vários anos de extensivas análises, o exato efeito e função das vias de sinalização envolvendo as JNKs ainda são bastante controversos [45]. Em uma mesma linhagem celular, uma só isoforma pode mostrar diferentes papéis. Por exemplo, fibroblastos embrionários de ratos (MEFs), deficientes em c-Jun (substrato da JNK) morrem mais facilmente quando comparados à linhagem de células selvagens, sugerindo que o c-Jun é importante para a sobre-

vivência celular. Em contrapartida, as mesmas células são resistentes à morte celular induzida por UV, o que indica que c-Jun também pode apresentar um papel pró-apoptótico [99].

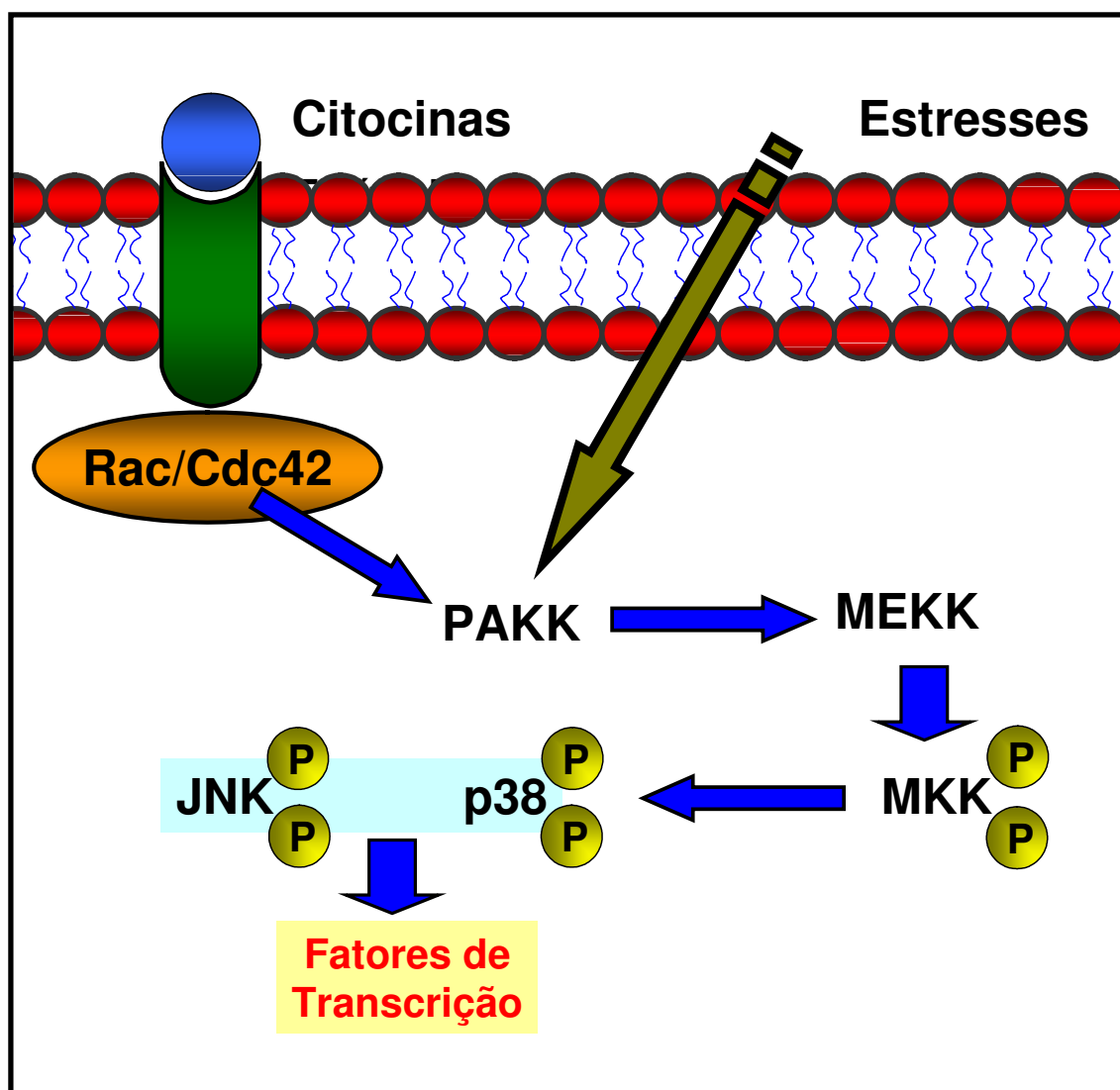


Figura 4. Principais vias de ativação das proteínas JNK e p38. (Fonte: Direta)

De qualquer forma, os resultados controversos relacionados ao papel das JNKs indicam que diferentes linhagens celulares, alterações no grau de maturação e diferenciação, além do status do ciclo celular, podem estar relacionados ao

balanço entre sobrevivência e morte celular; de que maneira as JNKs regulam esse “relógio molecular” é uma questão que ainda requer muita investigação.

1.2.2.3. p38 - MAPK

A família da MAPK p38 de mamíferos é ativada por estresse, incluindo irradiação UV, choque térmico, estresse osmótico, lipopolissacarídeos, inibidores de síntese protéica, citocinas pró-inflamatórias (IL-1 e TNF- α) e certos mitógenos [100]. Na maioria dos casos, a p38 é ativada simultaneamente com a JNK.

Pelo menos 4 isoformas da p38 (p38 α , p38 β , p38 γ e p38 δ) foram identificadas, sendo todas reguladas por fosforilação pela MAPK quinase MKK6 (SKK3) e algumas dessas isoformas são reguladas pelas MKK3 e MKK4 [101] (Figura 4). A p38 atua sobre diversas proteínas tais como a fosfolipase A2 citosólica, Stat1, ATF-2, Sap-1, GADD153p-1 e proteínas quinases ativadas por proteína quinase ativada por mitógeno (MAPKAPKs) [102].

A exemplo das JNKs, o envolvimento das p38 em apoptose é bastante diverso, participando em múltiplos eventos celulares como diferenciação, proliferação, secreção de citocinas, bem como apoptose.

Estudos demonstram que as vias de sinalização da p38 promovem morte celular, sendo que também tem se verificado seu papel na indução de sobrevivência celular, crescimento e diferenciação. A atividade da p38 é requerida para a interrupção do ciclo celular da fase G1 para S. Este papel inibitório pode ser mediado pela inibição da expressão da ciclina D1 [103,104]. Recentemente demonstrou-se que a p38 também está envolvida em vários processos de diferenciação como de adipócitos, cardiomiócitos, eritroblastos, mioblastos e neurônios [82].

1.2.3. MAPKs e câncer

Os tumores se desenvolvem quando o delicado balanço entre o ciclo celular, proliferação, diferenciação e apoptose é quebrado, seja por fatores genéticos ou ambientais [4]. Durante as neoplasias, as cascatas de MAPKs são desreguladas, sendo que um esforço intensivo no sentido de se descobrir novas estra-

tégias terapêuticas tem sido feito a fim de se tentar restabelecer a função das MAPks nas células tumorais [105, 106]. Como exemplo, sabemos que as ERKs 1 e 2 se encontram hiperativadas em leucemia, tumores epiteliais e em muitos outros tipos de células tumorais humanas [105-111]. A via da ERK5 também se encontra hiperativada em células cancerígenas [109, 112, 113]. Esses resultados sugerem que as cascatas das ERKs 1 e 2 e também a da ERK5 estão envolvidas na sobrevivência e proliferação das células tumorais e, portanto, podem ser importantes alvos para terapia das neoplasias.

No entanto, como discutido ao longo deste texto, o envolvimento das JNKs tanto em vias proliferativas como em vias apoptóticas torna o seu papel no desenvolvimento do câncer mais complexo, uma vez que esse antagonismo demonstrado pela JNK pode levar tanto à oncogênese como à apoptose [45]. Na mesma linha da JNK, o papel da p38 no câncer ainda é bastante controverso, uma vez que já se constatou que as vias de sinalização da p38 podem promover ou suprimir a proliferação de células de leucemia [107]. Considerando que a p38 também regula a expressão gênica [54, 55, 114] e a progressão do ciclo celular [115], modelos viáveis de terapia de câncer através das vias de sinalização envolvendo a p38 também deverão ser alvo de muita investigação.

1.3. Células de leucemia mielocítica 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 [116]. A leucemia mielóide aguda é caracterizada por uma expressiva insuficiência medular, responsável pela interrupção da maturação celular numa fase em que a célula granulocítica ainda se encontra indiferenciada (blasto) e, desta maneira, incapaz de exercer suas funções.

A linhagem de células HL60 foi estabelecida a partir do sangue periférico de uma paciente com leucemia mielocítica aguda e prolifera continuamente em suspensão. Ela consiste predominantemente de promielócitos [117, 118], apesar

de cerca de 4 a 5% das células HL60 apresentarem características morfológicas de células mielóides mais maduras como mielócitos, metamielócitos, bastões e leucócitos polimorfonucleares [117].

Além de serem indiferenciadas, as células HL60 não apresentam o gene que codifica a proteína p53 (que, como já mencionado, leva ao reparo do DNA ou indução da apoptose) e expressam significativamente proteínas anti-apoptóticas, como Bcl-2 e c-Myc. Essas características peculiares contribuem para a carcinogênese, ou seja, para a 'imortalidade' celular, de modo que a linhagem HL60 tem servido como um sistema modelo bastante conveniente para o estudo *in vitro* de apoptose e diferenciação de células leucêmicas, bem como para o desenvolvimento de novas drogas que possivelmente possam ser utilizadas na prevenção e tratamento de diferentes tipos de leucemia [116, 119].

Várias proteínas, tais como as proteínas quinases dependentes de ciclinas e as proteínas fosfatases [120] atuam na regulação do ciclo celular em células eucarióticas como, por exemplo, a fosfatase cdc25, a qual ativa o complexo ciclina-CDK, levando à progressão do ciclo celular. As células HL60 apresentam pelo menos 5 tipos de proteínas fosfatases: proteína serina/treonina fosfatases (PP1 e PP2A), proteína 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 [121]. A proteína tirosina fosfatase SHP-1 também está envolvida na regulação da diferenciação destas células [122]. A PP1 está envolvida na indução de apoptose pela desfosforilação da proteína retinoblastoma (Rb) a qual, como já discutimos, é responsável pela progressão do ciclo celular de G₁ para S [123]. A PP2A participa na regulação do metabolismo, transcrição, processamento do RNAm ("splicing"), tradução, diferenciação, ciclo celular, transformação oncogênica e transdução de sinal, sendo que a atividade desta enzima pode ser modulada por fosforilação e metilação do C-terminal. A ação anti-apoptótica das fosfatases PP1 e PP2A foi evidenciada com a utilização de inibidores destas enzimas (ácido okadáico e caliculina, respectivamente), que induzem apoptose das células HL60 [116].

1.3.1. Diferenciação de células de leucemia humana

Desde as primeiras descobertas de que determinados tipos de células leucêmicas poderiam ser induzidas a uma diferenciação terminal em células não divisíveis gerando células normais, no início da década de 1970 [124], extensiva investigação tem sido realizada no sentido de se desenvolver o que passou a ser chamada "terapia de diferenciação", que consiste no tratamento com agentes que induzem diferenciação terminal de células tumorais [125,126]. Além disso, intensificaram-se as buscas por sistemas celulares que pudessem ser utilizados como modelos convenientes de estudo, além de se despertar também um grande interesse pelos progenitores hematopoiéticos dos diferentes tipos celulares, em busca de novos agentes antineoplásicos [127].

Os agentes quimioterápicos convencionais são utilizados clinicamente no tratamento de neoplasias quando a cirurgia ou radioterapia se mostram ineficazes no controle de carcinomas metastáticos. Entre os quimioterápicos convencionais incluem-se agentes alquilantes, antimetabólitos, bloqueadores de mitose, inibidores do ciclo celular, cisplatina e derivados, citocinas etc. A grande maioria dos quimioterápicos convencionais ou mata as células cancerígenas diretamente ou bloqueia sua proliferação através da interrupção do ciclo celular em uma determinada fase (S, M ou na interfase entre S e G₂) [127].

Apesar do grande progresso alcançado no tratamento da leucemia durante os últimos anos, muitos problemas ainda existem no tratamento da doença, tais como o desenvolvimento de resistência múltipla às drogas (MDR), a enorme diversidade na morfologia e fisiologia dos neoplasmas, a grande heterogeneidade molecular nos tumores malignos, a disponibilização inadequada dos agentes antineoplásicos nas células-alvo e a falta de ação seletiva dos agentes antineoplásicos utilizados nos tratamentos sistemáticos, gerando uma citotoxicidade inespecífica de amplo espectro [128, 129].

Desta maneira, além da necessidade do desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos que induzam as células neoplásicas a apoptose, um dos

grandes focos de interesse no tratamento do câncer atualmente é a descoberta de novas drogas que levem à diferenciação terminal das células malignas.

Uma grande variedade de compostos induz diferenciação das células HL60 em granulócitos maduros, tais como, dimetilsulfóxido (DMSO), actinomicina D, hipoxantina, dimetilformamida (DMF), ácido retinóico e metilprednisolona [130]. Outros compostos como o 12-o-tetradecanoilforbol 13-acetato (TPA), 1,25 di-hidroxivitamina D₃ e butirato de sódio levam à diferenciação das mesmas em monócitos/macrófagos [118,131,132]. Uma vez que vários autores têm demonstrado que a diferenciação das células HL60 passa a conferir às mesmas funcionalidade semelhante à de células maduras do sangue periférico, a indução de diferenciação celular e iniciação do processo apoptótico por diferentes agentes podem representar estratégias interessantes para o estabelecimento de novas terapias, resultando em menor morbidade quando comparado ao que ocorre em tratamentos com agentes citotóxicos [119].

1.4. Violaceína

A Violaceína, 3-[1,2-dihidro-5-(5-hidróxi-1H-indol-3-il)-2-oxo-3H-pirrol-3-ilideno-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona, é um pigmento produzido pela bactéria *Chromobacterium violaceum* do rio Amazonas e tem sido estudada devido às suas múltiplas atividades biológicas, tais como potencial efeito citotóxico e indução de apoptose em culturas de células normais [133] e em células da leucemia mielocítica humana, HL60 [134].

Após o isolamento da *Chromobacterium violaceum* em 1976 [135], o potencial fototerapêutico da violaceína foi extensivamente estudado [136, 137, 138, 139] e, com o estabelecimento da cepa CCT 3496 da *Chromobacterium violaceum*, a produção, extração e purificação do pigmento foram otimizadas e estudos relacionados à sua biossíntese, bem como reações de biotransformação foram realizados [140, 141, 142].

Na literatura, diversos trabalhos demonstram o potencial biológico da violaceína como bactericida [143, 138], tripanocida [144, 145, 146], antiulcerogênico [147], antileishmania [148] e antitumoral [134, 149].

A atividade antitumoral da violaceína foi testada inicialmente *in vitro* pelo National Cancer Institute (Developmental Therapeutics Program), nos Estados Unidos, em 53 linhagens de diferentes células neoplásicas com valores significativos de IG_{50} (50% de inibição de crescimento celular) [139].

Na linhagem específica de células de leucemia humana, HL60, obteve-se um valor de IC_{50} inferior a $1\mu\text{mol.L}^{-1}$ em ensaios de redução do MTT, sendo que a indução de apoptose também foi observada através de alterações morfológicas e pelo aumento na atividade de caspase-2 e caspase-9 (de 3 e 4 vezes, respectivamente) [134]. O ensaio de redução do NBT (nitro blue tetrazolium) funciona como marcador de diferenciação das células HL60 as quais, após tratamento com violaceína, apresentaram 30% de indução de diferenciação inespecífica [134].

Ferreira et al. demonstraram recentemente que a violaceína é membro de uma nova classe de drogas mediadoras de apoptose em células HL60, via ativação específica do fator de necrose tumoral 1 (TNFR1) e que sua citotoxicidade é precedida pela ativação de caspase-8, do fator de transcrição NF- κ B e da p38-MAPK [150].

Uma vez que a violaceína é pouco solúvel em água, algumas de suas atividades biológicas foram avaliadas utilizando-se complexos de inclusão com β -ciclodextrina (β -CD), na tentativa de alterar algumas propriedades físico-químicas da substância no sentido de aumentar a sua biodisponibilidade [151, 134].

A Figura 5, abaixo, mostra a fórmula estrutural plana da violaceína:

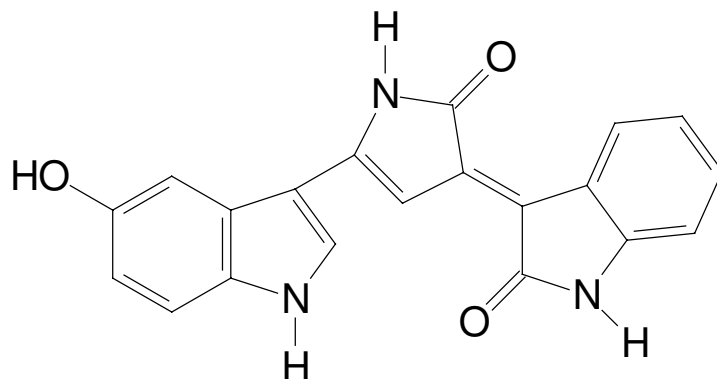


Figura 5. Fórmula estrutural plana da violaceína. (*Fonte: Referência 143*)

1.5. Tetrahidroquinona (THQ)

O mecanismo de ação de fármacos antineoplásicos, na maioria das vezes, envolve alteração do estado redox celular. As quinonas, de modo geral, por apresentarem esta característica, têm sido utilizadas no desenvolvimento de novos fármacos e no estudo das vias envolvidas na citotoxicidade destes compostos, incluindo a regulação da expressão gênica [152].

As quinonas apresentam importante papel em vários processos biológicos, tais como, transporte de elétrons e produção de energia (ubiquinona), ação bactericida, fungicida e antitumoral [153]. A ação citotóxica das quinonas é devida à redução metabólica ou à ligação direta a grupos essenciais de macromoléculas. Desta maneira, a toxicidade das quinonas está normalmente relacionada com alteração do estado redox celular [154].

A tetrahidroquinona (tetrahidroxi-1,4-quinona), THQ, é um pró-oxidante similar aos polifenóis fisiológicos como os catecóis e catecolaminas. Apesar dos seus papéis fisiológicos e farmacológicos, esses compostos podem apresentar

propriedades toxicológicas por induzirem estresse oxidativo através da produção de espécies reativas de oxigênio, radicais quinonas e ácido rodizônico que, por sua vez, também gera citotoxicidade através de reações auto-redox [155].

A THQ apresenta grupamentos -OH no anel benzoquinona na posição *para*, os quais podem funcionar como doadores de prótons, gerando o ânion superóxido e radicais semiquinona (SQH[•]), de acordo com a Figura 6 [155]:

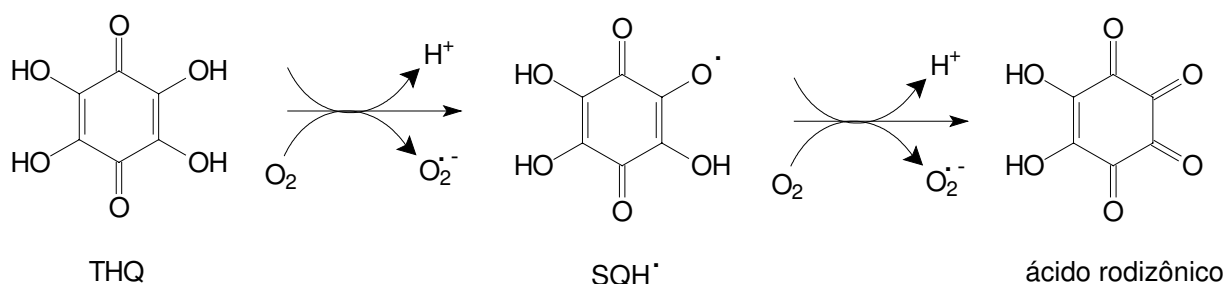


Figura 6. Mecanismo envolvido na formação de radicais semiquinona e ácido rodizônico, a partir da THQ. (*Fonte: Referência 155*)

A escolha da THQ para a realização de estudos de citotoxicidade em células de leucemia mielocítica humana (HL60) foi feita principalmente devido à analogia desse composto com compostos fisiologicamente relevantes, uma vez que a alta taxa de autoxidação da THQ possibilita a geração de uma condição de estresse oxidativo bastante conveniente para se estudar os mecanismos envolvidos na formação de EROs e suas implicações em culturas de células leucêmicas.

2. *OBJETIVOS*

Em pesquisa realizada pela Organização Mundial de Saúde, o câncer é a terceira causa de óbitos no mundo, matando cerca de 6 milhões de pessoas por ano. No Brasil, é a segunda causa de mortes por doença, com estimativa de mais de 120.000 óbitos anualmente, sendo que um dos fatores que mais restringem a possibilidade de melhora desses dados estatísticos é o desenvolvimento de resistência, por parte dos pacientes, aos agentes quimioterápicos já existentes. Desta forma, a busca por novos compostos com potenciais promissores de utilização terapêutica consiste em um dos maiores desafios para a pesquisa nos próximos anos. Além disso, uma melhor compreensão, em nível molecular, do comportamento de células leucêmicas tratadas com um determinado composto é, sem dúvida alguma, uma meta muito importante para a elucidação de novos alvos de tratamento. Portanto, os objetivos inicialmente traçados para o presente trabalho foram os seguintes:

- Estudar a modulação das Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos (MAPKs) e outros mediadores em células HL60 induzidas a apoptose por tratamento com tetrahidroxiquinona (THQ);
- Definir o mecanismo apoptótico mediado pela THQ (receptor ou mitocondrial);
- Realizar estudos de diferenciação das células HL60 pela violaceína, focalizando a modulação das MAPKs, e avaliar a utilização de pepchips como ferramentas de estudo das vias de transdução de sinal envolvidas no processo de diferenciação.

3. *CAPÍTULO 1*

Reactive oxygen species induce apoptosis via the mitochondrial pathway due to diminished survival signalling

Alexandre D. Martins Cavagis^{1,2}, Carmen Veríssima Ferreira^{1,2}, Henri H. Versteeg², Cristiane Fernandes Assis¹, Carina L. Bos², Sylvia A. Bleuming², Sander H. Diks³, Hiroshi Aoyama¹ and Maikel P. Peppelenbosch^{3,4}

¹ Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP),
Campinas, São Paulo, Brazil.

² Department of Experimental Internal Medicine, Academic Medical Center (AMC)
University of Amsterdam, The Netherlands.

³ Department of Cell Biology, University of Groningen, Antonius Deusinglaan 1
NL-9713 AV Groningen, The Netherlands

Abstract

The redox state of the cell is a major determinant of cellular function and production of reactive oxygen species (ROS) is an important cytotoxic mechanism in the therapy of cancerous disease. Remarkably, the molecular mechanisms mediating ROS-dependent cytotoxicity remain poorly understood. We investigated in HL60 cells the effect of tetrahydroxyquinone, a highly redox active molecule which can take part in a redox cycle with semiquinone radicals, leading to formation of ROS. This quinone caused substantial ROS formation followed by cytotoxicity which was sensitive to glutathione and N-acetyl-L-cysteine. We observed that ROS production coincided with HL60 cell apoptosis through the mitochondrial pathway, and was accompanied by reduced activity of various anti-apoptotic survival molecules including the protein kinase B pathway. Importantly, transfection of protein kinase B into HL60 cells and thus artificially increasing protein kinase B activity inhibited ROS-dependent cytotoxicity. We concluded that the cytotoxic effects of intracellular ROS generation are mediated by reduced protein kinase B-dependent survival signalling followed by apoptosis through the mitochondrial pathway.

Keywords: HL60 cells; tetrahydroxyquinone; protein phosphatases; MAPKs; oxidative stress.

INTRODUCTION

It is now generally recognised that the reactive oxygen species (ROS) play an important role as regulatory mediators in signalling processes (1).

Accordingly, it has now been shown that a multitude of physiological processes is under the direct control of ROS, the most important being the regulation of vascular tone, the sensing of oxygen tension, the enhancement of leukocyte signal transduction and the induction of apoptosis, the latter as an essential component of the TNF α -dependent signal transduction (2-5). Therefore, ROS generation is a major element in the control of cellular biochemical processes. Moreover, ROS generation is important for inducing cytotoxicity in cancer cells, but the molecular mechanisms underlying these cytotoxic effects remain unclear, hampering the development of more effective drugs.

ROS formation depends on the univalent reduction of triplet-state molecular oxygen (6). This process is mediated by enzymes such as NAD(P)H oxidases and xanthine oxidase or nonenzymatically by redox-reactive compounds such as tetrahydroxyquinone (7-9). Superoxide dismutases convert superoxide enzymatically into hydrogen peroxide or non enzymatically into nonradical species, hydrogen peroxide and singlet oxygen.

Hydrogen peroxide may be converted into water by the enzymes catalase or glutathione peroxidase. The latter enzyme oxidizes glutathione to glutathione disulfide, which can be converted back to glutathione by glutathione reductase in an NADPH-

consuming process (10, 11). Thus, the biochemistry of ROS generation is relatively well understood.

The biological effects of ROS production, however, are less clear. At high concentrations, ROS are dangerous to living organisms, damaging virtually all cellular constituents (6). Nevertheless, at moderate concentrations, ROS play important roles in the control of various cellular functions, and the cellular generation of ROS is actively induced under various conditions (1, 6). The archetypal example is NADPH oxidase activation resulting ROS production upon immune stimulation of the phagocytic cells of the myeloid lineage which, apart from its bactericidal function, is also instrumental for the induction of pro-inflammatory gene transcription and, thus, phagocyte ROS production is pivotal for proper function of the innate immune system (12-14).

Despite the fundamental role for ROS signalling in phagocyte cellular physiology, the effects of ROS production on HL60 cells signal transduction cascades remain surprisingly poorly characterized. This consideration prompted us to investigate the consequences of tetrahydroxyquinone-dependent ROS generation in HL60 cells. We observed that the tetrahydroxyquinone-induced ROS production coincided with HL60 cells apoptosis through the mitochondrial pathway, as well as with reduced activity of the anti-apoptotic protein kinase B and NF- κ B pathways, concomitantly with specific activation of Jun-N-terminal kinase and protein phosphatases. Thus, these data provide a molecular mechanism underlying ROS-induced cytotoxicity.

MATERIALS AND METHODS

Cell line and reagents

HL60 cells were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). Polyclonal antibodies anti-caspase 3, anti-

⁴corresponding author (M.P.Peppelenbosch)

Tel: 31-50-363 2522 Fax: 31-50-363 2512

e-mail address: M.Peppelenbosch@med.rug.nl

BAD, anti-phospho-BAD, anti-phospho-p38 MAPK, anti-phospho-I κ B, anti-I κ B, anti-phospho-PKC delta, anti-phospho-PKB, anti-phospho-Raf, anti-phospho-p42/44, anti-phospho-JNK, anti-phospho-CREB, anti-rabbit and anti-mouse peroxidase-conjugated antibodies were purchased from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). The antibodies against phospho-PP2A, phosphotyrosine, phospho-threonine and NF- κ B (p50 and p65) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Tetrahydroxyquinone was purchased from Sigma Chemical Company.

Cell Culture and viability assays

HL60 cells were routinely grown in suspension in RPMI 1640 medium supplemented with 2 mM glutamine, 100 IU/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin and 10% heat-inactivated fetal bovine serum, at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. In all experiments, 3×10^5 cells/ml were seeded and, after 72 h, treated with different tetrahydroxyquinone concentrations for the specified periods of time.

Cell viability was assessed based on trypan blue dye exclusion and three additional parameters: MTT reduction, protein phosphatase activity and determination of the total protein amount.

MTT reduction assay

The medium containing tetrahydroxyquinone was removed and 1.0 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 released by solubilisation in 1.0 ml of ethanol. The plate was shaken for 5 min on a plate shaker and the absorbance was measured at 570 nm (15, 16).

Protein phosphatase assay

The phosphatase extract was obtained by lysing the cells with acetate buffer 0.1 mM (pH 5.5). Then, the enzyme activity was measured in a reaction medium (final volume, 1.0 ml) containing 100 mM acetate buffer (pH 5.5), 5.0 mM pNPP and cell extract enzyme. After a 30 min incubation at 37°C, the reaction was stopped by adding 1.0 ml of 1.0 M NaOH. The amount of pNP released was measured at 405 nm (17).

Protein quantification

Protein concentrations were determined by a modification of the Lowry method as described by Hartree (18).

Reduced glutathione determination

The concentration of reduced glutathione in HL60 cells was determined after treatment of the cells for 24 h. The cells (3×10^5 /ml) were washed with physiological solution and lysed with water; 3 ml of precipitant solution (1.67 g glacial metaphosphoric acid, 0.2 g ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and 30 g NaCl in 100 ml MilliQ water) was added to the lysate (2 ml). After 5 min, this mixture was centrifuged and 0.4 ml of the supernatant was added to 1.6 ml of reaction medium (0.2 M Na₂HPO₄ buffer, pH 8.0; 0.5 mM DTNB dissolved in 1% sodium citrate). Subsequently, the absorbance of the product (NTB) was measured at 412 nm and reduced glutathione concentration calculated using the extinction coefficient $E = 13.6 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (19).

Spectrofluorometric determination of ROS

HL60 cells were treated with 100 μ M tetrahydroxyquinone or the combinations tetrahydroxyquinone/10 mM glutathione and tetrahydroxyquinone/15 mM N-acetyl-L-cysteine for 24 h in RPMI 1640 (without phenol red) containing 5% serum.

Afterwards, the cells (2×10^6 /10 ml) were washed with PBS and resuspended in RPMI 1640 (without phenol red, with 5% FBS) containing 20 μ M DCFH-DA (dichlorofluorescein diacetate). After 30 min of incubation at 37°C, the cells were washed three times and resuspended in RPMI 1640 (without phenol red, with 5% FBS). The fluorescence of the suspension was measured using a RF-5300 PC Shimadzu spectrofluorometer with excitation at 485 nm and emission at 530 nm.

DNA fragmentation analysis

The cell pellets (5×10^6) were lysed in 0.5 ml of lysis buffer containing 5 mM Tris-HCl, 20 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and 0.5% Triton X 100. After centrifugation at 1,500 $\times$ g for 10 min, the pellets were resuspended in 250 μ L of lysis buffer and, to the supernatants (S), 20 μ L of 6 M perchloric acid was added. Then, 500 μ L of 10% trichloroacetic acid (TCA) were added to the pellets (P), the samples were centrifuged for 10 min at 5,000 rpm and the pellets were resuspended in 250 μ L of 5% TCA followed by incubation at 100°C for 15 min. Subsequently, to each sample, 500 μ L of solution (15 mg/ml DPA in glacial acetic acid), 15 μ L/ml of sulfuric acid and 15 μ g/ml acetaldehyde were added and incubated at 37 °C for 18 h (20). The proportion of fragmented DNA was calculated from the absorbance at 594 nm using the following formula:

$$\text{Fragmented DNA (\%)} = 100 \times (\text{amount of the fragmented DNA in the supernatant}) / (\text{amount of the fragmented DNA in the supernatant} + \text{amount DNA in the pellets}).$$

Western blotting

Cells (3×10^7) were lysed in 200 μ L of lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1% Tween 20, 0.25% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM NaF and protease

inhibitors (1 μ g/ml aprotinin and 1 μ g/ml 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride)] for 2 h on ice. Protein extracts were cleared by centrifugation and protein concentrations were determined using a Lowry protein assay. An equal volume of 2X sodium dodecyl sulfate (SDS) gel loading buffer [100 mM Tris-HCl (pH 6.8), 200 mM DTT, 4% SDS, 0.1% bromophenol blue and 20% glycerol] was added to the samples, which were subsequently boiled for 10 min. Afterwards, cell extracts were resolved by SDS-polyacrylamide gel (12%) electrophoresis (PAGE) and transferred to PVDF membranes. Membranes were blocked in 1% fat-free dried milk or bovine serum albumin (2%) in Tris-buffered saline (TBS)-Tween 20 (0.05%) and incubated overnight at 4°C with appropriate primary antibody at 1:1000 dilution. After washing in TBS-Tween 20 (0.05%), membranes were incubated with anti-rabbit or anti-mouse horseradish peroxidase conjugated secondary antibodies, at 1:2000 dilutions, in blocking buffer for 1h.

Detection was performed using enhanced chemiluminescence (ECL).

Mitochondrial extract preparation (cytochrome c release)

For cytochrome *c* analysis, the cells were washed with ice cold PBS and resuspended in lysis buffer containing 220 mM mannitol, 68 mM sucrose, 50 mM Hepes-NaOH, pH 7.4, 50 mM KCl, 5 mM EGTA, 2 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, and protease inhibitors (1 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/ml leupeptin and 1mM 4-(2-amino-ethyl)-benzolsulfonyl-fluoride-hydrochloride). After incubation on ice for 1 h, the lysate was centrifuged at 14,000 $\times$ g for 15 min. Then, the supernatant was resolved by SDS-PAGE.

Annexin V and 7-amino-actinomycin D assays

Control and tetrahydroxyquinone-treated cells were collected and resuspended in 1X binding buffer (0.01 M Hepes/NaOH, pH 7.4, 0.14 mM NaCl and 2.5 mM CaCl₂) at a concentration of 1×10^6 cells/ml. Subsequently, 100 μ l of cell suspension were transferred to a 5 ml tube and Annexin V FITC (5 μ l) and 7-amino-actinomycin D (7-AAD) - (10 μ l) were added. The cells were incubated at room temperature for 15 min, after which 400 μ l of 1X binding buffer was added and apoptosis then analyzed by flow cytometry.

Transient transfection of HL60 cells

HL60 cells (4×10^6) were transfected with 0.4 μ g of a plasmid expressing GAG-PKB, a constitutive form of PKB. Cells were cotransfected with 0.1 μ g of a pUT-galactosidase to normalize for transfection efficiency. After transfection, the cells were cultured for 24h, harvested, lysed in commercially available reporter lysis buffer (Promega) and β -galactosidase activity was determined using chlorophenol red- β -D-galactopyranoside (Roche) as substrate.

Transfected cells were treated with tetrahydroxyquinone for 24 h and the cell viability was assessed by MTT reduction. The expression of PKB was evaluated by western blotting.

Statistical evaluation

All experiments were performed in triplicate and the results shown in the graphs represent the mean and standard deviation. Cell viability data were expressed as the means $\pm$ standard errors of three independent experiments carried out in triplicates. Data from each assay were analyzed statistically by ANOVA followed by a Dunnett's test. Multiple comparisons among group mean differences were checked with Tukey *post hoc* test.

Differences were considered significant when the *p* value was less than 0.05. Western blottings represent three independent experiments.

RESULTS

ROS-dependent JNK and protein phosphatase activation in HL60 cells

Evidence has been presented that the redox state of HL60 cells may influence cellular physiology of this cell type, which leads to differentiation or cytotoxicity (21). The responsiveness of HL60 cells to ROS generation was confirmed by measuring the cellular glutathione and ROS levels after 24 h of treatment with tetrahydroxyquinone. An increase in cellular glutathione levels is a well-established response to ROS production and, accordingly, the cellular levels of glutathione were significantly increased by the tetrahydroxyquinone treatment (Figure 1A). In agreement, the production of ROS by tetrahydroxyquinone was stimulated and, as expected, it was antagonised by the addition of reduced glutathione or N-acetyl-L-cysteine (Figure 1B). Thus, tetrahydroxyquinone treatment is a bonafide experimental system to study the consequences of ROS signalling on signal transduction.

Afterwards, we decided to investigate the effects of ROS signalling on the MAP kinase family, since this family of kinases is a major determinant of cellular physiology in HL60 cells (22). In myeloid leukemia cell lines, the p42/p44 MAP kinase cascade positively regulates differentiation into the monocyte lineage and is instrumental for phorbol ester-dependent differentiation of this cell type, while inhibition of the JNK has been implicated in 1,25-dihydroxy-vitamin D₃-dependent HL60 cell differentiation. Conversely, in HL60 cells, JNK activation is linked to apoptosis (23).

We observed that tetrahydroxyquinone treat-

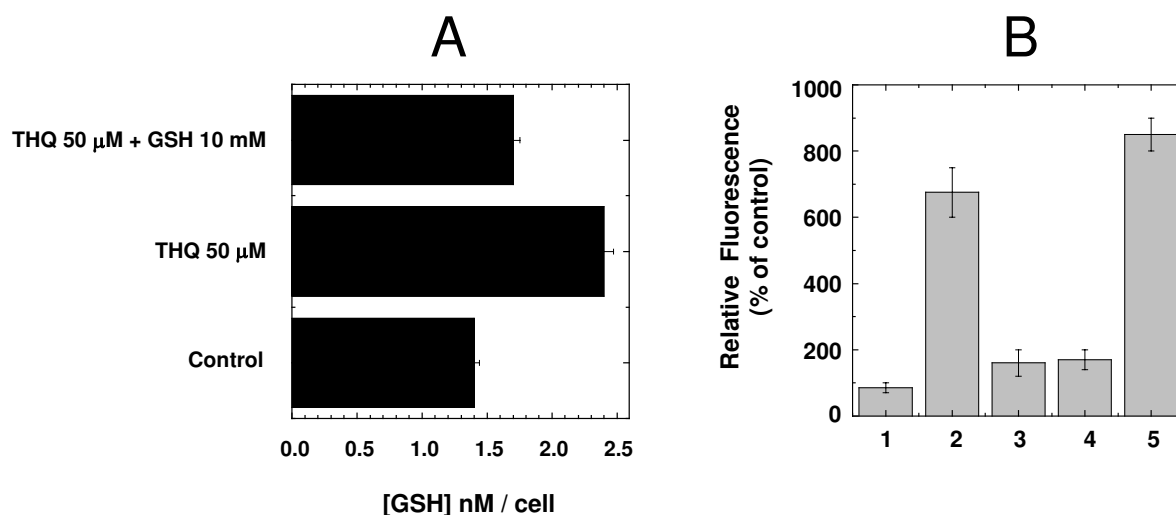


Figure 1. Oxidative stress caused by tetrahydroxyquinone in HL60 cells. Determination of reduced glutathione in HL60 cells. (A) The amount of reduced glutathione was determined after treatment of the cells for 24h as indicated. (B) **1** - Non-treated HL60 cells (control); **2** - tetrahydroxyquinone (100 μ M) - treated cells; **3** - HL60 cells pre-treated with N-acetyl-L-cysteine (15 mM) and **4** - HL60 cells pre-treated with reduced glutathione (10 mM) for 30 min. For conditions **3** and **4**, the cultures were further incubated with 100 μ M tetrahydroxyquinone for 24h. Afterwards, a 30 min incubation with DCFH-D was carried out and the fluorescence intensity was recorded by spectrofluorometry. The results were expressed as the relative fluorescence intensity with respect to untreated cells. **5** - As a positive control, H₂O₂ (10 mM) treated cells were used to monitor the level of ROS. Bars represent mean $\pm$ standard error derived from two separate experiments.

ment strongly activated JNK. Unexpectedly, a modest increase in the phosphorylation of p38 MAP kinase with little effect on the activation state of p42/44 MAP kinase was observed (Figure 2A). Thus, ROS-induced changes in the activation of MAP kinase family members are discordant with an effect on differentiation induction, but may indicate an effect of ROS generation on apoptosis in this cell type, since it has been reported that JNK activation is associated with apoptosis induction of HL60 cells (23, 24).

Despite the induction of oxidative stress by tetrahydroxyquinone, unusual activations of both protein tyrosine phosphatases and protein serine/threonine phosphatases coinciding with the activation of PP2A were observed (Figure 2B).

ROS production induces apoptosis in HL60 cells

Our observation that ROS production is linked to JNK activation, as well as published data that glutathione deprivation of HL60 cells causes cell death, suggest that ROS induces apoptosis in this cell type. This notion was confirmed by experiments in which the effect of ROS generation on HL60 viability was examined directly after a 24h treatment with tetrahydroxyquinone. As can be seen in Figure 3A and B which show the inhibition of mitochondrial function (MTT reduction) and cell metabolism, for both parameters, the same IC₅₀ value was obtained (50 μ M). Under the same conditions, the protein content decreased approximately 30%. Confirmation that these effects were mediated via changes in the redox state of the cell was obtained in experiments in which the effects of this compound was tested in the presence of 10 mM glutathione, leading to a significant rightward shift of the dose-response curve

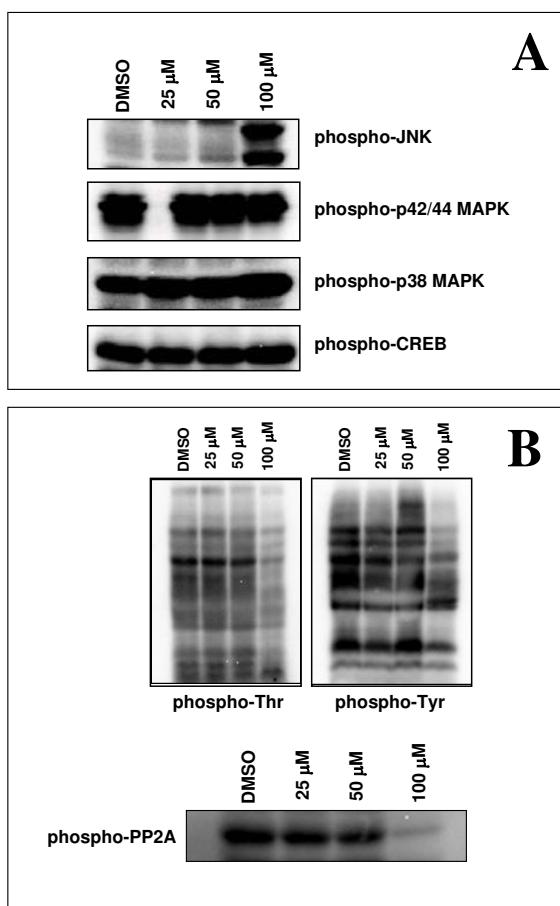


Figure 2. Effect of tetrahydroxyquinone on MAP kinase and protein phosphatase activities. The phosphorylation and expression of MAPKs (A), phosphoprotein profiles and phospho-PP2A (B) were evaluated by immunoblotting.

(Figure 3B). This reduction in cell viability was a consequence of apoptosis. The tetrahydroxyquinone incubation efficiently caused phosphatidylserine exposure, caspase 3 activation and DNA fragmentation (Figure 4 A, B and C).

ROS-induced apoptosis coincides with activation of the mitochondrial pathway through diminished protein kinase B activation

Apoptosis can be executed through two basic signalling pathways: the extrinsic pathway and the mitochondrial intrinsic pathway. We observed that application of tetrahydroxyquinone induced the release of cytochrome c from the mitochondria, which

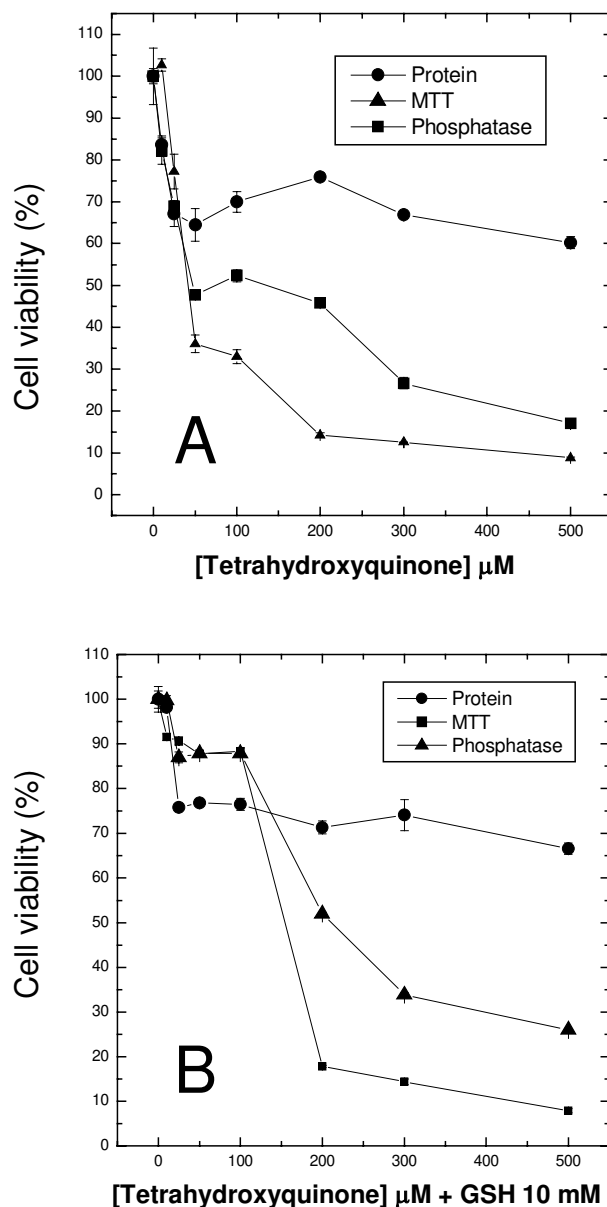


Figure 3. Effect of tetrahydroxyquinone on HL60 cell viability. HL60 cell viability was evaluated using three different parameters (protein content, MTT reduction and phosphatase activity) after treatment with tetrahydroxyquinone for 24 h, in the absence (A) and presence (B) of 10 mM reduced glutathione. In both graphics, each point represents the mean $\pm$ standard error of three independent experiments.

confirmed that ROS activates the mitochondrial pathway (Figure 5). Importantly, the phosphorylation of Ser112 Bad, which leads to cell survival by inhibiting the mitochondrial pathway was concomitantly decreased.

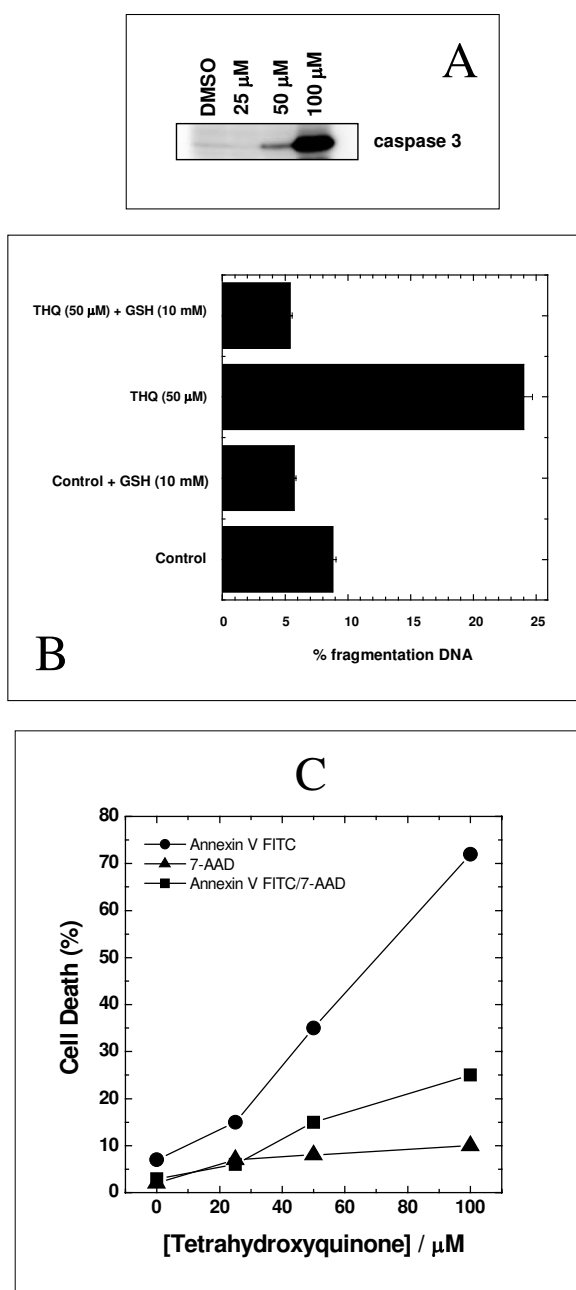


Figure 4. Apoptosis induction by tetrahydroxyquinone.

(A) Cells were treated with tetrahydroxyquinone as indicated and lysates were resolved by immunoblotting as described in methods to assess the level of active caspase 3. (B) The samples were prepared as described by Zhu and collaborators (20) and the proportion of fragmented DNA was calculated from absorbance at 594 nm using the approach described in methods. The bars represent the mean $\pm$ standard error of three experiments. (C) Cell samples were prepared as described in Methods and Annexin V-positive, 7-AAD-positive and Annexin V/7-AAD-positive populations were analyzed by flow cytometry.

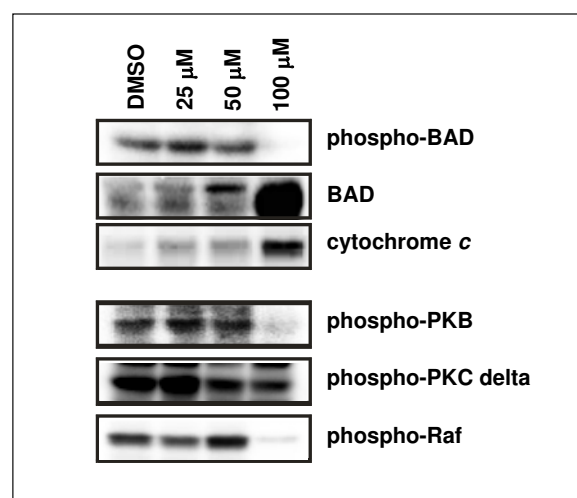


Figure 5. Participation of mitochondria in the HL60 cells apoptosis induction by tetrahydroxyquinone. Cells were treated with tetrahydroxyquinone as indicated and lysates were resolved by immunoblotting as described in methods to assess phospho-PKB, phospho-Bad and Bad.

In agreement, tetrahydroxyquinone treatment also caused decrease of phosphorylation of Ser473 in protein kinase B (the Bad kinase for Ser112), demonstrating that ROS signalling reduces activity of this anti-apoptotic kinase and, consequently, leads to apoptosis. The importance of mitochondria for apoptosis-induction by tetrahydroxyquinone was also confirmed by an increase of Bad (Bad phosphorylation followed by its ubiquitination and proteolysis mediate protein kinase B effects on the mitochondrial pathway). In addition, inhibition of two other kinases involved in the survival signalling: Raf and PKC delta, reinforced our hypothesis that tetrahydroxyquinone presents a primary effect on cell survival signalling pathway (Figure 5).

In addition, further evidence for survival pathway inhibition by tetrahydroxyquinone was demonstrated through down regulation of NF- κ Bp65 and a decrease in phosphorylated I κ B (Figure 6)

Independent support for this conclusion was obtained in experiments in which protein kinase B

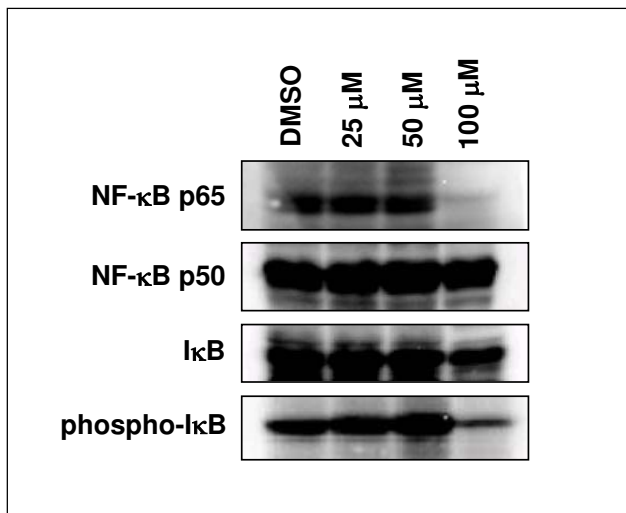


Figure 6. Inhibition of nuclear factor kappa B by tetrahydroxyquinone. HL60 cells were treated with tetrahydroxyquinone as indicated and the level of both subunits of NF- κ B (p65 and p50) and its phosphorylated inhibitory protein (I κ B) were analysed by western blotting

activity was artificially increased by transfection with GAG-protein kinase B, a constitutive active form of protein kinase B, expression construct. As it has been shown in the Figure 7, HL60 cells transfected with protein kinase B became resistant to tetrahydroxyquinone.

DISCUSSION

It is now generally recognised that ROS play an important role as regulatory mediators in signalling processes, especially in phagocytes. The effects of ROS production on HL60 cells signal transduction cascades remain surprisingly poorly characterized. This consideration prompted us to investigate the consequences of tetrahydroxyquinone-dependent ROS generation in HL60 cells. We observed that ROS production coincided with HL60 cell apoptosis through the mitochondrial pathway, and with reduced activity of various anti-apoptotic

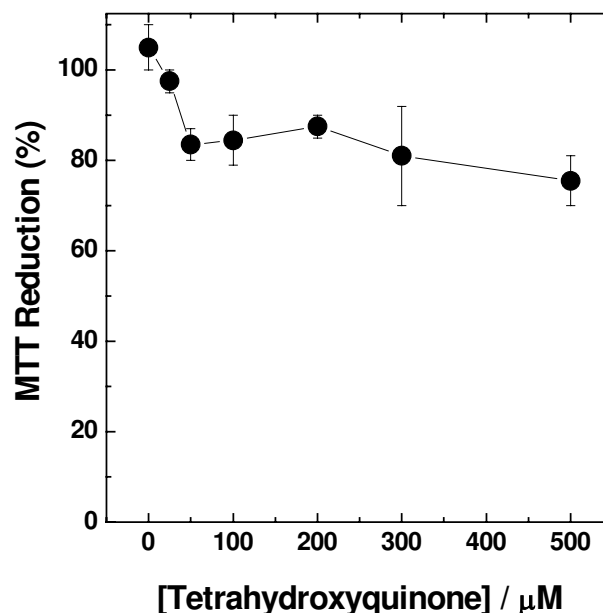


Figure 7. Viability analysis of HL60 cells transfected with PKB. HL60 cell viability was evaluated using MTT assay after treatment with tetrahydroxyquinone for 24 h.

survival molecules, including the protein kinase B pathway. Importantly, transfection of protein kinase B into HL60 cells and thus artificially increasing protein kinase B activity inhibited ROS-dependent cytotoxicity. We concluded that the remarkable cytotoxic effects of intracellular ROS generation are mediated by reduced protein kinase B-dependent survival signalling followed by apoptosis through the mitochondrial pathway.

Increased ROS production by NADPH oxidase upon macrophage activation is well

established. Earlier studies have shown that such ROS production upon immune stimulation of the phagocytic cells, apart from its bactericidal function, is also instrumental for the induction of pro-inflammatory gene transcription (12-14). Among the cellular responses to macrophage activation is also cell death, a response probably required to rid the body from cells damaged by the immune response. The data obtained in the present study may indicate that this apoptosis is a direct consequence of ROS production followed by reduced survival signalling and activation of mitochondrial pathway of cell death, is also important in the induction of apoptosis following macrophage activation. Final proof of this notion, however, awaits experiments in which activation-induced cell death is investigated in the presence and absence of glutathione and N-acetyl-L-cysteine.

The molecular mechanisms by which ROS participate in inflammatory gene expression are obscure at best. In the present study, we observed that ROS reduced the apparent activity of the NF- κ B pathway, as deduced from the decrease in expression of both the ratio between p65 expression and I- κ B as well as the reduced phosphorylation of I- κ B. As the NF- κ B pathway is a potent survival signal, this down regulation agrees well with the reduced survival signalling induced by ROS formation detected in this study. It is, however, more difficult to reconcile with the role of ROS generation in mediating inflammatory gene expression, as NF- κ B is in general a strong pro-inflammatory transcription factor. Importantly, however, a recent study by Blanchette et al. (25) indicated that the contribution of NF- κ B to macrophage activation-associated gene expression is minimal, hence our results are not necessarily at bay with the established role of ROS in the induction of inflammatory gene expression. Interestingly, increased JNK activity has recently come up as an

important mediator of inflammatory gene expression in inflammatory bowel disease in vivo (26). Hence, the ROS-induced activation of JNK may function in the induction of inflammatory gene expression.

ROS levels are increased in cells exposed to various stress agents, including anticancer drugs. Although increased ROS levels are generally associated with cytotoxicity, the molecular details remain obscure. Evidently, however, better knowledge as to these mechanisms may be instrumental for devising enhanced therapy. We observed that the tetrahydroxyquinone-induced ROS production coincides with HL60 cells apoptosis through the mitochondrial pathway as well as with reduced activity of the anti-apoptotic protein kinase B and NF- κ B pathways, concomitantly with specific activation of Jun-N-terminal kinase and protein phosphatases. Thus these data help understanding ROS-induced cytotoxicity.

REFERENCES

1. Allen RG, Tresini M (2000). Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic. Biol. Med.* **28**, 463-499
2. Daou GB, Srivastava AK (2004). Reactive oxygen species mediate endothelin-1-induced activation of ERK1/2, PKB and Pyk2 signalling, as well as protein synthesis, in vascular smooth muscle cells. *Free Radic. Biol. Med.* **37**, 208-215
3. Shen HM, Lin Y, Choksi S, Tran J, Jin T, Chang L, Karin M, Zhang J, Liu ZG (2004). Essential roles of receptor-interacting protein and TRAF2 in oxidative stress-induced cell death. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 5914-5922
4. Jang BC, Paik JH, Jeong HY, Oh HJ, Park JW, Kwon TK, Song DK, Park JG, Kim SP, Bae JH, Mun KC, Suh MH, Yoshida M, Suh SI (2004). Leptomycin B-induced apoptosis is mediated through caspase activation and down-regulation of Mcl-1 and XIAP

- expression, but not through the generation of ROS in U937 leukemia cells. *Biochem. Pharmacol.* **68**, 263-274
5. Murray J, Walmsley SR, Mecklenburgh KI, Cowburn AS, White JF, Rossi AG, Chilvers ER (2003). Hypoxic regulation of neutrophil apoptosis role: of reactive oxygen intermediates in constitutive and tumor necrosis factor alpha-induced cell death. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1010**, 417-425
 6. Ryter SW, Tyrrell RM (1998). Singlet molecular oxygen ($^1\text{O}_2$): a possible effector of eukaryotic gene expression. *Free Radic. Biol. Med.* **24**, 1520-1534
 7. Wiemels J, Wiencke JK, Varykoni A, Smith MT (1999). Modulation of the toxicity and macromolecular binding of benzene metabolites by NAD(P)H: Quinone oxidoreductase in transfected HL-60 cells. *Chem. Res. Toxicol.* **12**, 467-475
 8. Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ (2003). Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J. Biol. Chem.* **278**, 36027-36031
 9. Tudor G, Gutierrez P, Aguilera-Gutierrez A, Sausville EA (2003). Cytotoxicity and apoptosis of benzoquinones: redox cycling, cytochrome *c* release, and BAD protein expression. *Biochem. Pharmacol.* **65**, 1061-1075
 10. Anderson ME (1998). Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chem. Biol. Interact.* **111-112**, 1-14
 11. Mates JM, Sanchez-Jimenez FM (2000). Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **32**, 157-170
 12. Schoonbroodt S, Piette J. (2000). Oxidative stress interference with the nuclear factor-kappa B activation pathways. *Biochem. Pharmacol.* **60**, 1075-1083
 13. Victor VM, De la Fuente M (2002). N-Acetylcysteine improves *in vitro* the function of macrophages from mice with endotoxin-induced oxidative stress. *Free Radic. Res.* **36**, 33-45
 14. Ryan KA, Smith MF Jr, Sanders MK, Ernst PB (2004). Reactive oxygen and nitrogen species differentially regulate Toll-like receptor 4-mediated activation of NF-kappa B and interleukin-8 expression. *Infect. Immun.* **72**, 2123-2130
 15. Mosmann T, (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol. Methods* **65**, 55-63
 16. Denizot F, Lang R (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* **89**, 271-277
 17. Aoyama H, Melo PS, Granjeiro PA, Haun M and Ferreira CV (2000). Cytotoxicity of okadaic acid and kinetic characterization of protein tyrosine phosphatase activity in V79 fibroblasts. *Pharm. Pharmacol. Commun.* **6**, 331-334
 18. Hartree EF (1972). Determination of proteins: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* **48**, 422-427
 19. Torsoni MA, Viana RI, Ogo SH (1998). Sulphydryl groups and their relation to the antioxidant enzymes of chelonian red blood cells. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **46**, 147-156
 20. Zhu W-H, Majluf-Cruz A, Omburo GA (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**, 265-274
 21. Freire AG, Melo PS, Haun M, Dúran N, Aoyama H, Ferreira CV (2003). Cytotoxic effect of the diterpene lactone dehydrocrotonin from *Croton cajucara* on

- human promyelocytic leukemia cells. *Planta Medica* **69**, 67-69
22. Wang XN, Studzinski GP (2001). Inhibition of p38MAP kinase potentiates the JNK/SAPK pathway and AP-1 activity in monocytic but not in macrophage or granulocytic differentiation of HL60 cells. *J. Cell. Biochem.* **82**, 68-77
 23. Sthadeim TA, Kucera GL (2002). c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) is required for mitoxantrone and anisomycin-induced apoptosis in HL-60 cells. *Leuk. Res.* **26**, 55-65
 24. Chénais B, Andriollo M, Guiraud P, Belhoussine R, Jeannesson P (2000). Oxidative stress involvement in chemically induced differentiation of K562 cells. *Free Radical Biol. Med.* **28**, 18-27
 25. Blanchette J, Jaramillo M, Olivier M (2003). Signalling events involved in interferon-gamma-inducible macrophage nitric oxide generation. *Immunology* **108**, 513-522
 26. Hommes D, van den Blink B, Plasse T, Bartelsman J, Xu C, Macpherson B, Tytgat G, Peppelenbosch M, Van Deventer S (2002). Inhibition of stress-activated MAP kinases induces clinical improvement in moderate to severe Crohn's disease. *Gastroenterology* **122**, 7-14

4. *CAPÍTULO 2*

2º artigo (manuscrito na forma de "rapid communication" a ser submetido)

Kinome profiling for studying the effects of violacein in human leukaemia cells

Carmen Veríssima Ferreira^{1,7}, Sander H. Diks^{2,7}, Francesca Milano³,
Carina L. Bos³, Alexandre D. Martins Cavagis¹, Giselle Z. Justo¹, Nelson Durán^{4,5}
and Maikel P. Peppelenbosch^{2,6}

¹Departamento de Bioquímica
Universidade Estadual de Campinas
São Paulo, Brazil

²Department of Cell Biology
Faculty of Medicine
University of Groningen
A. Deusinglaan 1
NL-9713 AV Groningen, The Netherlands
Tel: 31-50-363 2522
Fax: 31-50-363 2512
E mail : M.Peppelenbosch@med.rug.nl

³Experimental Internal Medicine
Academic Medical Center
Amsterdam, The Netherlands

⁴Núcleo de Ciências Ambientais
Universidade de Mogi das Cruzes.
São Paulo, Brazil

⁵Biological Chemistry Laboratory
Instituto de Química
Universidade Estadual de Campinas
São Paulo, Brazil

⁶To whom correspondence should be addressed

⁷Contributed equally to this work

Among the major technical challenges in contemporary medical biology is finding the molecular targets for pharmacological compounds with clinically useful properties. Here we show that peptide arrays exhibiting 1176 different kinase consensus substrates unambiguously identify the MAP kinase pathway as a major target for violacein, the anti-leukemic purple-colored pigment produced by Amazon River *Chromobacterium violaceum*. Thus kinome profiling employing metabolic arrays is a promising tool for uncovering the molecular mode of drugs action.

Defining the molecular effects of compounds with clinically useful properties remains exceedingly challenging if no a priori assumptions are available as to the biochemical details of the biological effect observed. The massive parallel analysis using DNA array technology has become the mainstay for the study of genomes and transcriptomes, but it is difficult, if often not impossible, to relate the changes in gene expression to drug activity on specific metabolic pathways. Adaptation of array technology for measuring enzymatic activity in a parallel fashion seems an obvious solution and recently progress in this direction has been made with the preparation of protein chips for the assessment of protein substrate interactions (1–3) and the generation of peptide chips for the appraisal of ligand-receptor interactions and enzymatic activities (4–7). Houseman and Mrksich (8) showed that peptide chips, prepared by the Diels-Alder-mediated immobilization of one kinase substrate for the non-receptor tyrosine kinase (c-Src) on a monolayer of alkanethiolates on gold, allows quantitative evaluation of kinase activity. We recently showed that ^{33}P - γ -ATP phosphorylation of arrays consisting of 192 peptides (substrates for kinases) spotted on glass by cell lysates from human peripheral blood mononuclear cells allowed the simultaneous description of the temporal kinetics of a multitude of kinase activities following stimulation with lipopolysaccharide (9). It appeared, however, that the number of substrates used in this array was insufficient to allow comprehensive descriptions of the effects of pharmacological intervention on cellular signal transduction.

This consideration prompted us to study the effectiveness of an array with substantially increased numbers of substrates for obtaining complete descriptions of the effect of pharmacological intervention on the kinome. To this end we selected a set of substrates covering almost the entire mammalian kinome from the phosphobase resource (<http://phospho.elm.eu.org>) (10,11) (a full list of the peptides and the proteins from which they are derived is listed in the supplementary data) and arrays were constructed with chemically synthesizing soluble peptides, which were covalently coupled to glass substrates as described earlier. The arrays consisted of 1176 different nonapeptides, providing kinase substrate consensus sequences across the entire mammalian kinome. On each separate carrier, the array was spotted two times, to allow assessment of possible variability in substrate phosphorylation. The final physical dimensions of the array were 25 mm x 75 mm, each peptide spot having a diameter of approximately 250 μm , and peptide spots being 620 μm apart. Subsequently experiments were initiated to assess the usefulness of this approach for obtaining insight into the effect of pharmacological interventions on cellular signal transduction.

We decided to explore the effects of violacein, a purple-colored pigment cum antibiotic produced by Amazon River *Chromobacterium violaceum*, which attracts substantial interest as a consequence of its anti-leukemic properties. Recently we showed that violacein is a member of a novel class of cytotoxic drugs mediating apoptosis of HL60 cells (12). Employing the peptide array, the effect of violacein on HL60 cell kinome was tested.

For these experiments, 2.5×10^5 HL60 cells/ml were seeded and treated with violacein or vehicle (control) for 72 h. Violacein dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) was added to the culture medium in which the final DMSO concentration was 0.1% (v/v). The cells were lysed in 200 μl of cell lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM Na_2EDTA , 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM MgCl_2 , 1 mM β -glycerophosphate, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM NaF, 1 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin, 1 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin, 1 mM PMSF) and the volume of the

cell lysate was equalized with distilled H₂O. The cell lysates were subsequently cleared on a 0.22- μ m filter. Peptide array incubation mix was produced by adding 10 μ l of filter-cleared activation mix (50% glycerol, 50 μ M ³³P- γ -ATP (1000 kBq), 0.05% v/v Brij-35, 0.25 mg/ml bovine serum albumin). Next, the peptide array mix was added onto the chip, and the chip was kept at 37°C in a humidified stove for 90 min. Subsequently the peptide array was washed twice with TBST, twice in 2 M NaCl, and twice in demineralized H₂O and then air-dried. Subsequently, the chips were exposed to a phosphorimager plate for 72 h, and the density of the spots was measured and analyzed with ScanAlyze array imaging software (<http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>). A typical result is shown in figure 1a.

Subsequently, we compared the radioactivity incorporated in substrates phosphorylated by vehicle treated cells with the radioactivity incorporated in substrates phosphorylated by violacein-treated cells. The relationship between the two data-sets is roughly linear, suggesting that most cellular kinases are not directly influenced by the violacein treatment. Strikingly, however, the most upregulated substrate phosphorylation by violacein represented a MEK-specific peptide, whereas the next three most upregulated substrate phosphorylations events occurred in peptides specific for p42/p44 MAP kinase, the downstream effector of MEK. Phosphorylation of a peptide specific for the upstream activator of MEK, c-Raf was also highly upregulated by the violacein treatment. Activation of these kinases was confirmed by Western blotting and phosphospecific antibodies. Activation of the MAK kinases cascade by an anti-leukemic compound was surprising but this signaling pathway has been associated with leukemia cell differentiation and cell cycle arrest (13). Indeed both differentiation and cell cycle arrest were observed after violacein treatment (see supplementary data). Thus increased cell differentiation via MAP kinase activation may contribute to the anti-leukemic effects of this compound. Disregarding the exact anti-leukemic mechanism, however, we feel that this study shows that kinome profiling using metabolic arrays is a highly promising tool for the rapid evaluation of the effect of pharmacological interventions on signaling pathways.

References

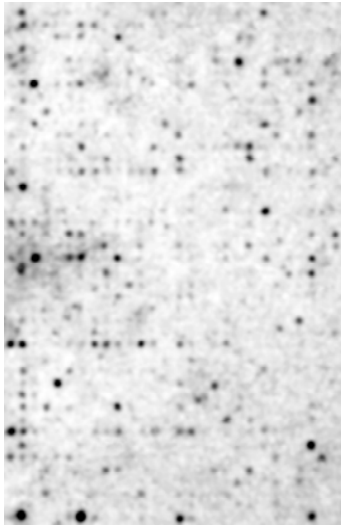
1. Lueking, A., Horn, M., Eickhoff, H., Bussow, K., Lehrach, H., and Walter, G. *Anal. Biochem.* **270**, 103–111 (1999).
2. Arenkov, P., Kukhtin, A., Gemmell, A., Voloshchuk, S., Chupeeva, V., and Mirzabekov, A. *Anal. Biochem.* **278**, 123–131 (2000).
3. MacBeath, G., and Schreiber, S. L. *Science* **289**, 1760–1763 (2000).
4. Zhu, H., and Snyder, M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**, 40–45 (2001).
5. Wenschuh, H., Volkmer-Engert, R., Schmidt, M., Schulz, M., Schneider-Mergener, J., and Reineke, U. *Biopolymers* **55**, 188–206 (2000).
6. Falsey, J. R., Renil, M., Park, S., Li, S., and Lam, K. S. *Bioconjugate Chem.* **12**, 346–353 (2001).
7. Reineke, U., Volkmer-Engert, R., and Schneider-Mergener, J. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**, 59–64 (2001).
8. Houseman, B. T., and Mrksich, M. *Trends Biotechnol.* **20**, 279–281 (2002).
9. Diks SH, Kok K, O'toole T, Hommes DW, van Dijken P, Joore J, Peppelenbosch MP. *J Biol Chem* **279**:49206-49213 (2004).
10. Blom, N., Kreegipuu, A., Brunak, S., Conway, T., and Schoolnik, G. K. *Nucleic Acids Res.* **26**, 382–386 (1998).
11. Kreegipuu, A., Blom, N., and Brunak, S. *Nucleic Acids Res.* **27**, 237–239 (1999).
12. Ferreira CV, Bos CL, Versteeg HH, Justo GZ, Duran N, Peppelenbosch MP. *Blood* **104**, 1459-1464 (2004).
13. Das D, Pintucci G, Stern A. *FEBS Lett.* **472**, 50-52 (2000).

Legend to figure

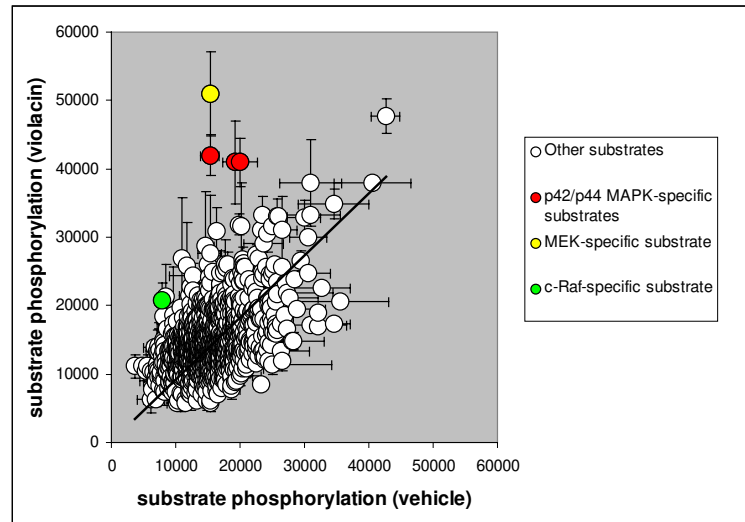
1. Peptide arrays reveal activation RAF/MEK/MAPK cascade by violacein.

1a. Example of peptide array substrate phosphorylation by lysates of cells treated with 1000 nM violacein. 1b. The relationship between radioactivity incorporated in substrates phosphorylated by vehicle-treated cells against the radioactivity incorporated in substrates phosphorylated by violacein-treated cells. Note the strong violacein-induced increase in phosphorylation of kinases of RAF/MEK/MAPK cascade. 1c. Activation of the MAP kinase cascade by violacein. Cells were treated with violacein (100 and 1000 nM) and the phosphorylation of kinases was evaluated by immunoblotting. Soluble lysates were matched for protein content and analyzed by western blotting.

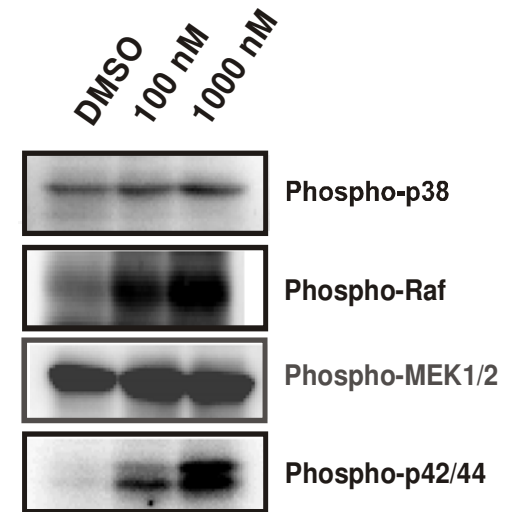
A



B



C



Supplementary data: Differentiation of HL60 cells by Violacein

Fig S1 - Violacein causes differentiation of HL60 cells

The cells were treated with violacein (100 and 1000 nM) or DMSO (1.2 %) for 72h. Cell differentiation was evaluated by flow cytometry using CD14-APC and CD66b-FITC markers.

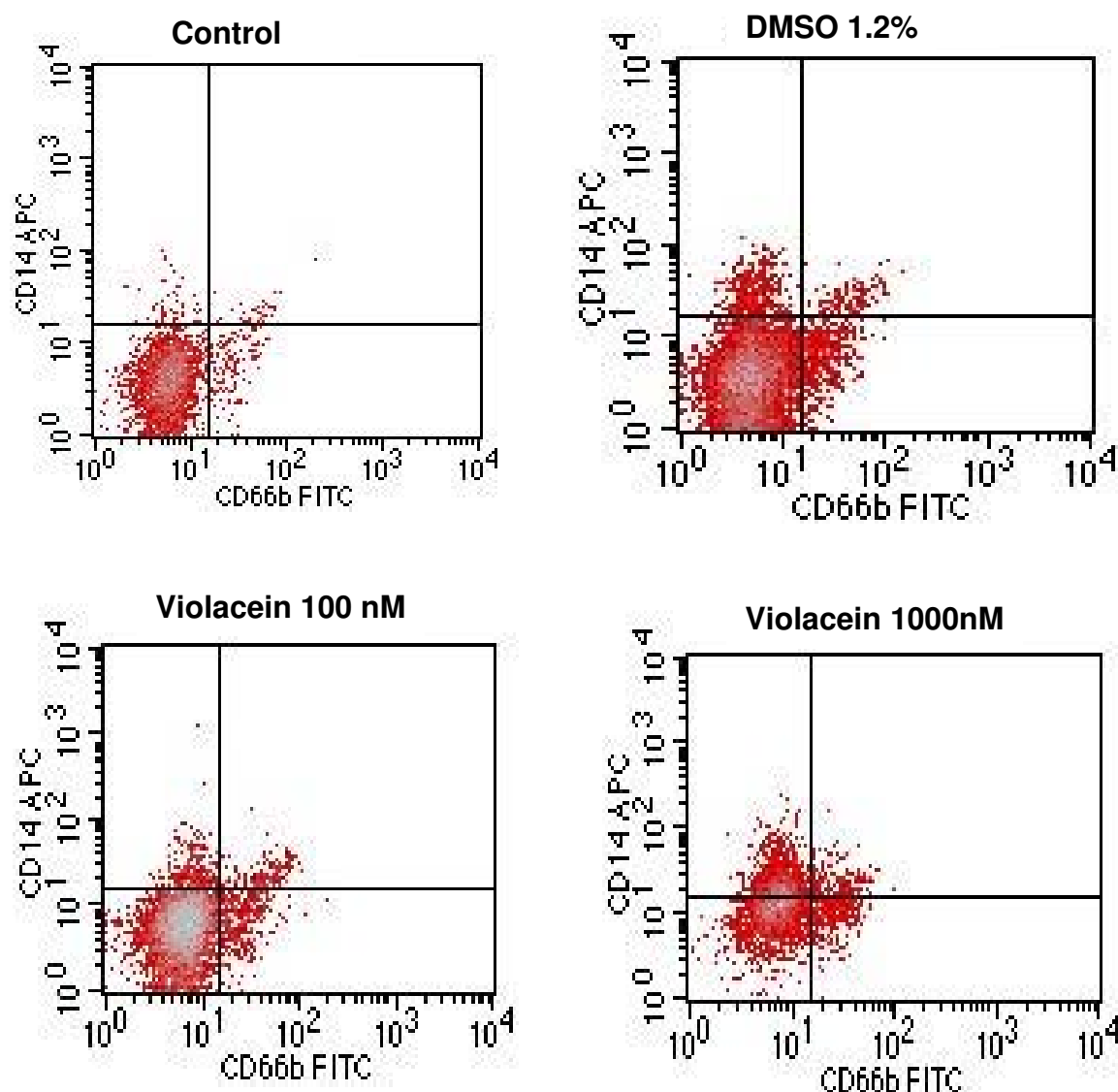
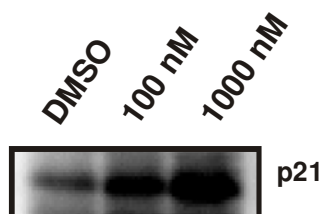


Fig S2 HL60 cell cycle arrest by violacein

The expression of p21 was evaluated by immunoblotting. Soluble lysates were matched for protein content and analyzed by Western blotting.



5. *CAPÍTULO 3*

Riboflavina: uma vitamina multifuncional

Ana Carolina Santos de Souza, Carmen Veríssima Ferreira, Marilena Bezerra Jucá e Hiroshi Aoyama*

Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, CP 6109, 13.083-970, Campinas, SP.

Alexandre D. Martins Cavagis e Maikel P. Peppelenbosch

Department of Cell Biology, University of Groningen, Antonius Deusinglaan 1, NL-9713 AV, Groningen, The Netherlands.

Abstract

Riboflavin, a component of the vitamin B₂ complex, plays important roles in biochemistry, especially in redox reactions, because of its ability to participate in both one- and two-electron transfers, as well as acting as photosensitizer. Low intakes of this vitamin have been associated with different diseases, including cancer and cardiovascular diseases. Riboflavin is thought to contribute to oxidative stress through its capacity to produce superoxide anions but, interestingly, it can also promote hydroperoxide reduction. This peculiar and multifunctional behavior allows riboflavin to participate in various biochemical pathways as nucleophile and electrophile, making it a versatile and important biological compound.

Keywords: riboflavin,; electron transfer; oxidative-stress.

**e-mail: aoyama@unicamp.br*

INTRODUÇÃO

A riboflavina foi isolada (apesar de não purificada) pela primeira vez em 1879 por um químico inglês de nome A. Wynter Blyth. Em seus estudos relacionados à composição do leite de vaca ele relatara a identificação de um pigmento amarelo brilhante que ele próprio chamou de “lactocromo” e que hoje nós conhecemos como sendo a riboflavina. Depois desse anúncio, quase cinquenta anos se passaram até que algum avanço significativo ocorresse com o recém descoberto pigmento amarelo-laranja. Então, ao final dos anos 20 e início da década de 30 do século XX, uma grande evolução científica aconteceu e pigmentos amarelos semelhantes

com um brilho esverdeado fluorescente foram isolados de uma ampla variedade de fontes¹. O interesse por eles tornou-se ainda maior quando o tal pigmento amarelo foi reconhecido como sendo um constituinte da vitamina do complexo B, sendo a purificação da própria vitamina amplamente facilitada uma vez que percebeu-se que o potencial vitamínico estava intimamente correlacionado à fluorescência da riboflavina. Alguns dos principais químicos da época como Richard Kuhn, em Heidelberg, e Paul Karrer, em Zurich, entraram em uma acirrada corrida para determinar a estrutura bem como para prová-la através de síntese química, sendo que ambos obtiveram sucesso neste intento quase

que concomitantemente. Vários nomes foram propostos para o então caracterizado composto, tais como lactoflavina e ovoflavina a fim de estabelecer correlação com a fonte através da qual o composto havia sido isolado. Mas o prefixo ribo foi consagrado no nome pelo qual todos conhecemos o composto atualmente por causa da cadeia ribitol e da cor amarela característica proveniente do sistema π conjugado nos anéis isoaloxazina¹⁻³.

Riboflavina e suas funções biológicas

A riboflavina, 7,8-dimetil-10-ribitol-isoaloxazina, é uma vitamina hidrossolúvel pertencente ao complexo vitamínico B₂, apresenta coloração amarela e é fluorescente. Além do leite que, como mencionado, foi uma das primeiras fontes de obtenção, a riboflavina é encontrada também em carne, peixe e, principalmente, em vegetais de cor verde-escuro⁴. A riboflavina proveniente da dieta se encontra na forma das coenzimas flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN) ligadas a proteínas; no entanto, quando o bolo alimentar chega ao estômago, o meio ácido propicia a liberação das coenzimas. As coenzimas livres sofrem então a ação das pirofosfatases e fosfatases, presentes no intestino delgado, levando à liberação da riboflavina. Observamos em nosso laboratório que a riboflavina é um importante produto das reações catalisadas pelas fosfatases ácidas (proteína tirosina fosfatases) de baixa massa molecular relativa, purificadas de rim⁵ e pulmão⁶ bovinos, uma vez que a FMN é um potencial substrato fisiológico destas enzimas. Uma vez liberada, a riboflavina pode ser absorvida por transporte ativo ou facilitado^{6,7,8}.

A riboflavina é de fundamental importância em organismos aeróbios sendo precursora de importantes coenzimas participantes da cadeia

transportadora de elétrons como a FAD e FMN^{4,7,8}. Também origina muitas das flavinas que se encontram ligadas a diversas enzimas, as quais atuam na catálise de um grande número de importantes reações como, por exemplo, as relacionadas ao reparo do DNA. A fórmula estrutural da riboflavina é mostrada na Figura 1.

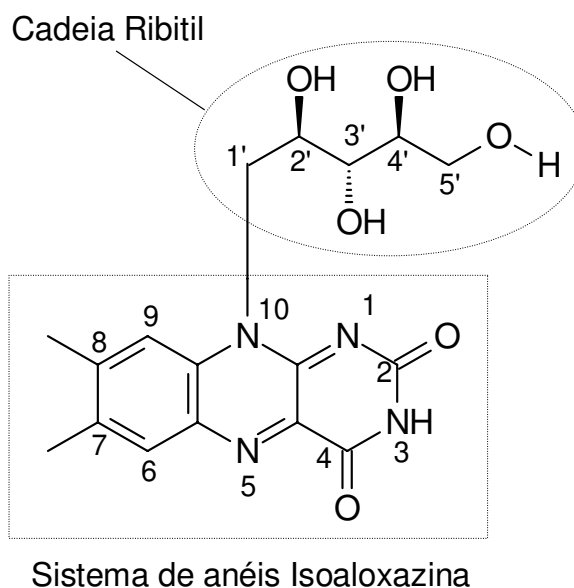


Figura 1. Estrutura da riboflavina (RF). Em destaque, a cadeia ribitol e o sistema de anéis isoaloxazina que apresenta o sistema π conjugado

O metabolismo de lipídios necessita de derivados da riboflavina, assim como a degradação de drogas e outros compostos químicos exógenos (xenobióticos) via sistema de hidroxilação microsomal. Cofatores de riboflavina são requeridos para o metabolismo do ácido fólico, piridoxina e niacina, além de serem utilizados por enzimas de eritrócitos como a glutatona redutase que se trata de uma enzima importante pertencente ao sistema de proteção contra as espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas nessas células⁹.

Curiosamente, a riboflavina pode tanto contribuir como inibir o estresse oxidativo através da sua dupla habilidade de produzir superóxido e, ao mesmo tempo, poder estar envolvida na redução de hidroperóxidos¹.

Por fim, recentes estudos têm correlacionado a riboflavina ao mecanismo de transdução de sinais de células apoptóticas, bem como à regulação do relógio biológico^{1, 10}.

Consequências da deficiência alimentar

Atualmente, a dose recomendada de ingestão de riboflavina varia desde 0,4 mg (na infância) a 1,3 mg/dia para adultos sendo que, para mulheres grávidas, recomenda-se uma dose suplementar de 0,3 mg/dia durante a gestação e 0,5 mg/dia durante o período de lactação, já que estudos mostram que durante o terceiro trimestre de gestação há uma queda progressiva nos níveis de riboflavina^{11,12}.

Como participa de diversas reações de óxido-redução importantes no metabolismo através dos cofatores FMN e FAD, os quais atuam como carregadores de elétrons, dietas inadequadas de riboflavina poderiam levar a distúrbios no metabolismo intermediário. Em ratos, a deficiência em riboflavina foi associada a uma redução tecido-específica na atividade da succinato oxidoredutase (succinato desidrogenase), efeito este que pode ter implicações na produção de energia através da fosforilação oxidativa. Além disto, a β -oxidação de ácidos graxos também é dependente de flavinas como aceptores de elétrons¹³.

Em animais, estudos demonstraram que a deficiência de riboflavina está relacionada a desenvolvimentos anormais no feto e, em humanos, vários estudos correlacionam a deficiência de riboflavina com quadros hematológicos, principalmente com aqueles relacionados ao sistema hematopoi-

ético. Atualmente, a influência hematológica da deficiência de riboflavina tem sido associada a sua interferência no metabolismo do ferro, já que a mobilização de ferro a partir da proteína intracelular ferritina trata-se de um processo redutivo e flavinas reduzidas podem agir reduzindo o ferro da ferritina e, desta maneira, mobilizá-lo em vários tecidos em concentrações fisiologicamente relevantes.

Sintomas de neurodegeneração e neuropatia têm sido documentados em vários estudos de dietas deficientes em riboflavina em diferentes espécies, apesar de haver pouca informação com relação à relevância desses resultados em humanos, mas sabe-se que a riboflavina apresenta uma função no metabolismo da tiroxina e sua carência poderia contribuir com a fisiopatologia de algumas doenças mentais¹⁴⁻¹⁶.

Pesquisas na área de saúde pública relatam a importância da riboflavina como fator de proteção contra doenças cardiovasculares e processos tumorais. Trabalhos interessantes publicados durante as décadas de 1970 e 1980 indicaram que ela poderia apresentar efeitos protetores contra danos teciduais gerados por oxidação. Devido a sua não toxicidade, a riboflavina é um forte candidato como agente redutor do ferro presente no grupo heme de proteínas, atuando como protetor de danos oxidativos em determinados tecidos. No entanto, o potencial terapêutico desta vitamina neste contexto deve ainda ser amplamente investigado, já que a maioria dos estudos até o presente momento foi realizada em modelos animais⁶.

Com relação à visão, sabe-se que a riboflavina é um componente normal das lentes do olho humano e que apresenta uma atividade fotossensibilizadora muito forte quando exposta à luz. Desta forma, radiações com comprimentos de onda abaixo de 400 nm levariam a uma excitação luminosa que

acarretaria, nessas circunstâncias, danos à visão. Vascularização e opacidade na córnea e até mesmo cataratas têm sido relatadas em animais alimentados com dietas pobres em riboflavina. Acredita-se que fotorreceptores dependentes de riboflavina (criptocromos) desempenham uma função importante na adaptação ao escuro e, portanto, a dieta de riboflavina poderia influenciar na adaptação ao escuro através desses fotorreceptores por interação com a vitamina A ou de forma independente^{17,18}.

Finalmente, a deficiência de riboflavina pode interferir no metabolismo de outros nutrientes, principalmente no metabolismo de outras vitaminas B, tais como, folato, cianocobalamina (vitamina B₁₂) e piridoxina (vitamina B₆)¹³.

Riboflavina e câncer

A deficiência de riboflavina tem sido correlacionada como um fator de risco para o câncer, embora este fato ainda não esteja satisfatoriamente estabelecido em humanos sendo que a influência de dietas deficientes em riboflavina na gênese e progressão do câncer tem sido assunto controverso no meio científico onde existem relatos provando, tanto sua ação estimulatória em certos casos, quanto inibitória em outros. Em geral, a deficiência de riboflavina parece estar relacionada à diminuição do desenvolvimento de tumores espontâneos em animais experimentais mas também, paradoxalmente, ao aumento da carcinogênese provocada por certos agentes⁶.

A correlação entre riboflavina e o câncer é bastante complexa e pode ser exemplificada nos inúmeros efeitos desta vitamina no metabolismo de drogas. Por ser precursora de flavocoenzimas do sistema microssomal de hidroxilação de drogas, a carência de riboflavina pode retardar a inativação de carcinógenos e, portanto, aumentar sua distribuição

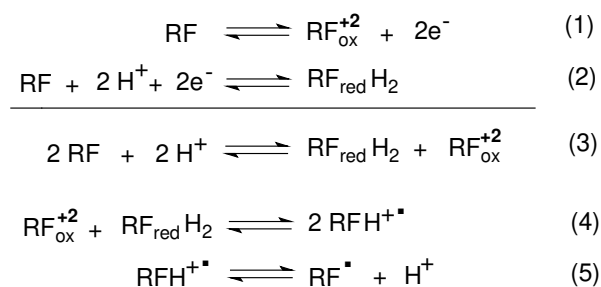
aos tecidos susceptíveis. Por outro lado, se a droga tiver menor atividade carcinogênica que seus metabólitos, a deficiência de riboflavina, possivelmente, terá efeito inibitório sobre a carcinogênese. Devemos lembrar também que o mesmo raciocínio pode ser aplicado em relação aos quimioterápicos em situações nas quais estes podem, não somente ter seu metabolismo afetado pela disponibilidade de cofatores derivados de riboflavina como também a sua própria disponibilidade e captação celular afetadas, visto que a riboflavina pode complexar-se com certas substâncias e, também, agir como fator regulatório de sua entrada na célula. Drogas antifolato também podem ter efeito influenciado pela disponibilidade de riboflavina uma vez que cofatores de flavina estão relacionados ao metabolismo do ácido fólico. Tem sido difícil, contudo, obter evidências que suportem ou refutem essas hipóteses e as pesquisas agora mudam seu foco para a obtenção de dados sobre a real disponibilidade de riboflavina nas células neoplásicas. Células neoplásicas parecem perder certos mecanismos que regulam o metabolismo de riboflavina em tecidos normais e caracterizam-se por resistir à deficiência de riboflavina, o que leva à manutenção de altas concentrações de FAD através de mecanismos ainda não determinados^{9,19,20}.

Durante a década de 1990, uma nova abordagem foi dada aos estudos no tratamento do câncer e, mais uma vez, a riboflavina assumiu um papel de destaque devido a sua característica peculiar de composto fotossensível. Além disso, demonstrou-se que a riboflavina pode apresentar importante função no transporte e liberação controlada de drogas. Este novo aspecto da utilização da riboflavina veio para ampliar e consolidar de maneira significativa a importância biológica e fisiológica deste composto²¹⁻²³.

Algumas propriedades químicas fundamentais da riboflavina

A riboflavina, bem como as flavinas em geral, apresenta uma característica muito importante para o seu papel biológico que é a capacidade de participar de reações químicas com transferência tanto de dois como também de um elétron, o que implica, neste último caso, a existência de estados de semiquinona¹.

Em soluções aquosas e na ausência de qualquer tipo de enzima, ocorre um equilíbrio entre a forma oxidada e a forma reduzida da riboflavina (auto-redox) sendo que, neste processo, uma certa quantidade de radical é formada:

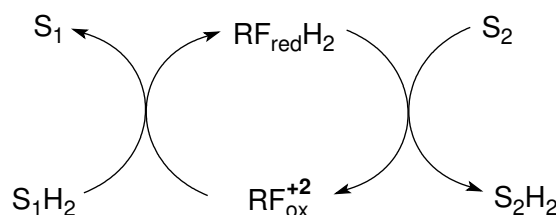


Esquema 1. Equilíbrios químicos da riboflavina semiquinona. RF = riboflavina; ox = oxidada; red = reduzida

Para maior clareza, apresentamos as semi-reações de oxidação (1) e redução (2) da riboflavina, sendo que a equação 3 corresponde ao processo global. Os equilíbrios 4 e 5, em soluções aquosas de riboflavina livre da presença de qualquer enzima, são quase que totalmente deslocados para a esquerda. Para se ter uma referência, partindo de uma mistura equimolar de riboflavina oxidada e reduzida, em pH 7,0, apenas 5 % de radical é estabilizado. Contudo, é importante ressaltar que a presença de enzimas torna possível uma ampla

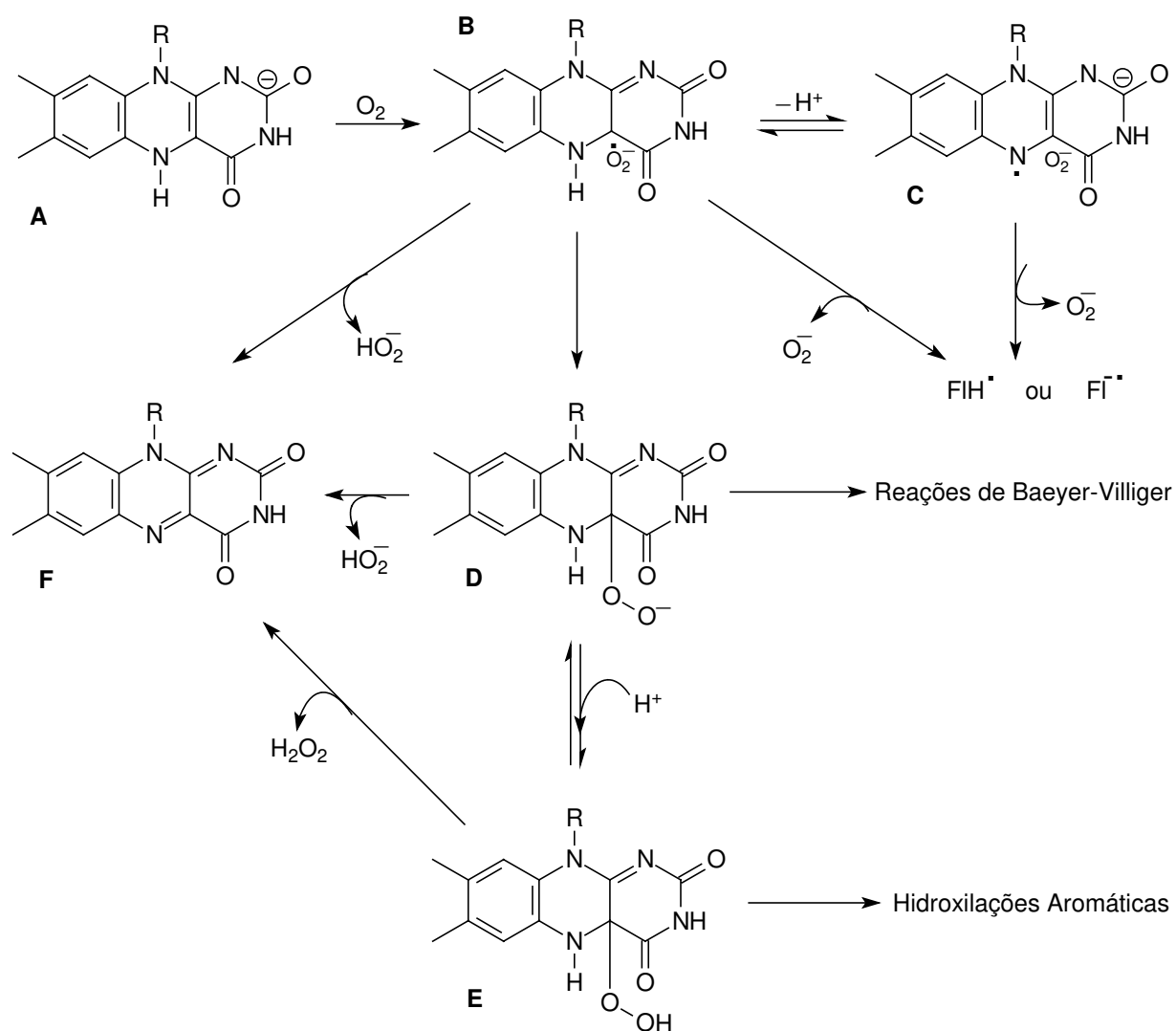
variedade de estados de oxidação para a riboflavina, uma vez que as energias de ativação de diversas reações redox envolvendo a riboflavina são significativamente reduzidas em sistemas enzimáticos. Essa versatilidade de estados de oxidação permite monitorar eventos que ocorrem em catálise utilizando a riboflavina como um marcador, já que suas reações sempre são caracterizadas por semi-reações que podem ser acompanhadas separadamente.

Na maior parte dos casos em que a riboflavina é reduzida, o processo pode ocorrer de duas maneiras distintas. A primeira maneira seria através da transferência de dois elétrons por um substrato (S_1) que é então desidrogenado, gerando uma flavina reduzida, a qual pode ser subsequentemente reoxidada, através de desidrogenação, por outro substrato (S_2), conforme ilustrado no Esquema 2.



Esquema 2. Semi-reações da riboflavina oxidada e reduzida. RF = riboflavina; red = reduzida; ox = oxidada

A segunda maneira é através de transferência de um único elétron, gerando um intermediário semiquinona. Em alguns casos, o oxigênio molecular é o substrato fisiológico mas, devido à reatividade inespecífica do O_2 com flavinas em geral, o estudo de algumas reações deve ser realizado em condições anaeróbicas¹.



Esquema 3. Reações entre riboflavina reduzida e oxigênio. R = cadeia ribitol

O Esquema 3, acima, mostra reações químicas que podem ocorrer entre riboflavina reduzida e oxigênio. A reação inicial é uma redução de O_2 que se dá através da transferência de um único elétron da flavina reduzida (A), gerando um par radicalar formado pela flavina neutra e ânion superóxido (B). O par radicalar gerado pode, então, seguir várias rotas alternativas como, por exemplo, levar à formação de uma peroxiriboflavina (D) que é um nucleófilo. Este intermediário pode, por sua

vez, ser protonado, gerando um hidroperóxido de características eletrofílicas (E). Além disso, as espécies peroxiconjugadas de riboflavina podem eliminar peróxido de hidrogênio e gerar a riboflavina oxidada (F) ou participar de processos oxidativos como hidroxilações aromáticas ou reações de Baeyer-Villiger que são oxidações de substratos que possuem grupamentos cetônicos e aldeídos para, respectivamente, ésteres e ácidos carboxílicos. Uma outra possibilidade é a dissociação do par radicalar

(B) gerando o radical de riboflavina e o radical superóxido, o qual pode reagir com peróxido para formar radical hidroxil ou com óxido nítrico para formar peroxinitrito. Acredita-se que o radical hidroxil seja um dos principais responsáveis por estresse oxidativo e danos teciduais, em grande parte através da reação com lipídios que levam à produção de hidroperoxilipídios. Além disso, trabalhos recentes têm sugerido que o peroxinitrito é um agente importante no processo de apoptose^{1,25}.

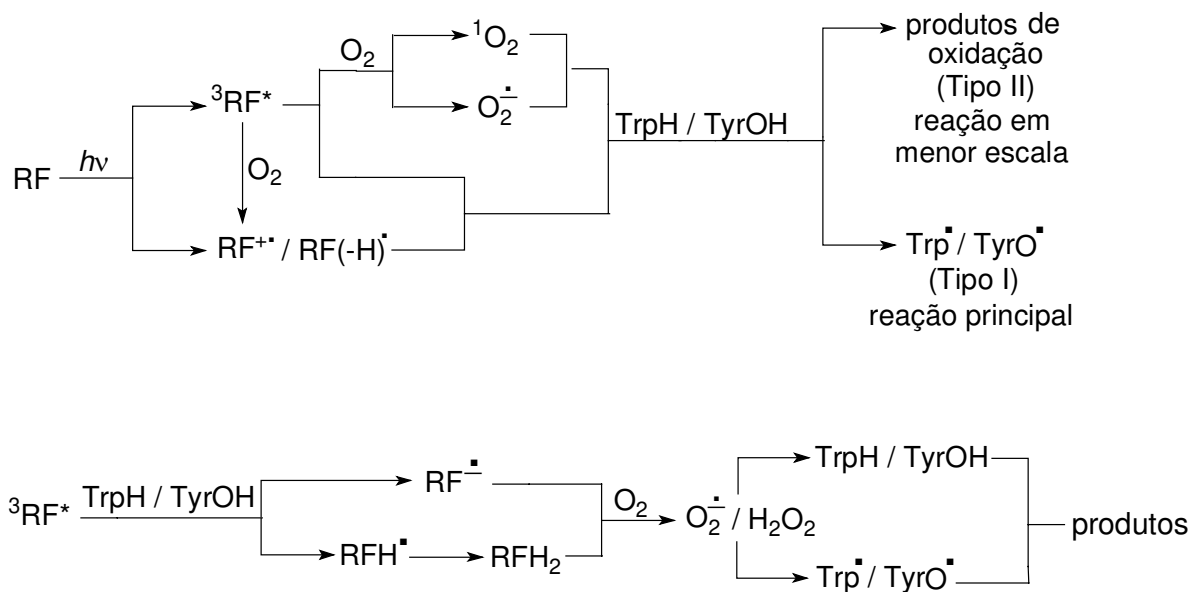
Riboflavina: Um fotossensibilizador biológico eficiente

Como já havíamos comentado, a riboflavina desempenha um importante papel biológico como sensibilizador fotoquímico. Apresenta, como característica, sensibilidade à radiação UV e visível^{26,27} sendo que, ao absorver luz, alcança o estado triplete excitado que pode tanto interagir com o oxigênio molecular gerando oxigênio singlete (chamado de mecanismo tipo II) ou agir diretamente sobre um substrato levando à fotoxidação deste e à consequente geração de radicais intermediários (mecanismo tipo I), além de espécies reativas de oxigênio tais como ânion superóxido, radical hidroxil e peróxido de hidrogênio^{20,28}. Essa capacidade pode ser útil ao organismo como no caso de enzimas que necessitam de luz visível para o desempenho de suas atividades catalíticas, tais como enzimas participantes do processo de fotossíntese e enzimas de reparo do DNA, DNA liases, cujos grupos prostéticos atuam como substratos para o triplete excitado de riboflavina²⁹.

A capacidade fotossensibilizadora da riboflavina em sistemas biológicos está relacionada ao

alto potencial redox de sua forma triplete ativada. Embora o potencial redox da riboflavina seja $-0,3V$, em pH 7,0³⁰, sua irradiação e ativação ao estado triplete eleva o potencial redox a $1,7V$ que é bem maior que o potencial redox de importantes biomoléculas como aminoácidos, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos que, desta forma, podem sofrer fotodegradação em presença de riboflavina^{31,32}. Desta maneira, após a excitação, a transferência de elétrons dos aminoácidos mencionados para formar os respectivos radicais e, conseqüentemente, gerar a riboflavina reduzida acaba sendo termodinamicamente favorecida.

A riboflavina irradiada reage com os aminoácidos triptofano (TrpH), tirosina (TyrOH) e, em menor extensão, com fenilalanina (PheH) – [neste texto, a fim de tornar mais claras as indicações em reações químicas, utilizaremos uma abreviatura para os aminoácidos diferente do padrão internacional de três ou uma letra]. Como resultado da fotoxidação dos aminoácidos mencionados, formam-se espécies reativas de oxigênio e outros fotoprodutos tóxicos para as células. Nas proteínas, resíduos de triptofano (TrpH) e tirosina (TyrOH) apresentam potenciais redox de $1,5V$ e $0,93V$, respectivamente, que os tornam substratos suscetíveis às reações de fotoxidação em presença de riboflavina irradiada^{33,34}. Durante essas reações, além da formação de fotoprodutos, como mencionado, também pode haver formação de fotoadutos entre a flavina excitada e seu substrato, como no caso da reação entre riboflavina e TrpH na qual se observa o aparecimento de fotoadutos indol-flavina e indol-indol, entre outros³⁵.



Esquema 4. Possíveis interações importantes para a fotossensibilização de triptofano e tirosina pela riboflavina atuando como fotossensibilizador

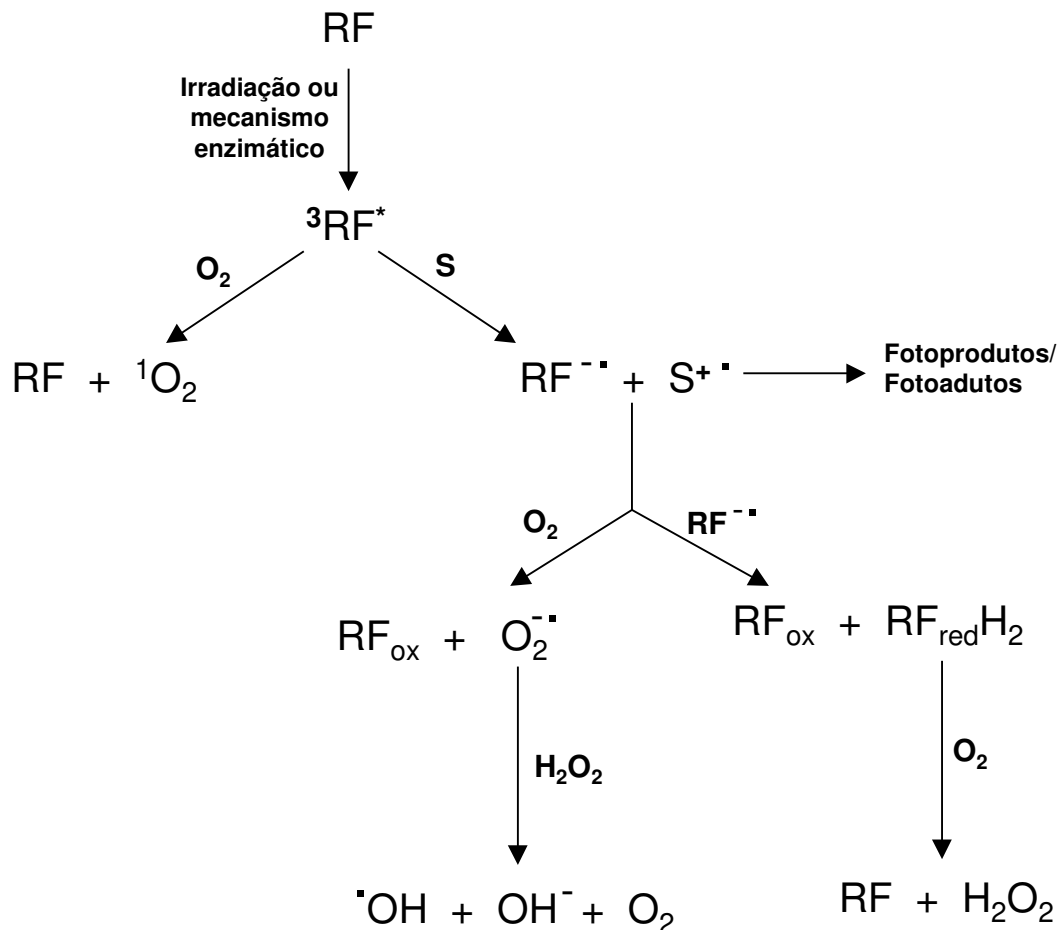
O Esquema 4 mostra possíveis reações importantes na fotossensibilização de triptofano e tirosina pela riboflavina:

A presença de TrpH e riboflavina tem sido correlacionada a disfunções hepáticas produzidas por nutrição parenteral³⁶ e os fotoprodutos da reação têm mostrado exercer efeitos letais em culturas de células animais^{35,37}.

Vários estudos têm revelado que a irradiação de células tumorais com luz visível em presença de riboflavina induz a morte celular. Quando células F9 de teratocarcinoma e NSO/2 murinas foram irradiadas em meio de cultura enriquecido com TrpH e riboflavina, alterações morfológicas similares às descritas para células apoptóticas foram observadas. O efeito citotóxico foi atribuído à formação de espécies reativas de oxigênio tais como ânion superóxido e oxigênio singlete, ge-

rados através de um mecanismo relativamente complexo (esquema 5), misto dos mecanismos tipo I e tipo II^{17,22}. Além da produção de ROS, também constatou-se a formação de outros fotoprodutos citotóxicos originados de reações envolvendo o radical ânion de riboflavina e radical cátion indol do TrpH. Tais fotoprodutos constituem-se, basicamente, de formas agregadas de riboflavina, produtos indólicos associadas a flavinas, produtos indólicos com peso molecular maior que o do TrpH, bem como outros produtos da fotodecomposição deste aminoácido²⁸.

Os efeitos da riboflavina irradiada em presença de TrpH também são observados em culturas de células não irradiadas as quais não sofrem os efeitos deletérios das espécies reativas de oxigênio transientes formadas durante a irradiação do meio. Tais efeitos são atribuídos aos demais fo-



Esquema 5. Misto de mecanismos tipo I e tipo II em presença de oxigênio molecular (S representa um composto alvo da riboflavina irradiada)

toprodutos gerados cujas citotoxicidades são ainda mais evidentes em experimentos realizados em atmosfera anaeróbica, em que predomina o mecanismo de reação tipo I^{22,38}. Fotoprodutos derivados do ácido 3-indolacético irradiado em presença de riboflavina demonstraram causar severos danos em cultura de células humanas HL60 e células tumorais murinas NOS/2³⁷. Tais efeitos foram mais acentuados que os anteriormente descritos para os fotoprodutos do triptofano, além de aumentarem de acordo com a elevação da concentração dos fotoprodutos²². Com base em estudos de microscopia eletrônica e análises de citometria de fluxo demons-

trou-se que tais fotoprodutos induzem morte celular por mecanismo apoptótico. Postula-se que o mecanismo de ativação apoptótica esteja relacionado à atuação dos fotoprodutos I₃A-RF como ligantes sinalizadores de morte agindo na superfície celular. Tal afirmação baseia-se no fato de que uma certa quantidade de riboflavina adicionada ao meio é incorporada pela célula, comportamento que, analogamente, também pode ser atribuído aos fotoprodutos.

Outro aspecto importante na atuação da riboflavina é sua capacidade de gerar efeitos citotóxicos mesmo quando não exposta à irradiação. O

estado excitado de flavina triplete também pode ser alcançado em ausência de luz por um mecanismo enzimático mediado por peroxidases³⁹, o que explica, a ocorrência de efeitos citotóxicos promovidos pela riboflavina não irradiada²².

Atualmente, a riboflavina e outras substâncias com capacidade fotossensibilizadora, têm sido alvos de estudos na área de tratamentos e prevenção de doenças com emprego de luz. Na área oncológica, destaca-se o estudo da chamada Terapia Fotodinâmica, uma forma de fotoquimioterapia onde uma substância fotossensibilizadora é acumulada em um tecido tumoral especificamente iluminado e, subseqüentemente, destruído²². Além disso, trabalhos recentes têm demonstrado, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, a iniciação de apoptose induzida por terapia fotodinâmica⁴⁰⁻⁴².

AGRADECIMENTOS

À FAPESP pelo suporte financeiro (Ana Carolina S. de Souza/ processo nº 2002/12539-7). Os autores são gratos ao Prof. Dr. José de Alencar Simoni, do Instituto de Química da Unicamp, pelas orientações durante a revisão final.

REFERÊNCIAS

1. Massey, V.; *Biochem. Soc. Trans.* **2000**, 28, 283.
2. Kuhn, R.; Reinemund, K. ; Weygand, F. ; *Ber.* **1934**, 67, 1460.
3. Karrer, P. ; Schopp, K. ; Benz, F. ; *Helv. Chim. Acta* **1935**, 18, 426.
4. Powers, J. H.; *Am. J. Nutr.* **2003**, 77, 1352.
5. Granjeiro, J. M.; Ferreira, C. V.; Jucá, M. B.; Taga, E. M.; Aoyama, H.; *Biochem. Mol. Biol. Int.* **1997**, 41, 1201.
6. Buzalaf, M. A. R.; Taga, E. M.; Granjeiro, J. M.; Ferreira C. V.; Lourenção, V. A.; Ortega, M. M.; Poletto, D. W.; Aoyama, H.; *Exp. Lung Res.* **1998**, 24, 269.
7. Edwards, A. M.; Bueno, C.; Saldaño, A.; Silva, E.; Kassab, K.; Polo, L.; Jori, G.; *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1999**, 48, 36.
8. Merrill, A. H.; Lambeth, J. D. ; Edmondson, D. E.; McCornick, D. B.; *Annu. Rev. Nutr.* **1981**, 1, 281.
9. Rivlin, R. S.; Shils, M. E.; Sherlock, P.; *Am. J. Med.* **1983**, 75, 843.
10. Souza, A. C. S., **2003**, *Tese de Doutorado em andamento, UNICAMP*.
11. World Health Organization. *WHO handbook on human nutritional requirements*. Monograph series 61. Geneva, WHO, **1974**.
12. EC Scientific Committee for Food Report. 31st series. *Nutrient and energy intakes for the European Community*. Luxembourg, Directorate-General, Industry, **1993**.
13. McCornick, D. B.; Innis, W. S. A.; Merrill, A. H. Jr; Browers-Komro, D. M.; Oka, M.; Chastain, J. L.; *An update on flavin metabolism in rats and humans*. In, Edmondson, D. E., McCornick, D. B., eds. *Flavin and flavoproteins*. New York, Walter de Gruyter, **1988**, 459-471.
14. Decker, K.; Dotis, B.; Glatzle, D.; Hinselmann, M; *Nutr. Metab.* **1977**, 21, 17.
15. Buzina, R.; Jusic, M.; Milanovic, N.; Sapurnar, J.; Brubacher, G.; *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **1979**, 49, 136.
16. Powers, H. J.; Bates, C. J.; Prentice, A. M.; Lamb, W. H.; Jepson, M.; Bowman, H.; *Hum. Nutr. Clin. Nutr.* **1983**, 37C, 413.

17. Mancini, M.; Edwards, A. M.; Becker, M. I.; De Ioannes, A.; Silva, E.; *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **2000**, *55*, 9.
18. Takami, Y., Gong, H. Q., Amemiya, T. *Ophthalmic Res.* **2004**, *36*, 156.
19. Rivlin, R. S.; *Cancer Res.* **1973**, *33*, 1977.
20. Edwards, A. M.; Silva, E.; *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **2001**, *63*, 126.
21. Holladay, S. R.; Yang, Z.; Kennedy, M. D.; Leamon, C. P.; Lee, R. J.; Jayamani, L. M.; Mason, T.; Low, P. S.; *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1426*, 195.
22. Edwards, A. M.; Silva, E.; Jofré, B.; Becker, M. I.; De Ioannes, A. E.; *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1994**, *24*, 179.
23. Silva, E.; Fürst, S.; Edwards, A. M.; Becker, M. I.; De Ioannes, A. E.; *Photochem. Photobiol.* **1995**, *62*, 1041.
24. Agarwal, M. L.; Clay, M. E.; Harvey, E. J.; Evans, H. H.; Antúnez, A. R.; Oleinick, N. L.; *Cancer. Res.* **1991**, *51*, 5993.
25. Wyllie, A. H.; Kerr, J. F. R.; Curie, A. R.; *Int. Rev. Cytol.* **1980**, *68*, 251.
26. La Rochette, A.; Silva, E.; Birlouez-Aragon, I.; Mancini, M.; Edwards, A. M.; Morlière, P.; *Photochem. Photobiol.* **2000**, *76*(6), 815.
27. Ahmad, I.; Fasihullah, Q.; Vaid, F. H. M. .; *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **2004**, *75*, 13.
28. Silva, E.; Ugarte, R.; Andrarde, A.; Edwards, A. M.; *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1994**, *23*, 43.
29. Sancar, G. B.; *Mutat. Res.* **2000**, *451*, 25
30. Meisel, D.; Neta, P.; *J. Phys. Chem.* **1975**, *79*, 2459.
31. Joshi, P. C.; *Toxicol. Lett.* **1985**, *26*, 211.
32. Suzuki, Y.; Miura, T.; Ogiso, T.; *Pharmacobiodynamics* **1982**, *5*, 568
33. Harriman, A.; *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 6102
34. Yoshimura, A.; Ohno, T.; *Photochem. Photobiol.* **1988**, *48*, 561.
35. Silva, E.; *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1992**, *14*(1-2), 142.
36. Vileisis, R. A.; Sorensen, K.; González-Crussi, F.; Hunt, C. E.; *J. Pediatr.* **1982**, *100*, 88.
37. Nixon, B. T.; Wang, R. J.; *Photochem. Photobiol.* **1977**, *26*, 589.
38. Edwards, A. M.; Barredo, F.; Silva, E.; De Ioannes, A. E.; Becker, M. I.; *Photochem. Photobiol.*, **1999**, *70* (4), 645.
39. Rojas, J.; Silva, E.; *Photochem. Photobiol.* **1988**, *47*, 467.
40. Zaidi, S. I. A.; Oleinick, N. L.; *Photochem. Photobiol.* **1993**, *58*, 771.
41. Luo, Y.; Chang, C. K.; Kessel, D.; *Photochem. Photobiol.* **1996**, *63*, 528.
42. He, X. Y.; Sikes, R. A.; Thomsen, S.; Chun, L. W. K.; Jacques, S. L.; *Photochem. Photobiol.* **1994**, *59*, 468.

6. *DISCUSSÃO GERAL*

Capítulo 1

Os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) aumentam em células expostas a vários agentes estressores, incluindo drogas antineoplásicas e, apesar de a produção de EROs ser geralmente associada com citotoxicidade, os mecanismos moleculares envolvendo a sinalização celular das EROs ainda são pouco entendidos. Evidentemente, a melhor compreensão dos mecanismos que envolvem a ação de EROs em células neoplásicas pode ser uma ferramenta importante no desenvolvimento de novas terapias.

Os dados obtidos neste trabalho contribuem no sentido de auxiliar o entendimento da sinalização induzida pela ação das EROs, já que estudos têm evidenciado que o estado redox de células de leucemia humana (HL60) pode influenciar diretamente a sua fisiologia o que poderia, em última análise, acarretar citotoxicidade ou diferenciação celular [156]. Neste trabalho, a sensibilidade das células HL60 à geração de EROs foi confirmada através da medida dos níveis celulares de glutathione e das próprias espécies reativas de oxigênio, após tratamento das células durante 24 horas com tetrahidroxiquinona (THQ).

O aumento nos níveis celulares de glutathione pode ser associado a uma resposta ao estresse oxidativo gerado pela produção de EROs, sendo que os níveis de glutathione aumentaram substancialmente, após o tratamento com THQ (Figura 1A). Em contrapartida, a produção de EROs estimulada pela THQ foi revertida pela adição de glutathione reduzida (GSH) e também de N-acetil-L-cisteína ao meio (Figura 1B). Portanto, o tratamento das células HL60 com THQ representa um sistema experimental apropriado a fim de se estudar as consequências da sinalização induzida pelas espécies reativas de oxigênio na transdução de sinal em células de leucemia humana HL60.

Tendo em vista esses resultados preliminares, decidiu-se investigar também os efeitos da formação de EROs na família de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), uma vez que essas enzimas constituem um dos principais determinantes da fisiologia das células de leucemia humana [157].

Nas células HL60, a cascata das ERKs (p42/p44 MAPKs) regula positivamente a diferenciação celular em monócitos e também é um instrumento para a

diferenciação dependente de forbol ésteres. Além disso, a inibição da JNK está relacionada com a diferenciação de células HL60 dependente de 1,25-di-hidróxi vitamina D₃. Em contrapartida, a ativação de JNK está associada a apoptose [158].

Durante o tratamento com THQ, observou-se uma forte ativação de JNK, enquanto que um pequeno aumento na fosforilação de p38-MAPK e também um pequeno efeito na ativação das ERKs foi constatado (Figura 2A). Desta forma, através dos nossos resultados, podemos perceber que as mudanças na ativação dos diferentes membros da família das MAPKs não são concordantes com indução de diferenciação, mas são consistentes com a indução de apoptose, tendo em vista relatos na literatura que associam a ativação da JNK à indução de apoptose em células HL60 [158,159].

Apesar da indução de estresse oxidativo pela THQ, também houve ativação de proteínas tirosina fosfatases (PTPs) e também de serina/treonina fosfatases, incluindo a PP2A. Essa ativação inesperada de fosfatases pode estar relacionada à resposta celular de produção (ou recuperação) de GSH, haja vista o sítio ativo das fosfatases apresentar grupamentos -SH essenciais à catálise enzimática, fato que poderia sugerir uma correlação entre o aumento nos níveis de GSH intracelulares e a proteção desses grupamentos (Figuras 2B e 3B), contribuindo desta forma para a manutenção da atividade fosfatase.

As observações de que a produção de EROs está ligada à ativação de JNK, associadas aos dados que indicam que a carência de GSH induz morte celular, são consistentes com os experimentos de viabilidade celular, após tratamento por 24 horas com THQ. Além disso, através das Figuras 3A e 3B, podemos constatar o comprometimento da função mitocondrial, bem como do metabolismo celular, através da redução do MTT. A confirmação de que esses efeitos são mediados por alterações no estado redox das células foram obtidos nos experimentos realizados em presença de glutathione 10 mM que demonstraram reversão na curva dose-resposta (Figura 3B), sendo que a redução na viabilidade celular é uma consequência direta de apoptose. Além disso, a incubação com THQ também ocasionou exposição de fosfatidilserina, bem como ativação de caspase-3 e fragmentação de DNA, conforme podemos observar nas Figuras 4A, B e C.

Os nossos resultados também demonstraram que o tratamento com THQ leva à liberação de citocromo c mitocondrial (Figura 5), confirmando que as EROs ativam a via apoptótica mitocondrial. Além disso, a fosforilação de BAD em Ser112 (que leva a sobrevivência celular por inibição da via mitocondrial) diminuiu simultaneamente. Concordando com esses resultados, o tratamento com THQ também levou à diminuição da fosforilação da proteína quinase B (PKB), mostrando que a sinalização via EROs também reduz a atividade dessa quinase essencial para a via de sobrevivência celular. A importância da mitocôndria para a indução de apoptose também foi confirmada através de um acréscimo em BAD, sendo que a fosforilação do BAD, seguida de sua ubiquitinação e proteólise, são mediadores dos efeitos da PKB na via mitocondrial. Os resultados também demonstraram a inibição de duas outras quinases envolvidas em sobrevivência celular: a Raf e a PKC delta, o que reforça as nossas hipóteses de que a THQ apresenta um efeito direto na via de sobrevivência celular (Figura 5). Além disso, a diminuição nos níveis de expressão de NF- κ B (p65), assim como o decréscimo nos níveis de I κ -B fosforilado são evidências adicionais que reforçam a inibição da via de sobrevivência celular induzida pela THQ (Figura 6).

A fim de dar um suporte independente para essa tese, foram feitos outros experimentos nos quais a atividade da PKB foi aumentada artificialmente através de transfecção com GAG-PKB, que se trata de uma forma constitutivamente ativa da PKB. Como podemos ver na Figura 7, as células transfectadas com PKB tornaram-se resistentes à THQ.

As espécies reativas de oxigênio desempenham um papel importante como mediadores regulatórios em processos de sinalização, especialmente em fagocitose. No entanto, os efeitos da produção de EROs nas cascatas de transdução de sinal das células HL60 ainda são pouco caracterizados. Essa constatação nos estimulou a investigar as consequências da geração de EROs mediada pela THQ nas células HL60 e, como podemos analisar, os resultados trouxeram importantes informações referentes ao mecanismo de morte celular.

A produção de EROs ocorre concomitantemente com a apoptose de células HL60, através da ativação da via mitocondrial e coincide também com a redução de várias moléculas envolvidas na via de sobrevivência celular, incluindo a via de proteína quinase B. Os experimentos de transfecção foram muito relevantes no sentido de confirmar a hipótese de que os efeitos citotóxicos da geração intra-celular de EROs são mediados pela diminuição da sinalização da via de sobrevivência celular envolvendo a PKB, seguida de apoptose via mitocondrial.

O aumento na produção de EROs pela NADPH oxidase em resposta à ativação de macrófagos é um mecanismo bem caracterizado. Além disso, estudos demonstraram que a produção de EROs sob estímulo imunológico de células fagocíticas, desconsiderando sua função bactericida, é também mediadora na indução de transcrição de genes pró-inflamatórios [160-162]. Entre as respostas à ativação de macrófagos está também a morte celular que é provavelmente requerida para livrar o corpo de células danificadas, através de resposta imune.

Os dados obtidos no presente estudo podem indicar que a apoptose é uma consequência direta da produção de EROs, seguida de uma redução na sinalização de sobrevivência e que a ativação da via mitocondrial é também importante na indução de apoptose seguida da ativação de macrófagos. No entanto, a confirmação dessa hipótese necessitaria de experimentos em que a morte celular induzida pela ativação de macrófagos fosse investigada na presença e na ausência de glutathione e N-acetil-L-cisteína.

Os mecanismos moleculares através dos quais as EROs participam na expressão gênica inflamatória são pouco elucidados. No presente estudo, observou-se que as EROS reduziram a atividade aparente de NF- κ B, conforme pudemos observar através do decréscimo na relação entre p65 e I- κ B. Como a via do NF- κ B é um potente sinal de sobrevivência, sua diminuição também é consistente com a hipótese de redução na via de sobrevivência induzida pelas EROs sugerida neste trabalho. No entanto, fica difícil de conciliar essa diminuição no NF- κ B com o papel das EROs como mediadores da expressão gênica pró-inflamatória, levando em conta que o NF- κ B é um forte fator de transcrição pró-inflamatório. É impor-

tante salientar, porém, que um estudo recente realizado por Blanchette e colaboradores [163] indica que a contribuição do NF- κ B para a expressão gênica associada à ativação de macrófagos é mínima, portanto, nossos resultados com relação ao NF- κ B não são necessariamente inconsistentes com o papel já estabelecido das EROs na indução da expressão de genes inflamatórios. Também é importante mencionar que o acréscimo na atividade de JNK recentemente demonstrou-se como um mediador importante da expressão gênica inflamatória na doença de bowel *in vivo* [164]. Desta forma, a ativação de JNK via EROs poderia estar relacionada à indução de expressão gênica inflamatória.

Capítulo 2

A determinação de alvos moleculares para compostos com propriedades farmacológicas potencialmente importantes é, sem dúvida alguma, um dos principais desafios técnicos da biologia molecular na atualidade.

A violaceína, 3-[1,2-di-hidro-5-(5-hidróxi-1H-indol-3-il)-2-oxo-3H-pirrol-3-ili-deno]-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona, é um pigmento isolado da *Chromobacterium violaceum* do rio Amazonas e tem sido estudada devido às suas múltiplas atividades biológicas tais como potencial efeito citotóxico e indução de apoptose em culturas de células normais [133] e em células da leucemia mielocítica humana HL60 [134]. Além disso, tem sido relatada a ação efetiva da violaceína contra uma série de linhagens celulares neoplásicas leucêmicas fato que leva a uma promissora perspectiva de aplicação clínica desse composto no tratamento do câncer [139]. Além disso, Ferreira et al. demonstraram recentemente que a violaceína é um membro de uma nova classe de drogas mediadoras de apoptose via receptor em células HL60 [150].

O trabalho apresentado neste manuscrito consistiu na análise do quinoma de células de leucemia humana HL60 a partir de um arranjo simultâneo de 1176 substratos com seqüências de consenso referentes a diferentes quinases, o que nos permitiu identificar, especificamente, que a via de sinalização das MAPKs corresponde ao principal alvo da violaceína.

A análise múltipla de substratos metabólicos empregada no quionoma é uma ferramenta promissora no intuito de elucidar, em nível molecular, o mecanismo de ação de um determinado fármaco, uma vez que a definição de mecanismos moleculares através dos quais se dá o efeito de determinado composto com propriedades clinicamente interessantes representa uma tarefa extremamente desafiadora, principalmente nos casos em que não se dispõe de um conjunto de dados suficientes para traçar suposições relacionadas às cascatas de sinalização em nível molecular.

A análise paralela em larga escala usando tecnologia de arranjo tem se consolidado na análise de DNA, por exemplo, como a principal ferramenta analítica no estudo dos genomas e transcriptomas. No entanto, relacionar eventuais alterações na expressão gênica à atividade de determinada droga em vias metabólicas específicas não é uma tarefa fácil. Através do trabalho apresentado neste capítulo, podemos verificar que a adaptação da tecnologia de arranjos a fim de medir atividade enzimática de forma múltipla e paralela parece ser uma solução viável visto que, recentemente, progressos nesse sentido têm sido alcançados com a preparação de 'chips' de proteínas com o objetivo de se avaliar as interações entre determinada proteína e seu substrato [165-167], para analisar as interações ligante-receptor e também atividades enzimáticas [168-170].

Diks et al. demonstraram recentemente que a fosforilação em ^{33}P - γ -ATP de um arranjo constituído de 192 peptídeos, fixados sobre lâmina de vidro e tratados com lisados celulares mononucleares de sangue periférico humano, permitiu a descrição simultânea da cinética temporal de uma gama considerável de quinasas, após estimulação celular com lipopolissacarídeos [171]. No entanto, a quantidade de substratos utilizados neste arranjo se mostrou insuficiente para permitir uma descrição abrangente dos efeitos da intervenção farmacológica na transdução de sinal celular. Neste trabalho com a violaceína, um arranjo com um número substancialmente maior de substratos foi montado a fim de obter descrições mais completas do efeito da intervenção farmacológica com violaceína no quionoma das células HL60. O conjunto de substratos analisado cobre quase que total-

mente o quinoma de células de mamíferos e, devido às propriedades interessantes já mencionadas da violaceína, decidiu-se aplicar a técnica a fim de avaliar mais precisamente as potencialidades desse composto.

Como podemos observar pela Figura 1a, que mostra a radioatividade incorporada em substratos fosforilados por células tratadas com veículo *versus* a radioatividade incorporada em substratos fosforilados pelas células tratadas com violaceína, a relação entre os dois conjuntos demonstra relativa linearidade, o que significa que a maioria das quinases celulares não são diretamente afetadas pelo tratamento com a violaceína. No entanto, podemos verificar que o substrato que apresenta a maior radioatividade incorporada corresponde ao peptídeo específico para a MEK, sendo que os três próximos peptídeos com maior radioatividade incorporada correspondem a seqüências de consenso de substratos específicos das ERKs (p42/p44 MAPK) que, como sabemos, são justamente os alvos da MEK.

A fosforilação pelas células tratadas com violaceína de um peptídeo específico para a c-Raf, que é a quinase "upstream" da MEK, também foi significativamente elevada, sendo a ativação dessas três quinases da via Raf-MEK-ERK também confirmada através de Western blotting.

A ativação da cascata das ERKs tem sido associada à diferenciação em células de leucemia e também à interrupção no ciclo celular [172]. De fato, tanto diferenciação como interrupção do ciclo celular foram confirmados para as células HL60 tratadas com a violaceína (dados suplementares). Assim, o aumento na taxa de diferenciação celular via ativação das ERKs pode contribuir para os efeitos anti-leucêmicos demonstrados pela violaceína. Além dessas informações, este estudo nos revelou que o quinoma empregando arranjos metabólicos é uma ferramenta bastante promissora para a avaliação rápida de intervenções farmacológicas em vias específicas de sinalização.

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho trazem conclusões bastante importantes com relação à utilização da linhagem de células HL60 como modelo de estudo para a ação diferenciada de drogas.

Nos estudos com a THQ, a produção de EROs ocorreu concomitantemente com a apoptose das células HL60 através de via mitocondrial e com redução na atividade de várias moléculas anti-apoptóticas da via de sobrevivência celular, inclusive da proteína quinase B (PKB). A transfecção das células HL60 com a PKB levou à diminuição da citotoxicidade dependente de EROs gerada pela THQ.

A análise múltipla de substratos metabólicos empregada no quinoma é uma ferramenta promissora no intuito de elucidar, em nível molecular, o mecanismo de ação de um determinado composto e permitiu identificar a via de sinalização das MAPKs como principal alvo da violaceína, um pigmento com propriedades antitumorais *in vitro* produzido pela *Chromobacterium violaceum* do rio Amazonas que induz diferenciação de células HL60 em monócitos e granulócitos.

Como perspectivas, podemos traçar a possibilidade de testes a fim de avaliar o efeito da THQ em outras linhagens de leucemia e também testar combinações com outros compostos com potencial quimioterápico. Além disso, pretendemos elaborar estudos com concentrações inferiores a 100 μ M e tempos de tratamento superiores a 24 h.

A realização de estudos com riboflavina irradiada também é uma das metas de continuidade dos nossos trabalhos com as células de leucemia mielocítica humana e também com outras linhagens leucêmicas.

Finalmente, tendo em vista os resultados promissores alcançados neste e em outros trabalhos com o emprego da violaceína como indutor de apoptose e diferenciação de células HL60, a principal perspectiva com relação à violaceína é o planejamento e realização de estudos preliminares em modelos *in vivo*, uma vez que o encapsulamento da droga em complexos de inclusão divulgado na literatura poderia solucionar a limitação de biodisponibilidade imposta pela baixa solubilidade desse composto em água.

8. *REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- [1] Kaufmann, S. H. , Hengartner, M. O. (2001) Programmed cell death: alive and well in the new millenium. *Trends Cell Biol.* **12**, 526-534.
- [2] Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H. , Currie, A. R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**, 239–257.
- [3] Wyllie, A. H., Kerr, J. F. R., Currie, A.R. (1981) Cell death: the signficance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* **68**, 251–305.
- [4] Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70.
- [5] Leist, M., Jaattela, M. (2001) Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 589–598.
- [6] Hengartner, M. O. (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**, 770–776.
- [7] Green, D. R. (2000) Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. *Cell* **102**, 1–4.
- [8] Ravagnan, L., Roumier, T., Kroemer, G. (2002) Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *J. Cell Physiol.* **192**, 131–137.
- [9] Wajant, H. (2002) The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* **296**, 1635–1636.
- [10] Martin, S. J. (2002) Destabilizing influences in apoptosis: sowing the seeds of IAP destruction. *Cell* **109**, 793–796.
- [11] Green, D. R. (1998) Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell* **94**, 695–698.
- [12] Stroh, C., Schulze-Osthoff, K. (1998) Death by a thousand cuts: an ever increasing list of caspase substrates. *Cell Death Differ.* **5**, 997–1000.
- [13] Wolf, B. B., Green, D.R. (1999) Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J. Biol. Chem.* **274**, 20049–20052.
- [14] Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B. A., Yuan, J. (2000) Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* **403**, 98–103.
- [15] Green, D. R., Reed, J. C. (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**, 1309–1312.
- [16] Grutter, M. G. (2000) Caspases: key players in programmed cell death. *Curr. Opinion Struct. Biol.* **10**, 649–655.

- [17] Li, H., Zhu, H., Xu, C. J., Yuan, J. (1998) Cleavage of BID by caspase-8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**, 491–501.
- [18] Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., Wang, X. (1998) Bid, a Bcl-2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* **94**, 481–490.
- [19] Israels, L. G., Israels, E. (1999) Apoptosis. *Stem Cells* **17**, 306-313.
- [20] Kroemer, G., Zamzami, N., Susin, S. A. (1997) Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol. Today* **18**, 44-51.
- [21] Collins, M. K., Rivas, A. L. (1993) The control of apoptosis in mammalian cells. *Trends Biochem. Sci.* **18**, 307-309.
- [22] Thomas, A., El Rouby, S., Reed, J. C. (1996) Drug-induced apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia: relationship between p53 gene mutation and bcl2/bax proteins in drug resistance. *Oncogene* **12**, 1055-1062.
- [23] Brantley-Finley, C., Lyle, C. S., Du, L., Goodwin, M. E., Hall, T., Szwedo, D., Kaushal, G. P., Chambers, T. C. (2003) The JNK, ERK and p53 pathways play distinct roles in apoptosis mediated by the antitumor agents vinblastine, doxorubicin, and etoposide. *Biochem. Pharmacol.* **66**, 459-469.
- [24] Jurgensmeier, J. M., Xie, Z., Deveraux, Q., Ellerby, L., Bredesen, D., Reed, J. C. (1998) Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 4997-5002.
- [25] Kasten, M. M., Giordano, A. (1998) pRb and the Cdks in apoptosis and the cell cycle. *Cell Death Differ.* **5**, 132-140.
- [26] Korsmeyer, S. J. (1992) Bcl-2: an antidote to programmed cell death. *Cancer Surv.* **15**, 105-118.
- [27] Wall, N. R., Mohammad, M., 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.
- [28] Kane, D. J., Ord, T., Anton, R., Bredesen, D. E. (1995) Expression of Bcl-2 inhibits necrotic neural cell death. *J. Neurosci. Res.* **40**, 269-275.

- [29] Blagosklonny, M., Alvarez, M., Fojo, A., Neckers, L. M. (1996) Bcl-2 protein downregulation is not required for differentiation of multidrug resistant HL60 leukemia cells. *Leuk. Res.* **20**, 101-107.
- [30] Liston, P., Fong, W. G., Korneluk, R. G. (2003) The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl-2. *Oncogene* **22**, 8568-8580.
- [31] Cory, S., Adams, J. M. (2002) The Bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer.* **2**, 647-656.
- [32] Assunção, G. C., Linden, R. (2004) Programmed cell death: apoptosis and alternative deathstyles. *Eur. J. Biochem.* **271**, 1638-1650.
- [33] Miyashita, T., Nagao, K., Krajewski, S., Salvesen, G. S., Reed, J. C., Inoue, T., Yamada, M. (1998) Investigation of glucocorticoid-induced apoptotic pathway: processing of caspase-6 but not caspase-3. *Cell Death Differ.* **5**, 1034–1041.
- [34] Troy, C. M., Rabacchi, A. S., Hohl, J. B., Angelastro, J. M., Greene, L. A., Shelanski, M. L. (2001) Death in the balance: alternative participation of the caspase-2 and caspase-9 pathways in neuronal death induced by nerve growth factor deprivation. *J. Neurosci.* **21**, 5077–5016.
- [35] Carmody, R. J., Cotter, T. G. (2000) Oxidative stress induces caspase-independent retinal apoptosis *in vitro*. *Cell Death Differ.* **7**, 282–291.
- [36] Abraham, M. C., Shaham, S. (2004) Death without caspases, caspases without death. *Trends Cell Biol.* **14**, 184-193.
- [37] Mateo, V., Lagneaux, L., Bron, D., Biron, G., Armant, M., Delespesse, G., Sarfati, M. (1999) CD47 ligation induces caspase-independent cell death in chronic lymphocytic leukemia. *Nat. Med.* **5**, 1277–1284.
- [38] Mathiasen, I. S., Lademann, U., Jaattela, M. (1999) Apoptosis induced by vitamin D compounds in breast cancer cells is inhibited by Bcl-2 but does not involve known caspases or p53. *Cancer Res.* **59**, 4848–4856.
- [39] Chi, S., Kitanaka, C., Noguchi, K., Mochizuki, T., Nagashima, Y., Shirouzu, M., Fujita, H., Yoshida, M., Chen, W., Asai, A., Himeno, M., Yokoyama, S., Kuchino, Y. (1999) Oncogenic Ras triggers cell suicide through the activation of a caspase independent cell death program in human cancer cells. *Oncogene* **18**, 2281–2290.

- [40] Los, M., Burek, C. J., Stroh, C., Bebedyk, K., Hug, H., Mackiewicz, A. (2003) Anticancer drugs of tomorrow: apoptotic pathways as target for drug design. *Drug Discov. T.* **8**, 67-77.
- [41] Johnstone, R. W., Ruefli, A. A., Lowe, S. W. (2002) Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* **108**, 153-164.
- [42] Cecconi, F., Gruss, P. (2001) Apaf1 in developmental apoptosis and cancer: how many way s to die? *Cell. Mol. Life Sci.* **58**, 1688–1697.
- [43] Rudin, C. M., Thompson, C. B. (1997) Apoptosis and disease: regulation and clinical relevance of programmed cell death. *Annu. Rev. Med.* **48**, 267-281.
- [44] Cross, T. G., Toellner, D. S., Henriquez, N. V., Deacon, E., Salmon, M., Lord, J. M. (2000) Serine/threonine protein kinases and apoptosis. *Exp. Cell Res.* **256**, 34-41.
- [45] Wada, T., Penninger, J. M. (2004) Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene* **23**, 2838-2849.
- [46] Krebs, E. G., Graves, J. D. (2000) Interactions between protein kinases and proteases in cellular signaling and regulation. *Adv. Enzyme Regul.* **40**, 441-470.
- [47] Schenk, P. W., Snaar-Jagalska, B. E. (1999) Signal perception and transduction: the role of protein kinases. *Biochim. Biophys. Acta* **1449**, 1-24.
- [48] Cano, E., Mahadevan, L. C. (1995) Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 117-122.
- [49] Bardwell, A. J., Abdollahi, M., Bardwell, L. (2003) Docking sites on mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinases, MAPK phosphatases and the Elk-1 transcription factor compete for MAPK binding and are crucial for enzymic activity. *Biochem. J.* **370**, 1077-1085.
- [50] Peppelenbosch, M. P., Versteeg, H. H. (2001) Cell biology of tissue factor, an unusual member of the cytokine receptor family. *Trends Cardiovasc Med.* **11**, 335-339.
- [51] Hommes, D. W., Peppelenbosch, M. P., van Deventer, S. J. (2003) Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets. *Gut.* **52**, 144-151.

- [52] Alberola-Ila, J., Forbush, K. A., Seger, R., Krebs, E. G., Perlmutter, R. M. (1995) Selective requirement for MAP kinase activation in thymocyte differentiation. *Nature* **373**, 620–623.
- [53] Davis, R. J. (2000) Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* **103**, 239–252.
- [54] Chang, L., Karin, M. (2001) Mammalian Map kinase signalling cascades. *Nature* **410** (6824), 37-40.
- [55] Johnson, G. L., Lapadat, R. (2002) Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK and p38 protein kinases. *Science* **298**, 1911-1912.
- [56] Abe, M. K., Saelzler, M. P., Espinosa III, R., Kahle, K. T., Hershenson, M. B., Le Beau, M. M., Rosner, M. R. (2002) ERK8, a new member of the mitogen-activated protein kinase family. *J. Biol. Chem.* **277**, 16733–16743.
- [57] Abe, M. K., Kuo, W. L., Hershenson, M. B., Rosner, M. R. (1999) Extracellular signal-regulated kinase 7 (ERK7), a novel ERK with a C-terminal domain that regulates its activity, its cellular localization, and cell growth. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 1301–1312.
- [58] Minden, A., Karin, M. (1997) Regulation and function of the JNK subgroup of MAP kinases. *Biochim. Biophys. Acta* **1333**, 85-104.
- [59] Berra, E., Milanini, J., Richard, D. E., Gall, M. L., Vinals, F., Gothié, E., Roux, D., Pagè, G., Pouyssegur, J. (2000) Signaling angiogenesis via p42/p44 MAP kinase and hypoxia. *Biochem. Pharmacol.* **60**, 1171-1178.
- [60] Feuerstein, G. Z., Young, P. R. (2000) Apoptosis in cardiac diseases: stress- and mitogen-activated signaling pathways. *Card. Res.* **45**, 560-569.
- [61] Barr, R. K., Bogoyevitch, M. A. (2001) The c-Jun N-terminal protein kinase family of mitogen-activated protein kinases (JNK MAPKs). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **33**, 1047-1063.
- [62] Kong, A. T., Yu, R., Hebbar, V., Chen, C., Owuor, E., Hu, R., Ee, R., Mandlekar, S. (2001) Signal transduction events elicited by cancer prevention compounds. *Mut. Res.* **480-481**, 231-241.
- [63] Dent, P., Yacoub, A., Fisher, P. B., Hagan, M. P., Grant S. (2003) MAPK pathways in radiation responses. *Oncogene* **22**, 5885–5896.

- [64] Cobb, M. H., Goldsmith, E. J. (1995) How MAP kinases are regulated. *J. Biol. Chem.* **270**, 14843-14846.
- [65] Lewis, T. S., Shapiro, P. S., Ahn, N. G. (1998) Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv. Cancer Res.* **74**, 49-139.
- [66] Treisman, R. (1996) Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr Opin Cell Biol* **8**, 205-215.
- [67] Garrington, T. P., Johnson, G. L. (1999) Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **11**, 211-218.
- [68] Cobb, M. H., Goldsmith, E. J. (2000) Dimerization in MAP-kinase signaling. *Trends Biol. Sci.* **25**, 7-9.
- [69] Lee, J. D., Ulevitch, R. J., Han, J. (1995) Primary structure of BMK1: a new mammalian map kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **213**, 715–724.
- [70] Zhou, G., Bao, Z. Q., Dixon, J. E. (1995) Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.* **270**, 12665–12669.
- [71] Marinissen, M. J., Chiariello, M., Pallante, M., Gutkind, J. S. (1999) A network of mitogen-activated protein kinases links G protein-coupled receptors to the c-Jun promoter: a role for c-Jun NH2-terminal kinase, p38s, and extracellular signal-regulated kinase 5. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 4289-4301.
- [72] Liu, L., Cavanaugh, J. E., Wang, Y., Sakagami, H., Mao, Z., Xia, Z. (2003) ERK5 activation of MEF2-mediated gene expression plays a critical role in BDNF-promoted survival of developing but not mature cortical neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 8532–8537.
- [73] Weldon, C. B., Scandurro, A. B., Rolfe, K. W., Clayton, J. L., Elliott, S., Butler, N. N., Melnik, L. I., Alam, J., McLachlan, J. A., Jaffe, B. M., Beckman, B. S., Burow, M. E. (2002) Identification of mitogen-activated protein kinase kinase as a chemoresistant pathway in MCF-7 cells by using gene expression microarray. *Surgery* **132**, 293–301.
- [74] Lee Jr, J. T., McCubrey, J. A. (2002) The Raf/MEK/ERK signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in leukemia. *Leukemia* **16**, 486-507.

- [75] Felberbaum-Corti, Gruenberg, J. (2002) Signaling from the far side. *Mol. Cell* **10**, 1259-1260.
- [76] McCormick, F. (1993) Signal transduction: how receptors turn Ras on. *Nature* **363**, 15-16.
- [77] Moodie, S. A., Wolfman, A. (1994) The 3Rs of life: Ras, Raf and growth regulation. *Trends Genet.* **10**, 44-48.
- [78] Versteeg, H. H., Hoedemaeker, I., Diks, S. H., Stam, J. C., Spaargaren, M., van Bergen En Henegouwen, P. M., van Deventer, S. J., Peppelenbosch, M. P. (2000) Factor VIIa/tissue factor-induced signaling via activation of Src-like kinases, phosphatidylinositol 3-kinase, and Rac. *J. Biol. Chem.* **275**, 28750-28756.
- [79] Anderson, N. G., Maller, J. L., Tonks, N. K., Sturgill, T. W. (1990) Requirement for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase. *Nature* **343**, 651-653.
- [80] Keyse, S. M. (1995) An emerging family of dual specificity MAP kinase phosphatases. *Biochim. Biophys. Acta* **1265**, 152-160.
- [81] Haneda, M., Sugimoto, T., Kikkawa, R. (1999) Mitogen-activated protein kinase phosphatase: a negative regulator of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Eur. J. Pharmacol.* **365**, 1-7.
- [82] Nebreda, A. R., Porras, A. (2000) p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 257-260.
- [83] Kyriakis, J. M., Banerjee, P., Nikolakaki, E., Dai, T., Rubie, E. A., Ahmad, M. F., Avruch, J., Woodgett, J. R. (1994) The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* **369**, 156-160.
- [84] Dreskin, S. C., Thomas, G. W., Dale, S. N., Heasley, L. E. (2001) Isoforms of Jun kinase are differentially expressed and activated in human monocyte/macrophage (THP-1) cells. *J. Immunol.* **166**, 5646-5653.
- [85] Ruvolo, P. P. (2001) Ceramide regulates cellular homeostasis via diverse stress signaling pathways. *Leukemia* **15**, 1153-1160.

- [86] Moriguchi, T., Toyoshima, F., Masuyama, N., Hanafusa, H., Gotoh, Y., Nishida, E. (1997) A novel SAPK/JNK kinase, MKK7, stimulated by TNFalpha and cellular stresses *EMBO J.* **16**, 7045-7053.
- [87] Woodgett, J. R., Avruch, J., Kyriakis, J. (1996) The stress activated protein kinase pathway. *Cancer Surv.* **27**, 127–138.
- [88] Kishimoto, H., Nakagawa, K., Watanabe, T., Kitagawa, D., Momose, H., Seo, J., Nishitai, G., Shimizu, N., Ohata, S., Tanemura, S., Asaka, S., Goto, T., Fukushi, H., Yoshida, H., Suzuki, A., Sasaki, T., Wada, T., Penninger, J. M., Nishina, H., Katada, T. (2003) Different properties of SEK1 and MKK7 in dual phosphorylation of stress-induced activated protein kinase SAPK/JNK in embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 16595–16601.
- [89] Westwick, J. K., Bielawska, A. E., Dbaibo, G., Hannun, Y. A., Brenner, D. A. (1995). Ceramide activates the stress-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* **270**, 22689–22692.
- [90] Chen, Y. R., Meyer, C. F., Tan, T. H. (1996) Persistent activation of c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) in gamma radiation-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **271**, 631–634.
- [91] Cuvillier, O., Pirianov, G., Kleuser, B., Vanek, P. G., Coso, O. A., Gutkind, S., Spiegel, S. (1996) Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature* **381**, 800–803.
- [92] Johnson, N. L., Gardner, A. M., Diener, K. M., Lange-Carter, C. A., Gleavy, J., Jarpe, M. B., Minden, A., Karin, M., Zon, L. I., Johnson, G. L. (1996) Signal transduction pathways regulated by mitogen-activated/extracellular response kinase kinase kinase induce cell death. *J. Biol. Chem.* **271**, 3229–3237.
- [93] Zanke, B. W., Boudreau, K., Rubie, E., Winnett, E., Tibbles, L. A., Zon, L., Kyriakis, J., Liu, F. F., Woodgett, J. R. (1996) The stress-activated protein kinase pathway mediates cell death following injury induced by cis-platinum, UV irradiation or heat. *Curr. Biol.* **6**, 606–613.
- [94] Ip, Y. T., Davis, R. J. (1998) Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK) - from inflammation to development. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 205-219.

- [95] Bost, F., McKay, R., Bost, M., Potapova, O., Dean, N. M., Mercola, D. (1999) The Jun kinase 2 isoform is preferentially required for epidermal growth factor-induced transformation of human A549 lung carcinoma cells. *Mol. Cell Biol.* **19**, 1938-1949.
- [96] Tournier, C., Hess, P., Yang, D. D., Xu, J., Turner, T. K., Nimnual, A., Barsagi, D., Jones, S. N., Flavell, R. A., Davis, R. J. (2000) Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* **288**, 870-874.
- [97] Enomoto, A., Suzuki, N., Liu, C., Kang, Y., Zhu, J., Serizawa, S., Matsumoto, Y., Morita, A., Ito, M., Hosoi, Y. (2001) Involvement of c-Jun NH₂-terminal kinase-1 in heat-induced apoptotic cell death of human monoblastic leukaemia U937 cells. *Int. J. Radiat. Biol.* **77**, 867-874.
- [98] Dunn, C., Wiltshire, C., MacLaren, A., Gillespie, D. A. F. (2002) Molecular mechanism and biological functions of c-Jun N-terminal kinase signalling via the c-Jun transcription factor. *Cell Signal.* **14**, 585-593.
- [99] Shaulian, E., Schreiber, M., Piu, F., Beeche, M., Wagner, E. F., Karin, M. (2000) The mammalian UV response: c-Jun induction is required for exit from p53-imposed growth arrest. *Cell* **103**, 897-907.
- [100] Van Den Brink, G. R., O'Toole, T., Hardwick, J. C., Van Den Boogaardt, D. E., Versteeg, H. H., Van Deventer, S. J., Peppelenbosch, M. P. (2000) Leptin signaling in human peripheral blood mononuclear cells, activation of p38 and p42/44 mitogen-activated protein (MAP) kinase and p70 S6 kinase. *Mol. Cell. Biol. Res. Commun.* **4**, 144-150.
- [101] Ichijo, H. (1999) From receptors to stress-activated MAP kinases. *Oncogene* **18**, 6087-6093.
- [102] Wang, X. Z., Ron, D. (1996) Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP kinase. *Science* **272**, 1347-1349.
- [103] Molnar, A., Theodoras, A. M., Zon, L. I., Kyriakis, J. M. (1997) Cdc42Hs, but not Rac1, inhibits serum-stimulated cell cycle progression at G1/S through a mechanism requiring p38/RK. *J. Biol. Chem.* **272**, 13229-13235.

- [104] Takenaka, K., Mcriguchi, T., Nishida, E. (1998) Activation of the protein kinase p38 in the spindle assembly checkpoint and mitotic arrest. *Science* **280**, 599-602.
- [105] English, J. M., Cobb, M. H. (2002) Pharmacological inhibitors of MAPK pathways. *Trends. Pharmacol. Sci.* **23**, 40–45.
- [106] Sebolt-Leopold, J. S. (2000) Development of anticancer drugs targeting the MAP kinase pathway. *Oncogene* **19**, 6594–6599.
- [107] Plataniias, L. C. (2003) Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. *Blood* **101**, 4667–4679.
- [108] Bos, J. L. (1989) Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* **49**, 4682–4689.
- [109] Robinson, D., He, F., Pretlow, T., Kung, H. J. (1996) A tyrosine kinase profile of prostate carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 5958–5962.
- [110] Rowinsky, E. K., Windle, J. J., Von Hoff, D. D. (1999) Ras protein farnesyltransferase: a strategic target for anticancer therapeutic development. *J. Clin. Oncol.* **17**, 3631–3652.
- [111] Hilger, R. A., Scheulen, M. E., Strumberg, D. (2002) The Ras-Raf-MEK-ERK pathway in the treatment of cancer. *Onkologie* **25**, 511–518.
- [112] Pearson, G., English, J. M., White, M. A., Cobb, M. H. (2001) ERK5 and ERK2 cooperate to regulate NF-kappaB and cell transformation. *J. Biol. Chem.* **276**, 7927–7931.
- [113] Mehta, P. B., Jenkins, B. L., McCarthy, L., Thilak, L., Robson, C. N., Neal, D. E., Leung, H. Y. (2003) MEK5 overexpression is associated with metastatic prostate cancer, and stimulates proliferation, MMP-9 expression and invasion. *Oncogene* **22**, 1381–1389.
- [114] Werlen, G., Hausmann, B., Naeher, D., Palmer, E. (2003) Signaling life and death in the thymus: timing is everything. *Science* **299**, 1859–1863.
- [115] Bulavin, D. V., Higashimoto, Y., Popoff, I. J., Gaarde, W. A., Basrur, V., Potapova, O., Appella, E., Fornace Jr, A. J. (2001) Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase. *Nature* **411**, 102–107.

- [116] Uzunoglu, S., Uslu, R., Tobu, M, Saydam, G., Terzioglu, E., Buyukkecece, 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.
- [117] Newburger, P. E., Chovoniec, M. E., Greenberger, J. S., Cohen, H. J. (1979) Functional changes in human leukemic cell line HL-60. *J. Cell Biol.* **82**, 315-332.
- [118] Breitman, T. R. (1990) Growth and differentiation of human myeloid leukemia cell line HL60. *Method. Enzymol.* **190**, 118-130.
- [119] Sokoloski, J. A., Sartorelli, A. C. (1997) Induction of differentiation of HL-60 promyelocytic leukemia cells by nonsteroidal anti-inflammatory agents in combination with low levels of vitamin D₃. *Leuk. Res.* **22**, 153-161.
- [120] Tyson, J. J. (1999) Models of cell cycle control in eukaryotes. *J. Biotechnol.* **71**, 239-244.
- [121] Buzzi, M., Lu, L., Lombardi, A. J., Posner, M. R., Brautigan, D. L., Fast, L. D., 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**, 4027-4035.
- [122] Uesugi, Y., Fuse, I., Toba, K., Kishi, K., Furukawa, T., Koike, T., Aizawa, Y. (1999) Involvement of SHP-1, a phosphotyrosine phosphatase, during myeloid cell differentiation in acute promyelocytic leukemia cell lines. *Eur. J. Haematol.* **62**, 239-245.
- [123] Wang, R. H, Liu, C. W. Y., Avramis, V. I., Berndt, N. (2001) Protein phosphatase 1alpha-mediated stimulation of apoptosis is associated with dephosphorylation of the retinoblastoma protein. *Oncogene* **20**, 6111-6122.
- [124] Friend, C., Scher, W., Holland, J. G., Sato, T. (1971) Hemoglobin synthesis in murine virus-inducedleukemic cells *in vitro*: stimulation of erythroid differentiation by dimethylsulfoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**, 378-382.
- [125] Lotan, R., Francis, G. E., Freeman, C. S., Waxman, S. (1990) Differentiation therapy. *Cancer Res.* **50**, 3453-3464.

- [126] Leszczyniecka, M., Roberts, T., Dent, P., Grant, S., Fisher, P. B. (2001) Differentiation therapy of human cancer: basic science and clinical applications. *Pharmacol. Ther.* **90**, 105-156.
- [127] Tsiftoglou, A. S., Pappas, I. S., Vizirianakis, I. S. (2003) Mechanisms involved in the induced differentiation of leukemia cells. *Pharmacol. Ther.* **100**, 257-290.
- [128] Rowley, J. D. (2001) Chromosome translocations, dangerous liaisons revisited. *Nat. Rev. Cancer* **1**, 245-250.
- [129] Biedler, J. R. (1994) Drug resistance: genotype versus phenotype. *Cancer Res.* **54**, 666-678.
- [130] Collins, S. J., Ruscetti, F. W., Gallagher, R. E., 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.
- [131] McCarthy, D. M., San Miguel, J. F., Freake, H. C., Green, P. M., Zola, H., Catovsky, D., Goldman, J. M. (1983) 1,25-dihydroxyvitamin D₃ 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.
- [132] Pan, Q., Granger, J., O'Connell, T., Somerman, M. J., Simpson, R., U. (1997) Promotion of HL60 cell differentiation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ regulation of protein kinase C levels and activity. *Biochem. Pharmacol.* **54**, 909-915.
- [133] Melo, P. S., Maria, S. S., Vidal, B. D., Haun, M., Durán, N. (2000) Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. *In vitro Cell. Develop. Biol. Animal.* **36**, 539-543.
- [134] Melo, P. S., Justo, G. Z., De Azevedo, M. B. M., Durán, N., Haun, M. (2003) Violacein and its β -cyclodextrin complexes induce apoptosis and differentiation in HL60 cells. *Toxicology* **186**, 217-225.
- [135] Caldas, L. R., Leitão, A. A. C., Santos, S. M., Tyrrel, R. M. (1978) Preliminary experiments on the photobiological properties of violacein. *Inter. Symp.*

Curr. Topics Radiol. Photobiol. **121**, Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, novembro.

- [136] Durán, N., Faljoni-Alario, A. (1980) Bacterial chemistry-I: studies of a potential phototherapeutic substance from *Chromobacterium violaceum*. *An. Acad. Bras. Ciências* **52**, 297-302.
- [137] Campos, V., Erazo, S., Durán, N. (1982) Novos fotoprodutos com atividade antimicrobiana de *Chromobacterium violaceum*. *Arq. Biol. Tecnol.* **25**, 147-151.
- [138] Durán, N., Erazo, S., Campos, V. (1983) Bacterial chemistry-II: antimicrobial photoproduct from pigment of *Chromobacterium violaceum*. *An. Acad. Bras. Ciências* **55**, 231-234.
- [139] Durán, N., Menck, C. F. M. (2001) *Chromobacterium violaceum*: a review of pharmacological and industrial perspectives. *Crit. Rev. Microbiol.* **27**, 201-222.
- [140] Durán, N., Haun, M. (1997) Processo de produção, obtenção, purificação e atividade antitumoral de 3-[1,2-dihidro-5-(5-hidróxi-1H-indol-3-il)-2-oxo-3H-pirrol-3-ilideno-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona. *Patente Brasileira* PI9702918.
- [141] Rettori, D., Durán, N. (1998) Production, extraction and purification of violacein: an antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*. *W. J. Microbiol. Biotechnol.* **14**, 685-688.
- [142] Bromberg, N., Durán, N. (2001) Violacein transformation by peroxidase and oxidases: implications on its biological properties. *J. Molec. Cat. B Enzym.* **11**, 463-467.
- [143] Lichstein, H. C., Van de Sand, V. F. (1945) Violacein, an antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*. *J. Infec. Dis.* **76**, 47-51.
- [144] Riveros, R., Haun, M., Campos, V., Durán, N. (1988) Bacterial chemistry-IV. Complete characterization of violacein: an antibiotic and trypanocide pigment from *Chromobacterium violaceum*. *Arq. Biol. Tecnol.* **31**, 475-487.
- [145] Durán, N., Campos, V., Riveros, R., Joyas, A., Pereira, M. F., Haun, M., (1989) Bacterial chemistry-III. Preliminary studies on trypanosomal activities

- of *Chromobacterium violaceum* products. *An. Acad. Bras. Ciências* **61**, 31-36.
- [146] Durán, N., Antônio, R. V., Haun, M., Pilli, R. A. (1994) Biosynthesis of a trypanocide of *Chromobacterium violaceum* products. *W. J. Microbiol. Biotechnol.* **10**, 686-689.
- [147] Durán, N., Justo, G. Z., Melo, P. S., De Azevedo, M. B. M., Souza-Brito, A. R. M., Almeida, A. B. A., Haun, M. (2003) Evaluation of the antiulcerogenic activity of violacein and its modulation by the inclusion complexation with β -cyclodextrin. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **81**, 387-396.
- [148] Leon, L. L., Miranda, C. C., de Souza, A. O., Durán, N. (2001) Antileishmanial activity of the violacein extracted from *Chromobacterium violaceum*. *J. Antimicrob. Chemother.* **48**, 449-450.
- [149] Saraiva, V. S., Marshall, J. C., Cools-Lartigue, J., Burnier Jr., M. N. (2004) Cytotoxic effects of violacein in human uveal melanoma cell lines. *Melanoma Res.* **14**, 421-424.
- [150] Ferreira, C. V., Bos, C. L., Versteeg, H. H., Justo, G. Z., Durán, N., Peppelenbosch, M. P. (2004) Molecular mechanism of violacein-mediated human leukemia cell death. *Blood* **104**, 1459-1464.
- [151] De Azevedo, M. B. M., Alderete, J., Rodriguez, J. A., Souza, A. O., Rettori, D., Torsoni, M. A., Faljoni-Alario, A., Haun, M., Durán, N. (2000) Biological activities of violacein, a new antitumoral indole derivative, in an inclusion complex with β -cyclodextrin. *J. Incl. Phen. Macr. Chem.* **37**, 93-101.
- [152] Allen, R.G., Tresini, M. (2000). Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic. Biol. Med.* **28**, 463-499.
- [153] O' Brien, P. J. (1991). Molecular mechanisms of quinones cytotoxicity. *Chem. Biol. Interactions.*, **80**, 1-41.
- [154] Nohl, H., Jordan, W., Youngman, R.J. (1986). Quinone in biology: functions in electron transfer and oxygen activation. *Adv. Free Rad. Biol. Med.* **2**, 211-279.
- [155] Souza-Pinto, N. C., Vercesi, A. E., Hoffman M. E. (1996). Mechanism of tetrahydroxy-1,4-quinone cytotoxicity: involvement of Ca^{+2} and H_2O_2 in the

- impairment of DNA replication and mitochondrial function. *Free Rad. Biol. Med.* **20**, 657-666.
- [156] Freire, A. G., Melo, P. S., Haun, M., Dúran, N., Aoyama, H., Ferreira, C. V. (2003) Cytotoxic effect of the diterpene lactone dehydrocrotonin from *Croton cajucara* on human promyelocytic leukemia cells. *Planta Medica* **69**, 67-69.
- [157] Wang, X. N., Studzinski, G. P. (2001) Inhibition of p38 MAP kinase potentiates the JNK/SAPK pathway and AP-1 activity in monocytic but not in macrophage or granulocytic differentiation of HL60 cells. *J. Cell. Biochem.* **82**, 68-77.
- [158] Sthadeim, T. A., Kucera, G. L. (2002) c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) is required for mitoxanthrone and anisomycin-induced apoptosis in HL-60 cells. *Leuk. Res.* **26**, 55-65.
- [159] Chénais, B., Andriollo, M., Guiraud, P., Belhoussine, R., Jeannesson, P. (2000) Oxidative stress involvement in chemically induced differentiation of K562 cells. *Free Rad. Biol. Med.* **28**, 18-27.
- [160] Schoonbroodt, S., Piette, J. (2000) Oxidative stress interference with the nuclear factor-kappa B activation pathways. *Biochem. Pharmacol.* **60**, 1075-1083.
- [161] Victor, V. M., De la Fuente, M. (2002) N-Acetylcysteine improves *in vitro* the function of macrophages from mice with endotoxin-induced oxidative stress. *Free Radic. Res.* **36**, 33-45.
- [162] Ryan, K. A., Smith, M. F. Jr., Sanders, M. K., Ernst, P. B. (2004) Reactive oxygen and nitrogen species differentially regulate Toll-like receptor 4-mediated activation of NF-kappa B and interleukin-8 expression. *Infect. Immun.* **72**, 2123-2130.
- [163] Blanchette, J., Jaramillo, M., Olivier, M. (2003) Signalling events involved in interferon-gamma-inducible macrophage nitric oxide generation. *Immunology* **108**, 513-522.
- [164] Hommes, D., van den Blink, B., Plasse, T., Bartelsman, J., Xu, C., Macpherson, B., Tytgat, G., Peppelenbosch, M., Van Deventer, S. (2002)

- Inhibition of stress-activated MAP kinases induces clinical improvement in moderate to severe Crohn's disease. *Gastroenterology* **122**, 7-14.
- [165] Lueking, A., Horn, M., Eickhoff, H., Bussow, K., Lehrach, H., Walter, G. (1999) Protein microarrays for gene expression and antibody screening. *Anal. Biochem.* **270**, 103–111.
- [166] Arenkov, P., Kukhtin, A., Gemmell, A., Voloshchuk, S., Chupeeva, V., Mirzabekov, A. (2000) Protein microchips: use for immunoassay and enzymatic reactions. *Anal. Biochem.* **278**, 123–131.
- [167] MacBeath, G., Schreiber, S. L. (2000) Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science* **289**, 1760–1763.
- [168] Zhu, H., Snyder, M. (2001) Protein arrays and microarrays. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**, 40–45.
- [169] Wenschuh, H., Volkmer-Engert, R., Schmidt, M., Schulz, M., Schneider-Mergener, J., Reineke, U. (2000) Coherent membrane supports for parallel microsynthesis and screening of bioactive peptides. *Biopolymers* **55**, 188–206.
- [170] Falsey, J. R., Renil, M., Park, S., Li, S., Lam, K. S. (2001) Peptide and small molecule microarray for high throughput cell adhesion and functional assays. *Bioconjugate Chem.* **12**, 346–353.
- [171] Diks, S. H., Kok, K., O'Toole, T., Hommes, D. W., van Dijken, P., Joore, J., Peppelenbosch, M. P. (2004) Kinome profiling for studying lipopolysaccharide signal transduction in human peripheral blood mononuclear cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 49206-49213.
- [172] Das, D., Pintucci, G., Stern, A. (2000) MAPK-dependent expression of p21(WAF) and p27(kip1) in PMA-induced differentiation of HL60 cells. *FEBS Lett.* **472**, 50-52.