

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



Márcio André Miranda

EFEITO DE FLAVONÓIDES SOBRE A
ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE FOSFATASES *IN*
VITRO E *IN VIVO*

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a):

MARCO ANDRE MIRANDA

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Hiroshi Aoyama

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

Orientador: Prof. Dr. Hiroshi Aoyama

2005

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

M672e

Miranda, Márcio André

Efeito de flavonóides sobre a atividade enzimática de fosfatases *in vitro* e *in vivo* / Márcio André Miranda. -- Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientador: Hiroshi Aoyama.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Fosfatases. 2. Flavonóides. 3. Proteína tirosina fosfatase. 4. Inibidores enzimáticos. I. Aoyama, Hiroshi. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Título em inglês: Effects *in vitro* and *in vivo* of flavonoids on phosphatases activities.

Palavras-chave em inglês: Phosphatases, Flavonoids, Protein tyrosine phosphatase, Enzyme inhibitors.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Doutor em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Hiroshi Aoyama, Ione Salgado, Pietro Ciancaglini, Celso Eduardo Benedetti, Giselle Zenker Justo.

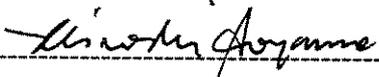
Data da defesa: 29/08/2005.

DATA DA DEFESA: 29/08/2005

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Hiroshi Aoyama (Orientador)

UNICAMP - Instituto de Biologia



Assinatura

Profa. Dra Ione Salgado

UNICAMP - Instituto de Biologia



Assinatura

Prof. Dr. Pietro Ciancaglini

USP - FFCL Ribeirão Preto



Assinatura

Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti

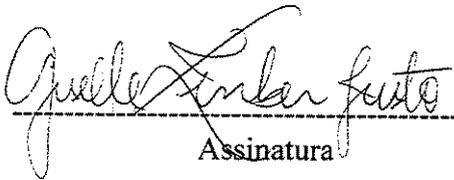
Laboratório Nacional de Luz Sincrotron



Assinatura

Profa. Dra. Giselle Zenker Justo

UNICAMP - FCM - Dep. Farmacologia



Assinatura

Profa. Dra. Fernanda Ramos Gadelha

UNICAMP - Instituto de Biologia

Assinatura

Prof. Dr. Ladaslav Sodek

UNICAMP - Instituto de Biologia

Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Marangoni

UNICAMP - Instituto de Biologia

000526883

“Aqui eu deixo meu agradecimento especial àquelas pessoas que sempre serão um marco de referência na minha vida. Hoje, eu não conseguiria imaginar sequer um breve momento de tempo sem ter compartilhado com elas tudo o que sou e o que serei. A vocês a minha eterna gratidão. Pai e mãe obrigado por ser seu filho. Rose, obrigado pelo companheirismo de toda a vida – eu a amo muito. Prof. Hiroshi, não apenas meu orientador, mas o maior exemplo de vida que tenho, vou seguir sempre os seus passos e conselhos – sou grato a cada momentos que passamos juntos. Viktor, o vitorioso, é o que seu pai deseja para você – maior presente que um ser humano pode receber de Deus. A todos estes nunca conseguirei recompensar o que me fizeram, por isso, o mínimo que posso dizer é que amo a todos.”

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Mauro Granjeiro pelo apoio e dedicação demonstrados todos esses anos.

A Profa Dra Carmen Veríssima Ferreira pela co-orientação e especial amizade.

Aos professores do Departamento de Bioquímica pelos auxílios prestados.

Às secretárias do Departamento de Bioquímica pela atenção e disponibilidade, em especial a Andréia por tudo que representou nos momentos mais difíceis.

Aos meus grandes amigos desde a graduação Alexandre e André.

Aos meus companheiros de laboratório em Campinas e Bauru e também amigos: Paulo, Erika, Thelma, Marilena e demais amigos do Departamento de Bioquímica (Leonardo, Zeca, nonô, Daniela Araújo e Daniela “japipa”).

A Roberta, Camila e Daniela pelos momentos de trabalho juntos e a oportunidade de aprender mais e melhor.

A minha irmã Elizabeth.

Aos meus sobrinhos Giovanna, Vinícius e Patrícia.

E a todos que direta ou indiretamente participaram para que este trabalho fosse realizado, o meu muito obrigado por tudo.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Flavonóides	1
1.1.1. Considerações Gerais	1
1.1.2. Absorção e Biodisponibilidade dos flavonóides	2
1.1.3. Papel Biológico dos Flavonóides	4
1.2. Fosfatases	7
1.2.1. Fosfatases Ácidas	7
1.2.2. Fosfatases Alcalinas	8
1.2.3. Proteínas Fosfatases	8
1.2.3.1. Proteínas Tirosina Fosfatases	9
1.2.3.2. Proteínas Serina/Treonina Fosfatases	12
1.3. Proteínas Quinases	14
1.3.1. Tipos de Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos (MAPKs)	15
1.3.2. Modulação das MAPKs	15
1.4. Modelos Experimentais Utilizados no Trabalho	16
1.4.1. In Vitro	16
1.4.1.1. Linfócitos Humanos	16
1.4.1.2. Linhagem Celular da Leucemia Mielóide Humana (HL60)	20
1.4.1.3. Fosfatases como Biomarcadores	21
1.4.1.4. Estudos de Citotoxicidade	22
1.4.2. Estudo <i>in Vivo</i> de Flavonóides	23
2. OBJETIVOS	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1. Materiais	26
3.2. Métodos	26
3.2.1. Purificação e Caracterização Cinética das Fosfatases de Linfócitos Humanos Normais	26
3.2.2. Estudos de Citotoxicidade com HL60 e Linfócitos humanos Normais	31
3.2.3. Efeito de Flavonóides, <i>in Vivo</i> , sobre a Atividade de Fosfatases	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1. Caracterização Cinética das Fosfatases de Linfócitos Humanos Normais e Purificação da Fosfatase de Membrana	37

4.1.1. Caracterização Cinética da Fosfatase Total de Linfócitos Humanos Normais	37
4.1.2. Caracterização Cinética da Fosfatase de Membrana de Linfócitos Humanos Normais	44
4.1.3. Purificação da CD45 de Membrana de Linfócitos	47
4.1.4. Efeito Dos Flavonóides na Atividade da Fosfatase	57
4.2. Estudos da citotoxicidade dos flavonóides sobre as células HL60 e Linfócitos normais	60
4.3. Efeitos <i>in vivo</i> de Flavonóides sobre a Atividade de Fosfatases	71
5. CONCLUSÕES	83
6. PERSPECTIVAS	86
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

ABREVIATURAS

AE – Atividade enzimática

Asp – Aspartato

BCR – Receptor de Antígeno em Células B

BMr – Baixa Massa molecular relativa

CEMIB – Centro de Bioterismo da UNICAMP

COBEA – Colégio brasileiro de experimentação animal

Cys – Cisteína

DAG – Diacilglicerol

DEAE – Cromatografia Líquida de Troca Aniônica

DRMs – Domínios de Membrana Celular

DTT – Ditioneitol

ECL – Método de revelação por quimiluminescência

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra acético

EF – Fator de Liberação

EGTA – Ácido glicol éter diamina tetra acético

ERK – Proteína Quinase ativada por sinal extracelular

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

FABMr – Fosfatase Ácida de Baixa Massa molecular Relativa

FAlc – Fosfatase Alcalina

FAT – Fosfatase Ácida Total

Glu – Glutamato

HL60 - Linhagem de células de Leucemia Promielocítica

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Performance

IL – Interleucinas

INF – Interferons

IP3 – Inositol-1,4,5,-trifosfato

JNK/SAPK – Proteína Quinase ativada por estresse

Kcat – Constante catalítica
Km - Constante de Michaelis-Menten
MAPKK – MAPK quinase
MAPKKK – MAPK quinase quinase
MAPKs – Proteínas Quinases ativadas por Mitógenos
Mr – Massa molecular relativa
MTT – [brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio)]
NFAT – Fator de Transcrição Nuclear de Células T ativadas
NOS - Óxido Nítrico Sintase
p38 – Subfamília de MAPK
pCMB – para-cloromercuribenzoato
pH – potencial Hidrogênio iônico
pHMB – para-hidroximercuribenzoato
PKC – Proteína Quinase C
pNP – para-Nitrofenol
pNPP – para-Nitrofenil fosfato
PPM - Subfamília de Serina/Treonina fosfatases
PPP – Subfamília de Serina/Treonina fosfatases
pRb – proteína Riboblastoma
PTK – Proteína Tirosina Quinase
PTPs – Proteínas Tirosina Fosfatases
Raf – Proteína quinase MAPKKK
RPMI – Meio de cultura para células (Roswell Park Memorial Institute)
SDS – Dodecilsulfato de sódio
Ser – Serina
Ser-P – Serina fosfato
TBS – Tampão salino Tris
TBST – Tampão salino Tris com Tween

TCR – Receptor de Antígeno em Células T

Thr – Treonina

Thr-P – Treonina Fosfato

TRAP – Fosfatase Ácida Tartarato Resistente

Tyr-P – Tirosina fosfato

UE – Unidade enzimática

Vmax – Velocidade máxima

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Representação esquemática das proteínas tirosinas fosfatases (PTPs). 10

Figura 2: Mecanismo catalítico das Proteínas Tirosina Fosfatases. 12

Figura 3: Via de ativação dos linfócitos T. 19

A via de ativação da proliferação linfocitária se inicia a partir da interação do antígeno com o TCR e conjuntamente recrutamento das proteínas de membrana CD45 e CD4, as quais indiretamente ativam duas vias de sinalização que tem participação da proteína ser/thr fosfatase(PP2B) e das MAPK(s) – (para detalhe das vias, vide texto).

Figura 4 - Efeito do pH na atividade das fosfatases de linfócitos. 39

A atividade foi determinada de acordo com Materiais e métodos 3.2.1.(f). Os tampões utilizados na concentração de 0,1M foram: Glicina (pH= 2,5), Citrato (pH= 3,0 e 3,5), Acetato de sódio (pH= 4,0, 4,5, 5,0, 5,2, 5,5 e 5,7), Bis-Tris (pH= 6,0), Tris-HCl (pH= 6,8 e 8,8) e Imidazol (pH= 7,4). Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD).

Figura 5 – Atividade das fosfatases de linfócitos sobre diferentes substratos. 40

Os substratos serina fosfato (Ser-P), treonina fosfato (Thr-P), e tirosina fosfato (Tyr-P) foram utilizados numa concentração final de 5mM. A atividade foi determinada como descrito em Métodos 3.2.1.(c), pelo fosfato inorgânico liberado. A atividade quando o p-NPP foi utilizado como substrato foi considerada como 100%. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD).

Figura 6 - Efeito de cátions e potenciais inibidores sobre a atividade das fosfatases de linfócitos. 41

Os cátions e inibidores foram adicionados diretamente no meio de reação concentrações de: Fluoreto= 10mM, Vanadato= 1mM, pCMB= 1mM, Fosfato inorgânico= 1mM, Mg^{++} = 10mM, Ca^{++} = 10mM, K^{+} = 10mM, Cu^{++} = 10mM, DTT= 100mM, β -Mercaptoetanol= 100mM, Tartarato= 1mM e Ácido Okadáiko= 11,9nM. A atividade da enzima foi determinada como descrito em Métodos 3.2.1.(d). A atividade na ausência de cátions e inibidores (controle) foi considerada como 100%. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD).

- Figura 7 – Estudo eletroforético das fosfatases de linfócitos.** 43
 As condições de corrida foram descritas em Métodos 3.2.1 (j, k, l). Foram aplicados 25µg de proteínas. Os géis A e C representam as proteínas totais e os géis B e D foram corados para atividade fosfatásica. O número 1 representa a lise celular com solução hipotônica e o número 2 por sonicação. As setas indicam a existência de atividade fosfatásica no gel de eletroforese.
- Figura 8: Efeito de potenciais inibidores sobre a atividade das fosfatases de membrana de linfócitos.** 46
 Os inibidores foram adicionados diretamente no meio de reação. As concentrações dos compostos foram de: 10mM de Mg⁺², Ca⁺², K⁺, Cu⁺², EDTA, DDT, Mercaptoetanol e Fluoreto; 1mM de Vanadato, Tartarato e Fosfato; 0,01mM de pCMB. A atividade foi determinada como descrita em Métodos 3.2.1.(d). A atividade na ausência de compostos foi considerada como 100%. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD).
- Figura 9: Cromatograma de troca Iônica (DEAE-Sepharose) da fração de membrana de linfócitos humanos.** 50
 O procedimento foi realizado conforme descrito em Métodos 3.2.1.(h). A linha em preto representa a quantidade de proteínas a 280nm e a linha em vermelho a atividade enzimática realizada conforme Métodos 3.2.1.(c).
- Figura 10: Eletroforese SDS-PAGE das frações que apresentaram atividade enzimática na eluição da cromatografia DEAE-Sepharose.** 51
 O procedimento foi realizado conforme descrito em Métodos 3.2.1.(m). HWM representa os marcadores de massa molecular padrão obtidos da Amersham Bioscience.
- Figura 11: Cromatograma de exclusão de massa molecular (Sephacryl-S200) das frações eluídas da DEAE-Sepharose.** 52
 O procedimento foi realizado conforme Métodos 3.2.1.(i). A linha em preto representa a quantidade de proteínas a 280nm e a linha em vermelho a atividade enzimática realizada conforme Métodos 3.2.1.(c). Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD).
- Figura 12 - Efeito de potenciais inibidores sobre a atividade da fosfatase de membrana de linfócitos utilizando pNPP como substrato** 53
 Os inibidores foram adicionados diretamente no meio de reação. A atividade foi determinada como descrita em Métodos 3.2.1.(d). A atividade na ausência de compostos foi considerada como 100%. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD).

Figura 13 - Efeito de potenciais inibidores sobre a atividade da fosfatase de membrana de linfócitos utilizando Tyr-P como substrato. 54

Os inibidores foram adicionados diretamente no meio de reação. A atividade foi determinada como descrita em Métodos 3.2.1.(d). A atividade na ausência de compostos foi considerada como 100%. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD).

Figura 14 – Determinação dos parâmetros cinéticos Km e Vmax para CD45 utilizando pNPP como substrato. 55

Os parâmetros cinéticos foram obtidos por ajuste de curva hiperbólica equilátera do programa ORIGIN 6.0[®]. Utilizou-se pNPP como substrato em diferentes concentrações conforme em Métodos 3.2.1.(e). A atividade na ausência de compostos foi considerada como 100%. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD).

Figura 15 – Determinação dos parâmetros cinéticos Km e Vmax para CD45 utilizando Tyr-P como substrato. 56

Os parâmetros cinéticos foram obtidos por ajuste de curva hiperbólica equilátera do programa ORIGIN 6.0[®]. Utilizou-se Tyr-P como substrato em diferentes concentrações conforme em Métodos 3.2.1.(e). A atividade na ausência de compostos foi considerada como 100%. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD).

Figura 16 – Efeito dos flavonóides sobre a Atividade da Fosfatase CD45 utilizando pNPP como substrato. 58

Os flavonóides foram adicionados diretamente no meio de reação. A atividade foi determinada como descrita em Métodos 3.2.1.(c). A atividade na ausência de compostos foi considerada como 100%. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD).

Figura 17 – Efeito da Concentração de Fisetina e Morina sobre a atividade Fosfatasica da CD45 utilizando pNPP como substrato. 59

A atividade enzimática foi determinada como descrito em métodos 3.2.1.(d), na ausência e em presença de diferentes concentrações de morina (●) e fisetina (■). Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD).

Figura 18 – Estudo da citotoxicidade dos flavonóides nas células HL60. 62

As barras mostram o efeito citotóxico provocado pelos flavonóides na concentração de 200 μ M nas células HL60. O controle foi obtido na ausência destes compostos e tomado como 100%. Todos os experimentos foram realizados em placa de Petri, e a contagem de células foi realizada utilizando-se o método de exclusão por Tripán Blue.

Figura 19 - Estudo da citotoxicidade de flavonóides em células HL60. 65

A viabilidade das células HL60 foi avaliada através dos seguintes parâmetros: dosagem da atividade fosfatásica (405 nm), quantificação de proteína (660 nm) e redução do MTT (570 nm). Ao controle, ausência de flavonóides, foi atribuído o valor 100%. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD).

Figura 20 - Estudo da citotoxicidade de flavonóides em cultura primária de linfócitos normais. 66

A viabilidade dos linfócitos foi avaliada através dos seguintes parâmetros: dosagem da atividade fosfatásica (405 nm), quantificação de proteína (660 nm) e redução do MTT (570 nm). Ao controle, ausência de flavonóides, foi atribuído o valor 100%. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD).

Figura 21 – Análise por Western Blot das Proteínas Quinases fosforiladas em cultura de HL60. 69

As células foram tratadas com diferentes concentrações de fisetina e em seguida preparadas para análise por Western Blot como descrito em Métodos 3.2.2 (g.4). A análise das bandas de proteínas foram realizadas por quimiluminescência (ECL) em membrana de PDVF, após incubação com os respectivos anticorpos primários e secundários.

Figura 22 – Análise por Western Blot das Proteínas Fosforiladas em Tirosina em cultura de HL60. 70

As células foram tratadas com diferentes concentrações de fisetina e em seguida preparadas para análise por Western Blot como descrito em Métodos 3.2.2 (g.4). A análise das bandas de proteínas foram realizadas por quimiluminescência (ECL) em membrana de PDVF, após incubação com os respectivos anticorpos primários e secundários.

Figura 23 - Efeito de flavonóides sobre o conteúdo total de proteínas *in vivo*. 75

O conteúdo total de proteínas foi determinado como descrito em métodos 3.2.2.(e). Nos camundongos do grupo controle foram aplicados o volume correspondente em óleo. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD). As diferenças significantes foram determinadas por Student's *t*-test (* $p < 0,05$).

Figura 24 - Efeito de Morina sobre a atividade fosfatásica do fígado. 76

A análise foi realizada como descrito em métodos 3.2.3.(d). Nos camundongos do grupo controle foram aplicados o volume correspondente em óleo. FAT significa fosfatase ácida total; TRAP, fosfatase ácida tartarato resistente; FAB, fosfatase ácida de baixa massa molecular relativa; e FAlc, fosfatase alcalina. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD). As diferenças significantes foram determinadas por Student's *t*-test.

Figura 25 - Efeito de Quercetina sobre a atividade fosfatásica do fígado. 77

A análise foi realizada como descrito em métodos 3.2.3.(d). Nos camundongos do grupo controle foram aplicados o volume correspondente em óleo. FAT significa fosfatase ácida total; TRAP, fosfatase ácida tartarato resistente; FAB, fosfatase ácida de baixa massa molecular relativa; e FAlc, fosfatase alcalina. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD). As diferenças significantes foram determinadas por Student's *t*-test (* $p < 0,05$).

Figura 26 - Efeito de Morina sobre a atividade fosfatásica do rim. 78

A análise foi realizada como descrito em métodos 3.2.3.(d). Nos camundongos do grupo controle foram aplicados o volume correspondente em óleo. FAT significa fosfatase ácida total; TRAP, fosfatase ácida tartarato resistente; FAB, fosfatase ácida de baixa massa molecular relativa; e FAlc, fosfatase alcalina. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD). As diferenças significantes foram determinadas por Student's *t*-test (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$).

Figura 27 - Efeito de quercetina sobre a atividade fosfatásica do rim. 79

A análise foi realizada como descrito em métodos 3.2.3.(d). Nos camundongos do grupo controle foram aplicados o volume correspondente em óleo. FAT significa fosfatase ácida total; TRAP, fosfatase ácida tartarato resistente; FAB, fosfatase ácida de baixa massa molecular relativa; e FAlc, fosfatase alcalina. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD). As diferenças significantes foram determinadas por Student's *t*-test (***) $p < 0,001$).

- Figura 28 - Efeito de Morina sobre a atividade fosfatásica do plasma.** 80
- A análise foi realizada como descrito em métodos 3.2.3.(d). Nos camundongos do grupo controle foram aplicados o volume correspondente em óleo. FAT significa fosfatase ácida total; FAB, fosfatase ácida de baixa massa molecular relativa; e FAlc, fosfatase alcalina. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD). As diferenças significantes foram determinadas por Student's *t*-test (* $p < 0,05$).
- Figura 29 - Efeito de Quercetina sobre a atividade fosfatásica do plasma.** 81
- A análise foi realizada como descrito em métodos 3.2.3.(d). Nos camundongos do grupo controle foram aplicados o volume correspondente em óleo. FAT significa fosfatase ácida total; FAB, fosfatase ácida de baixa massa molecular relativa; e FAlc, fosfatase alcalina. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD). As diferenças significantes foram determinadas por Student's *t*-test (** $p < 0,01$).
- Figura 30. A estrutura do flavonol quercetina.** 82
- A representação através desta figura mostra os grupos mais importantes para a atividade dos flavonóides sobre os sistemas enzimáticos. O mais importante destes grupos é o anel C de catecol dihidroxilado (circulado em amarelo). Outra parte importante inclui a presença da insaturação no anel B (circulado em verde) e a presença da função 4-oxo (circulado em laranja). As hidroxilas (circuladas em azul e amarelo escuro) possuem capacidade de formar pontes de hidrogênio com moléculas de água ou capacidade quelante principalmente de íons Cu^{+2} e Fe^{+} .

TABELAS

- Tabela 1: Classificação dos Flavonóides (Di Carlo et al., 1999).** 3
- Tabela 2: Proteínas Tirosina Fosfatases (PTPs) envolvidas na ativação de células T (Mustelin et al., 2004).** 17
- Tabela 3: Determinação dos Parâmetros cinéticos para a Proteína Tirosina Fosfatase CD45.**

RESUMO

Flavonóides são compostos polifenólicos amplamente consumidos na dieta humana, podendo chegar ao consumo diário de 1,0 grama. Uma variedade de efeitos biológicos *in vitro* e *in vivo* é descrita para os flavonóides tais como: inibição e alteração da expressão enzimática, antioxidantes e pró-oxidantes, síntese e reparo de DNA, indução a apoptose e anti-tumorais. Fosfatases são enzimas da classe das hidrolases que catalisam a desfosforilação de monoésteres fosfatos e são divididas em três grupos principais: proteínas fosfatases, fosfatases ácidas e fosfatases alcalinas. Juntamente com as proteínas quinases, as proteínas fosfatases são responsáveis pelo mecanismo de fosforilação/desfosforilação que controla os principais eventos celulares como crescimento, diferenciação e divisão celular.

Após a purificação, caracterização cinética e eletroforética da fosfoproteína tirosina fosfatase de membrana de linfócitos (CD45), verificou-se que está enzima era inibida por morina na concentração máxima de 400 μ M (30%) e ativada por fisetina na mesma concentração (30%), sendo estes efeitos dependentes da concentração dos flavonóides analisados.

Nos testes biológicos com a linhagem de células promielocíticas (HL60) pode-se verificar que, na concentração de 200 μ M, fisetina e morina foram capazes de promover 90% de morte celular, tendo sido determinados os valores de IC₅₀ para os parâmetros de viabilidade celular. Três parâmetros foram utilizados para estabelecer a viabilidade celular: atividade de fosfatase, redução de MTT e conteúdo proteico. Os resultados obtidos foram: 50 e 150 μ M para a atividade de fosfatase ácida total na presença de rutina e fisetina respectivamente; 45, 190 e 80 μ M para redução de MTT na presença de fisetina, morina e quercetina; e não foram obtidos valores correspondentes para o conteúdo total de proteínas. Já para cultura primária de linfócitos humanos, fisetina foi o único flavonóide que apresentou efeito tóxico e determinação do IC₅₀ para os três parâmetros de viabilidade celular sendo de 75 μ M (para conteúdo de proteína total), 100 μ M (para

atividade fosfatásica) e 200 μ M (para redução de MTT). Por outro lado, a quercetina, na concentração acima de 10 μ M, promoveu um aumento de 50% na quantidade de proteína total de linfócitos, sendo um indicativo de que possa estar induzindo a proliferação celular; no entanto, sem variar os outros parâmetros. Os resultados de Western blotting para fisetina em cultura de HL60, indicaram a capacidade deste flavonóide de promover a ativação da MAPK p38 e de inibir as MAPKs ERK e JNK, sendo que este efeito pode resultar em atividade antiproliferativa nestas células.

Os testes *in vivo* de quercetina e morina mostraram que estes flavonóides foram capazes de induzir o aumento de expressão de proteínas no fígado (17%). De maneira geral, a morina foi capaz de diminuir as atividades da fosfatase ácida total (FAT) e da fosfatase alcalina (FAlc) em 10 e 60% respectivamente, nos rins, e da FAT e fosfatase ácida de baixa massa molecular (FAB) em 45% e 40% respectivamente, no plasma. Já a quercetina apresentou a capacidade de aumentar a atividade fosfatásica em 15% para as FAB e FAlc no fígado, 15%, 18% e 75% respectivamente, para as FAlc, FAB e TRAP (fosfatase ácida resistente a tartarato), nos rins e 100% da atividade fosfatásica da FAB no plasma sangüíneo. Assim, pode-se verificar que os flavonóides quercetina e morina, possuem todas as características estruturais importantes para apresentar os efeitos biológicos analisados, e uma pequena mudança na posição de uma hidroxila no anel do catecol já foi o suficiente para que estes flavonóides apresentassem efeitos antagônicos.

ABSTRACT

Flavonoids are polyphenolic compounds largely consumed in the human diet, and can reach a daily consumption of 1.0 gram. A great variety of *in vitro* and *in vivo* biological effects has been described for the flavonoids, such as, inhibition and alteration of the enzyme expression, antioxidant and prooxidant, synthesis and repair of DNA, apoptosis induction and antitumoral. Phosphatases are enzymes of the class of hydrolases that catalyze the dephosphorylation of phosphate monoesters and are divided into three main groups: protein phosphatases, acid phosphatases and alkaline phosphatases. The protein phosphatases, in conjunction with the protein kinases, are responsible for the mechanism of phosphorylation/dephosphorylation that controls the main cellular events, such as, cellular growth, differentiation and division. A protein tyrosine phosphatase - CD45 - was purified from human membrane lymphocytes through gel filtration and ion exchange chromatographies. The purified enzyme was inhibited 30% by 400 μM of the flavonoid morin, and activated (30%) at the same concentration of fisetin, in concentration-dependent processes. Biological tests with the human myeloid leukemia cells (HL60) showed that fisetin and morin promoted 90% of cellular death. Three parameters were used to establish the cell viability: phosphatase activity, MTT reduction, and protein content. The following IC₅₀ flavonoid concentrations were obtained: 50 e 150 μM for the total acid phosphatase activity in the presence of rutin and fisetin, respectively; 45, 190 e 80 μM for the MTT reduction in the presence of fisetin, morin and quercetin, respectively; none corresponding flavonoid concentration values for the total protein content were obtained. For the primary human lymphocytes cultures, fisetin was the only flavonoid that exhibit toxic effects, with the following cell viability parameters: 75 μM (protein content), 100 μM (phosphatase activity) and 200 μM (MTT reduction). On the other hand, concentrations of quercetin higher than 10 μM promoted an increase of 50% in the protein content, an indication of cell

proliferation, with no changes of the other parameters. Western blot tests for fisetin in HL60 cultures indicated a capacity of this flavonoid to promote an activation of MAPK p38 and inhibitions of MAPKs ERK and JNK; these effects in HL60 can result in an antiproliferative activity . *In vivo*, quercetin and morin induced an increase in the protein expression in the liver (17%). In general, morin decreased the total acid phosphatase (FAT), and alkaline phosphatase (FAlc) activities in the kidney of about 10 and 60%, respectively; and FAT and low-molecular mass acid phosphatase (FAB) of 45% and 40%, respectively, in the plasm. In contrast, quercetin increased the enzyme activities 15% for FAB and FAlc in the liver; 15%, 18% and 75%, respectively for FAlc, FAB and tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) in the kidney; and 100% for the FAB activity in the plasm. Our results showed that the antagonistic effects of quercetin and morin were related to small modifications in the structures of these flavonoids, ie, the change in the position of a hydroxyl group in the catechol ring.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Flavonóides

1.1.1. Considerações Gerais

Flavonóides são compostos polifenólicos amplamente encontrados no reino vegetal. A quantidade de flavonóides consumidos diariamente varia de 6 a 64 mg, podendo chegar até 1g/ dia, sendo largamente encontrados em chás verdes, vinho tinto, frutas, vegetais, plantas medicinais e remédios derivados de ervas. Os flavonóides foram primeiramente identificados como vitamina P e juntamente com as vitaminas C e K, são importantes na manutenção da integridade e resistência dos capilares sanguíneos.

Subseqüentemente, outras propriedades biológicas foram descritas para os flavonóides, incluindo: atividade anti-hipertensiva, antiarrítmica, antiinflamatória, antialérgica, anti-coleresterolêmica, anti-hemorrágica, anti-tumoral, anti-trombótica, estabilizante de plaquetas e mastócitos e alguns flavonóides também apresentam atividade hepatotóxica (Formica e Regelson, 1995; Hertog, 1996; Rice-Evans et al., 1996; Antônio e Brito, 1998; Middleton et al., 2000; Havsteen, 2002; Bhatia e Jain, 2004).

Na literatura existem diversas revisões sobre a relação atividade biológica-estrutura dos diferentes tipos de flavonóides (Formica e Regelson, 1995; Di Carlo et al., 1999; Middleton et al., 2000; Havsteen, 2002; Bhatia e Jain, 2004). Mais de 4.000 flavonóides diferentes têm sido descritos e categorizados como flavonol, flavona, flavan-3-ol, flavanonol, flavanona, isoflavona e antocianinas que podem ou não ser glicosilados. Em plantas, flavonóides são encontrados ligados a açúcares como glicosídeos e são bastante estáveis (Hertog et al., 1993). Na Tabela 1 são apresentadas as diferentes classes de flavonóides mais importantes e com maior atividade biológica de interesse. Como os flavonóides estão presentes na dieta humana, é importante o entendimento das suas propriedades bioativas, sua absorção,

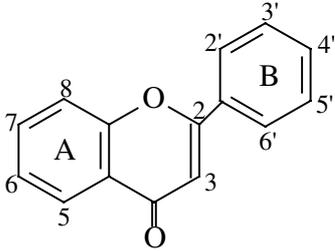
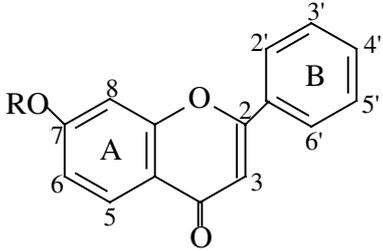
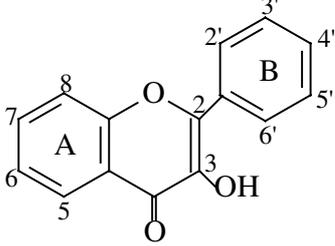
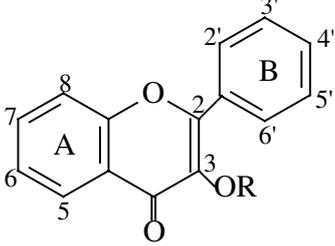
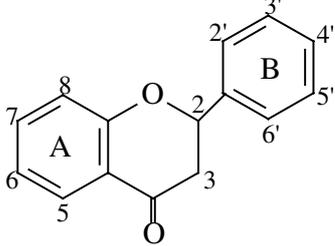
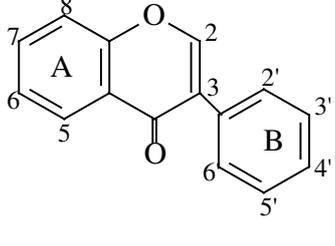
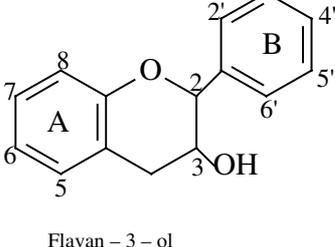
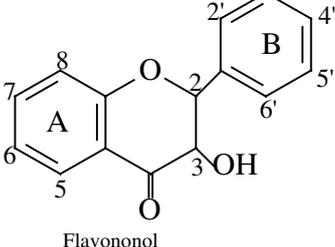
sua subsequente distribuição, seu metabolismo e excreção em humanos (Hollman e Katan, 1998).

1.1.2. Absorção e Biodisponibilidade dos flavonóides

Até pouco tempo, a hidrólise dos flavonóides glicosilados só era conhecido em microrganismos. Mas, atualmente, há dados obtidos em humanos (Hollman e Katan, 1998) que sugerem a absorção de flavonóides glicosilados em pequenas quantidades no intestino, devido a ação de bactérias alojadas no intestino grosso (Day et al., 2000; Middleton et al., 2000; Havsteen, 2002; Bhatia e Jain, 2004). O metabolismo destes compostos é bastante conhecido e estudado em animais; no entanto, há poucos dados concretos para o metabolismo em humanos. Alguns autores, Hollman et al. (1996 e 1997) e Paganga e Rice-Evans (1997), mostram que quercetina glicosilada é encontrada na circulação sanguínea após a ingestão. Esta pode ser rapidamente absorvida em pequenas quantidades, mas sua eliminação é muito lenta, sendo a cinética da absorção e biodisponibilidade dependente do tipo do glicosídeo ligado ao flavonóide.

Um dos primeiros estudos da distribuição de flavonóides não glicosilados, por exemplo quercetina, em humanos ocorreu em 1975 (Glugler et al., 1975), quando ministrou-se doses orais e intravenosas. A partir da dose intravenosa pode-se determinar o período de meia-vida plasmático e a sua distribuição corpórea. Usando técnicas analíticas de HPLC (cromatografia líquida de alto desempenho), Erlund et al. (2001), demonstrou quantitativamente os níveis plasmáticos de flavonóides não glicosilados, e de seus metabólitos como glucuronídeos e/ou sulfatos conjugados. Quanto às doses orais, observou-se que a biodisponibilidade plasmática é praticamente zero e quercetina é praticamente encontrada intacta nas fezes (Walle et al., 2001; Erlund, 2004).

Tabela 1: Classificação dos Flavonóides (Di Carlo et al., 1999).

	 <p>Flavona</p> <table border="1"> <tr> <td></td> <td>5</td> <td>6</td> <td>7</td> <td>4'</td> </tr> <tr> <td>Apigenn</td> <td>OH</td> <td>-</td> <td>OH</td> <td>OH</td> </tr> <tr> <td>Baicalein</td> <td>OH</td> <td>OH</td> <td>OH</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Chrysin</td> <td>OH</td> <td>-</td> <td>OH</td> <td>-</td> </tr> </table>		5	6	7	4'	Apigenn	OH	-	OH	OH	Baicalein	OH	OH	OH	-	Chrysin	OH	-	OH	-	 <p>Flavona glicosilada</p> <table border="1"> <tr> <td></td> <td>5</td> <td>6</td> <td>7</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Baicalin</td> <td>OH</td> <td>OH</td> <td>R</td> <td></td> </tr> </table> <p>R= β- glucopiranosil</p>		5	6	7		Baicalin	OH	OH	R																		
	5	6	7	4'																																													
Apigenn	OH	-	OH	OH																																													
Baicalein	OH	OH	OH	-																																													
Chrysin	OH	-	OH	-																																													
	5	6	7																																														
Baicalin	OH	OH	R																																														
	 <p>Flavonol</p> <table border="1"> <tr> <td></td> <td>5</td> <td>7</td> <td>2'</td> <td>3'</td> <td>4'</td> <td>5'</td> </tr> <tr> <td>Quercetin</td> <td>OH</td> <td>OH</td> <td>-</td> <td>OH</td> <td>OH</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Morin</td> <td>OH</td> <td>OH</td> <td>OH</td> <td>-</td> <td>OH</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Kaempferol</td> <td>OH</td> <td>OH</td> <td>-</td> <td>OH</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Myricetin</td> <td>OH</td> <td>OH</td> <td>OH</td> <td>OH</td> <td>OH</td> <td>-</td> </tr> </table>		5	7	2'	3'	4'	5'	Quercetin	OH	OH	-	OH	OH	-	Morin	OH	OH	OH	-	OH	-	Kaempferol	OH	OH	-	OH	-	-	Myricetin	OH	OH	OH	OH	OH	-	 <p>Flavonol glicosilado</p> <table border="1"> <tr> <td></td> <td>3</td> <td>5</td> <td>7</td> <td>3'</td> <td>4'</td> </tr> <tr> <td>Rutin</td> <td>R</td> <td>OH</td> <td>OH</td> <td>OH</td> <td>OH</td> </tr> </table> <p>R= Raminosilglucosidio</p>		3	5	7	3'	4'	Rutin	R	OH	OH	OH	OH
	5	7	2'	3'	4'	5'																																											
Quercetin	OH	OH	-	OH	OH	-																																											
Morin	OH	OH	OH	-	OH	-																																											
Kaempferol	OH	OH	-	OH	-	-																																											
Myricetin	OH	OH	OH	OH	OH	-																																											
	3	5	7	3'	4'																																												
Rutin	R	OH	OH	OH	OH																																												
	 <p>Flavonona</p> <table border="1"> <tr> <td></td> <td>5</td> <td>7</td> <td>4'</td> </tr> <tr> <td>Naringenin</td> <td>OH</td> <td>OH</td> <td>OH</td> </tr> </table>		5	7	4'	Naringenin	OH	OH	OH	 <p>Isoflavona</p> <table border="1"> <tr> <td></td> <td>5</td> <td>7</td> <td>4'</td> </tr> <tr> <td>Genistein</td> <td>OH</td> <td>OH</td> <td>OH</td> </tr> </table>		5	7	4'	Genistein	OH	OH	OH																															
	5	7	4'																																														
Naringenin	OH	OH	OH																																														
	5	7	4'																																														
Genistein	OH	OH	OH																																														
	 <p>Flavan-3-ol</p> <table border="1"> <tr> <td></td> <td>5</td> <td>7</td> <td>3'</td> <td>4'</td> </tr> <tr> <td>Catechin</td> <td>OH</td> <td>OH</td> <td>OH</td> <td>OH</td> </tr> </table>		5	7	3'	4'	Catechin	OH	OH	OH	OH	 <p>Flavononol</p> <table border="1"> <tr> <td></td> <td>5</td> <td>7</td> <td>3'</td> <td>4'</td> </tr> <tr> <td>Taxifolin</td> <td>OH</td> <td>OH</td> <td>OH</td> <td>OH</td> </tr> </table>		5	7	3'	4'	Taxifolin	OH	OH	OH	OH																											
	5	7	3'	4'																																													
Catechin	OH	OH	OH	OH																																													
	5	7	3'	4'																																													
Taxifolin	OH	OH	OH	OH																																													

Uma vez que, os flavonóides estejam disponíveis no plasma sanguíneo, o seu metabolismo é mediado por enzimas do complexo citocromo P450. Muitos estudos têm sido realizados para se determinar a interação dos flavonóides com estas enzimas, os quais têm se mostrado excelentes inibidores de diferentes isoformas do complexo P450, em particular, CYP1A1 e CYP1A2 (Tsyrllov et al., 1994; Lee et al., 1998; Zhai et al., 1998; Moon et al., 2000). Em todos os casos a ação dos flavonóides sobre a atividade das isoformas de P450 levam a oxidação dos flavonóides (Doostdar et al., 2000; Otake e Walle, 2001; Hu et al., 2003).

1.1.3. Papel Biológico dos Flavonóides

A variedade dos efeitos biológicos dos flavonóides em inúmeros sistemas celulares *in vitro*, bem como *in vivo*, tem sido descrita por vários autores:

a) Inibição e alteração da expressão enzimática - os flavonóides podem inibir muitas enzimas importantes nos sistemas celulares como: ATPase, fosfolipase, prostaglandina ciclooxygenase, lipoxigenase, aldose redutase, hexoquinase, NADH oxidase, succinoxidase, xantina oxidase, proteína quinase, hidrolases, peroxidases, metalopeptidases e tirosinases (Srivastava, 1985; Ferriola et al., 1989; Cushman et al., 1991; Formica e Regelson, 1995; Day et al., 2000; Ferreira et al., 2000; Bormann e Melzing, 2000; Shimizu et al., 2000; Middleton et al., 2000; Havsteen, 2002; Bhatia e Jain, 2004). Podem ainda induzir várias enzimas, como a aril hidroxilase e a epóxido hidroxilase (Das, 1994). Além disso, diversos trabalhos têm mostrado o efeito inibitório de flavonóides sobre DNA e RNA polimerases dependentes de DNA e RNA e transcriptase reversa (Shinozuka et al., 1988; Ono e Nakane, 1990; Chu et al., 1992; Formica e Regelson, 1995; Uddin e Choundhry, 1995; Solimani, 1997; Wang et al., 1998; Min et al., 2000).

b) Antioxidantes e Pró-oxidantes - recentemente, muita atenção tem sido dada para as propriedades antioxidantes dos flavonóides e seu papel inibitório na proliferação de células neoplásicas em cultura e em vários estágios do

desenvolvimento tumoral estudados em animais (Le Marchand et al., 2000; Shimizu, 2000; Middleton et al., 2000; Havsteen, 2002; Bhatia e Jain, 2004). As atividades antioxidante e quelante dos flavonóides são, provavelmente, os fatores mais importantes da sua ação protetora contra degradação em tecidos e células por radicais livres (Afanas'ev et al., 1989; Korkina e Afanas'ev, 1997). Alguns flavonóides podem modular o aumento no número de processos celulares envolvendo reações de oxirredução, incluindo a regulação da atividade da tirosina fosfatase. Além disso, eles atuam na diminuição da peroxidação lipídica (Das e Ray, 1988; Bhatia e Jain, 2004), neutralizam os radicais livres nas células em diferentes níveis: na iniciação, como seqüestrador de $O_2^{\bullet-}$, em reações com peroxil ou radicais peroxil lipídicos, e na formação de OH^{\bullet} , provavelmente como quelante de ferro e na produção de peroxinitrito (Haenen et al., 1997; Metodiewa et al., 1999; Aliá, 2003; Hu et al., 2004). Metodiewa et al. (1999), discutiram a ação da quercetina em sistemas celulares e foi demonstrado que este possui ação antioxidante, protegendo os componentes celulares da degradação oxidativa e toxicidade de radicais livres, reduzindo a morte celular promovida pela redução dos antioxidantes celulares. No entanto, tem-se verificado também que a quercetina pode possuir ação pró-oxidante dependendo da concentração e surgimento dos radicais livres, sendo que este efeito trata-se da transformação da quercetina em compostos pró-oxidantes como o-semiquinona e o-quinona.

c) Síntese e reparo do DNA - os flavonóides podem afetar a síntese do DNA indiretamente (ligando-se à metais) ou diretamente (alterando a estrutura do DNA). A quercetina provocou inibição dose-dependente da síntese de DNA em células HL60 (Kang e Liang, 1997). Abalea e colaboradores (1999) demonstraram que a miricetina induziu reparo do DNA em hepatócitos de ratos tratados com ferro. Análise da expressão da DNA polimerase revelou que houve um aumento da expressão desta enzima nos hepatócitos tratados com a miricetina, o que pode ser a causa da indução do reparo por este flavonóide.

d) Indução da apoptose - vários flavonóides são capazes de induzir apoptose em diferentes tipos celulares, sendo este efeito dependente da estrutura do flavonóide e do tipo celular. Células tumorais podem morrer por apoptose quando tratadas com concentrações de flavonóides de 1-100 mM (Ferguson, 2001). Este efeito parece estar relacionado com a liberação do citocromo c da mitocôndria para o citosol. Além disso, baixas concentrações de flavonóides podem ativar proteínas quinases ativadas por mitógenos, levando à expressão de genes responsáveis pela sobrevivência de várias linhagens de células de mamíferos (*c-fos* e *c-jun*) e que concentrações altas e suprafarmacológica destes compostos levam à apoptose e necrose, respectivamente (Wang et. al., 1999).

e) Antitumorais - os flavonóides são considerados como quimiopreventivos do câncer por atuarem como antioxidantes, moduladores da atividade de enzimas e induzirem o reparo do DNA, como mencionado acima. Estes compostos podem afetar a proliferação, diferenciação e apoptose de diversas linhagens de células tumorais (Di Carlo et al., 1999). A chalcona apresentou forte efeito citotóxico sobre células tumorais de pulmão, cólon humano e leucemia murina. O campferol e a quercetina apresentaram atividades moduladoras da proliferação das células HL60 (Kang e Liang, 1997). O mecanismo de ação da atividade antitumoral dos flavonóides ainda não está bem elucidado. Alguns autores têm correlacionado este efeito com a inibição de proteínas tirosina quinases; a quercetina inibe a proteína quinase C, enzima chave na regulação da proliferação celular (Kang e Liang, 1997). A flavona induziu a diferenciação e apoptose de células de câncer de cólon humano, cujo mecanismo proposto foi a alteração da expressão de genes relacionados com o ciclo celular e apoptose, incluindo o *NFkB* e *bcl-X*.

Assim, os flavonóides parecem possuir muitas atividades promissoras que os tornam excelentes agentes naturais modificadores da resposta biológica. Portanto, devido a este fato, vários estudos epidemiológicos estão sendo realizados utilizando-se flavonóides. *In vitro*, tem se observado que os flavonóides são capazes de inibir enzimas envolvidas nos processos de desenvolvimento, diferenciação e proliferação

de células cancerosas e de diminuir a atividade de vários tipos de câncer como do colo do útero, ovários, linfóides, mama (Kuo, 1996; Lepley e Pelling, 1997; Lepley et al., 1996, Takakura, 1999) e leucemia (Hirano et al., 1994; Carrero et al., 1998; Wang et al., 1999). Quando quercetina e rutina foram administradas em ratos, ocorreu uma diminuição significativa na incidência de tumores provocada por agentes neoplásicos (Deschner et al., 1991) e a aplicação tópica de alguns flavonóides em pele de ratos resultou em uma completa proteção contra o aparecimento de tumores e multiplicidade de carcinomas (Birt et al., 1997; Korkina e Afanas'ev, 1997; Zi et al., 1997). Apesar dos estudos de flavonóides em diversos sistemas enzimáticos, em muitos outros não existem referências específicas, como, por exemplo, no caso de proteínas fosfatases.

1.2. Fosfatases

As fosfatases são hidrolases que catalisam a desfosforilação de monoésteres de fosfatos. Estas enzimas podem ser divididas em três grupos: proteínas fosfatases, fosfatases ácidas e fosfatases alcalinas (Bernier e Wang, 1996; Jia, 1997; Aoyama, 2003). Estas hidrolases estão amplamente distribuídas nos diferentes tecidos (Duff et al., 1994; Ferreira et al., 1998) e compartimentos celulares (Lee et al., 1998). Estudos citoquímicos revelaram a presença destas enzimas em diferentes locais da célula: núcleo, mitocôndrias, membranas, lisossomo, complexo de golgi e retículo endoplasmático (Lee et al., 1998).

1.2.1. Fosfatases Ácidas

Fosfatases ácidas (ortofosfato monoéster fosfohidrolases – E.C.3.1.3.2) de mamíferos podem ser classificadas de acordo com a massa molecular relativa (Mr) e inibição, como fosfatase ácida de alta Mr (acima de 100 kDa), Mr intermediária (20 a 100 kDa) e baixa Mr (menor que 20 kDa) e são inibidas pelo tartarato, fluoreto e

p-mercuribenzoato respectivamente. As fosfatases ácidas de alta e intermediária Mr podem apresentar na suas estruturas ferro, zinco ou magnésio e algumas vezes carboidratos. As fosfatases ácidas de baixa massa molecular relativa são classificadas como proteínas tirosina fosfatases. As fosfatases ácidas apresentam um pH ótimo para catálise em torno de 5,0 e utilizam como substratos compostos com baixa massa molecular (por exemplo, açúcares fosforilados).

1.2.2. Fosfatases Alcalinas

Fosfatases alcalinas apresentam um pH ótimo para catálise em torno de 9,0. Também atuam sobre substratos de baixa massa molecular relativa, no entanto, há necessidade de íons divalentes, como magnésio, cobalto ou manganês, para catálise.

1.2.3. Proteínas Fosfatases

Muitas vias de sinalização celular são reguladas por fosforilação/desfosforilação de proteínas (Aoyama et al., 2003). A adição ou remoção do grupamento fosfato de uma proteína, pode gerar um local de reconhecimento para interação proteína-proteína, controle da estabilidade protéica e o mais importante, modular a atividade de enzimas (Zhang 2003). Aproximadamente 30% das proteínas celulares são fosfoproteínas (Cohen 2000). Em células eucarióticas a maioria da fosforilação de proteínas ocorre em resíduos de serina e treonina. Fosforilação em resíduos de tirosina representa somente 0,01-0,05% do total de proteínas fosforiladas (Swanson et al., 1994).

Historicamente, proteínas fosfatases constituem uma grande família de enzimas com analogia semelhante a proteínas quinases em sua complexidade e diversidade estrutural. Portanto, estudos genéticos e bioquímicos mostraram que estas proteínas exercem efeitos tanto negativo quanto positivo nas vias de sinalização e no controle fisiológico de uma variedade de tecidos (Zhang et al.,

2002). Mudanças anormais na atividade dessas enzimas podem proporcionar conseqüências graves, que incluem neoplasias e doenças resultantes de defeitos imunológicos (Jia et al.,1997; Harrison et al., 1999). Numa transformação oncogênica ou estimulação de fatores de crescimento, o nível de proteínas fosforiladas em resíduos de tirosina aumenta de 1-2% na célula, podendo assim levar a graves doenças incluindo o câncer e diabetes. (Neel e Tonks; 1997; Li e Dixon 2000; Zhang 2002).

Com base na função, estrutura, seqüência e sensibilidade a inibidores, as proteínas fosfatases podem ser classificadas em duas grandes famílias: Proteínas tirosina fosfatases e Proteínas Serina/treonina fosfatases.

As proteínas serina/treonina fosfatases e proteínas tirosinas fosfatases não apresentam similaridade estrutural quando comparamos seus domínios catalíticos (Jia et al., 1997, Harrison et al., 1999, Zhang et al., 2002).

1.2.3.1. Proteínas Tirosina Fosfatases

As proteínas tirosina fosfatases (PTPs) são uma família de enzimas (mais de 100 enzimas diferentes) responsáveis pela hidrólise do fosfato ligado a resíduos de tirosina. São estruturalmente diversas, compreendendo receptores com a habilidade de transmitir sinais diretamente através da membrana e enzimas citoplasmáticas que agem tanto positiva como negativamente no controle da função celular (Fischer et al., 1991; Walton e Dixon, 1993; Harrison et al., 1999, Zhang, 2003) – (Figura 1).

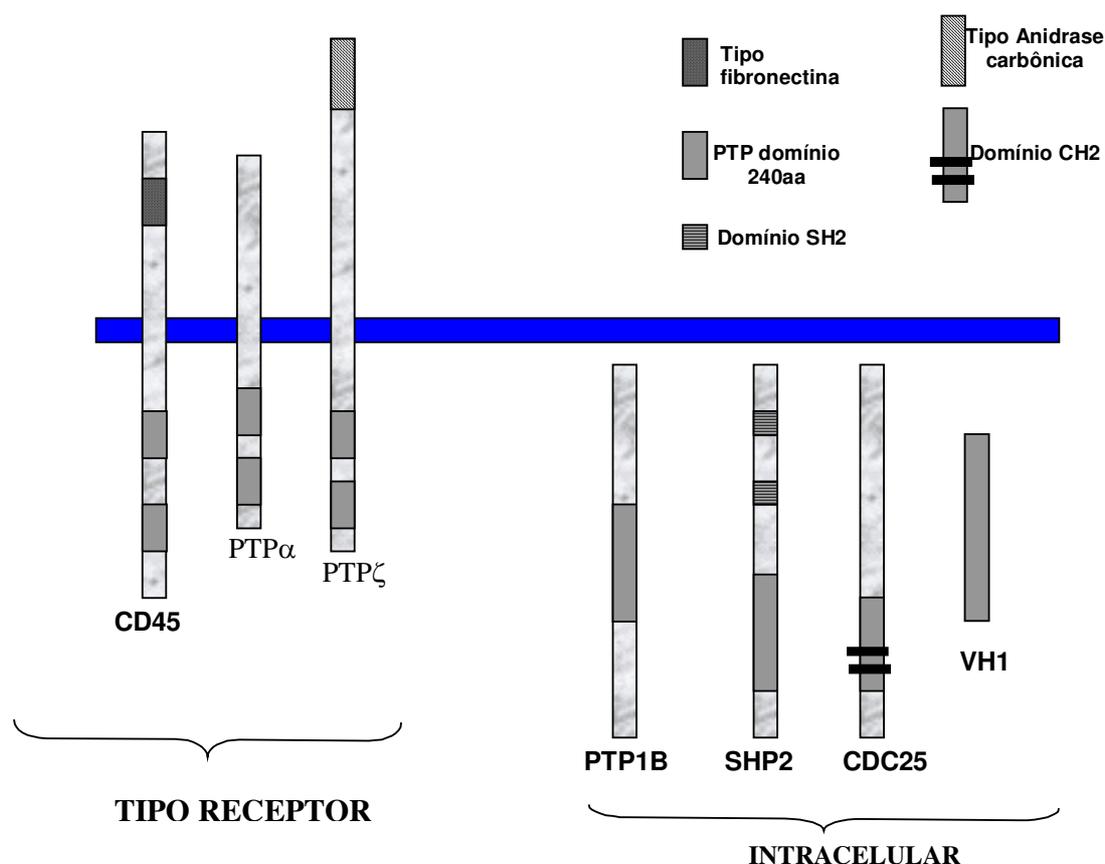


Figura 1: Representação esquemática das proteínas tirosinas fosfatases (PTPs).

De acordo com a especificidade, estas enzimas podem ser classificadas em:

- *Proteínas Tirosina Fosfatases Específicas*: hidrolisam resíduos de tirosina fosforilados (Tyr-P) alvos e subdividem-se em:

a) Tipo receptor (CD45, e PTP ζ) – possui um domínio extracelular, uma região transmembrana e um ou dois domínios citoplasmáticos (Figura 1) (Brady-Kalnay et al., 1995; Alexander, 2000; Noumi et al., 2000);

b) Intracelular (PTP 1B, VH1 e SHP-2) – possui um domínio simples e várias extensões amino ou carboxiterminal, com domínios do tipo SH2 (cisteínico) (figura 1).

- *Específica dual*: são capazes de hidrolisar fosfatos monoésteres de peptídios contendo fosfotirosina e fosfoserina/treonina, essas enzimas regulam a sinalização mitogênica e desempenham um papel importante no controle do ciclo celular (SH1, MKPs e cdc25) – (Zhang, 2001).

- *Baixa massa molecular Relativa (BMr)*: hidrolisam resíduos de tirosina e possuem importante papel na regulação da proliferação celular (Harrison et al., 1999; Zhang, 2001).

As PTPs têm sido alvo de estudo no controle de várias vias de sinalização celular em organismos eucarióticos. Proteínas tirosina fosfatases são caracterizadas por aproximadamente 240 aminoácidos e possuem um domínio altamente conservado com uma seqüência assinatura no sítio catalítico característico desta família **(H/V)C(x)5R(S/T)**, compartilhando um padrão de sítio ativo constituído de uma cisteína e uma arginina que são essenciais para a catálise enzimática. A presença da cisteína (C) no sítio ativo é responsável pela característica comum das proteínas tirosinas fosfatases de serem inibidas pelo pervanadato, p-cloromercuribenzoato e outros agentes oxidantes (Tonks e Neel, 1996; Tsiani e Fantus, 1997; Jin *et al.*, 2000; Aoyama et al., 2003). As estruturas tridimensionais de aproximadamente uma dúzia de PTPs tem sido determinadas, o que têm contribuído no entendimento da função das PTPs a nível molecular por definir as interações que estabilizam a estrutura do sítio ativo e a formação do complexo com substrato.

Estudos cinéticos e estruturais detalhados das subfamílias das PTPs revelaram um mecanismo químico comum para reações catalisadas por estas enzimas (Figura 2). Além disso as PTPs possuem uma variedade estrutural de domínios incluindo SH2 e domínios extracelulares ligantes (Harrison et al., 1999; Zhang et al., 2002).

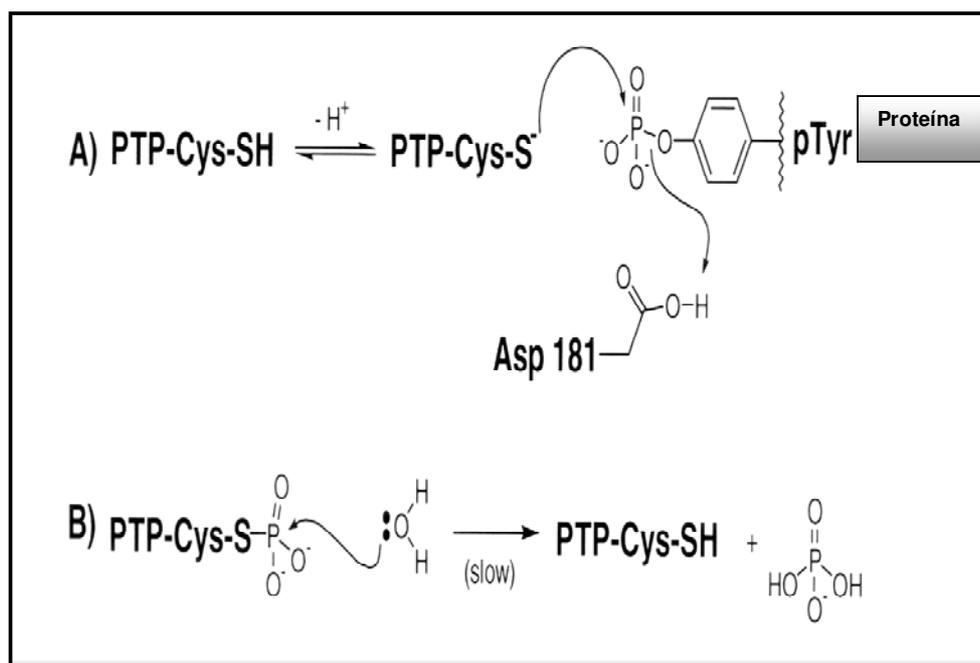


Figura 2: **Mecanismo catalítico das Proteínas Tirosina Fosfatases.**

Estudos cinéticos, mutação sítio dirigida e identificação das estruturas das PTPs, permitiram identificar a cisteína, arginina e a asparagina como resíduos extremamente importantes para catálise enzimática (Zhang et al., 1997). A Figura 2 mostra a desprotonação do resíduo de cisteína (Cys-215) essencial para catálise e ataque nucleofílico ao fósforo da proteína fosforilada (Reação A) e subsequente hidrólise do intermediário cisteinil-fosfato por adição de uma molécula de água nucleofílica, completando o ciclo catalítico pela regeneração da enzima ativa (Reação B).

1.2.3.2. Proteínas Serina/Treonina Fosfatases

As proteínas serina/treonina fosfatases apresentam mais de uma cadeia polipeptídica, subunidade catalítica e regulatória, tendo como característica comum a dependência de cátions divalentes. Estas fosfatases podem ser agrupadas em duas subfamílias, PPP e PPM. Os membros da subfamília PPP, por exemplo, PP1, PP2A

e PP2B (calcineurina) apresentam alta homologia na sequência dos domínios catalíticos, mas diferem na especificidade por substratos e interações com proteínas regulatórias. PP1 e PP2A não têm uma necessidade absoluta de cátions divalentes, ao passo que PP2B e PP2C são Ca^{2+} /calmodulina e Mg^{2+} dependentes, respectivamente. PP2C é um membro representativo da outra subfamília de serina/treonina fosfatases, PPM (Jia, 1997). Mais recentemente outras fosfatases pertencentes à família PPP foram descobertas e estas são as PP4, PP5 e PP6 (Barford, 1996; Harrison et al., 1999; Chaudhuri, 2001).

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

PP2B, também conhecida como calcineurina, é ativada por um aumento do Ca^{2+} citoplasmático em linfócitos, causando desfosforilação da forma citoplasmática do fator de transcrição nuclear de células T ativadas (NFAT) o qual inicia a transcrição da interleucina-2, que é um fator de crescimento das células T (Harrison et al., 1999; Baksh e Burakoff, 2000). A óxido nítrico sintase (NOS) é um substrato para a PP2B e tem sido proposto que a desfosforilação de NOS realça sua atividade catalítica, resultando na formação do óxido nítrico e conseqüentemente ação neurotóxica (Dawson et al., 1993).

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

A PP4 pertence à mesma subfamília da PP1 e PP2A, por demonstrar aproximadamente 60% de homologia com este grupo. A distribuição celular desta enzima é ampla, sendo encontrada em centrossomos, núcleo e citoplasma sugerindo que PP4 tem funções variadas (Da Cruze et al., 1988; Brewis et al., 1993). Devido a sua localização, PP4 pode estar envolvida na duplicação do centrossomo, como também foi detectada em vários estágios da mitose (exceto telófase) (Brewis et al., 1993; Harrison et al., 1999). Sugere-se que a PP5 esteja localizada provavelmente no núcleo (Fischer et al., 1989). Esta enzima está envolvida na regulação da síntese de RNA, mitose e na sinalização em resposta aos hormônios esteróides. A PP6 está envolvida na regulação da transcrição (Harrison et al., 1999, Chinkers, 2001).

1.3. Proteínas Quinases

A fosforilação de proteínas é realizada pelas proteínas tirosina quinases e serina/treonina quinases. Esta modificação pós-tradução altera a atividade de várias enzimas e, portanto, regula vários processos celulares (Yang e Gabuzda, 1998). 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 (MAPKs) participam de várias vias de sinalização (Cano e Mahadevan, 1995).

A principal via para regulação do crescimento e diferenciação celular se dá através de cascatas envolvendo as proteínas quinases ativadas por mitógenos, as quais transmitem sinais da membrana plasmática ao núcleo a partir da ligação de fatores de crescimento (estímulo extracelular) a receptores específicos, os quais apresentam atividade quinase intrínseca ou estão acoplados à proteína G. A cascata altamente conservada de proteínas quinases ativadas por mitógenos é composta de 3 quinases: MAPK quinase quinase (MAPKKK), MAPK quinase (MAPKK) e MAPK (Sabbagh et al, 2001). Normalmente, a proteína G e 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.

Este 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. Estas três etapas da cascata estão presentes em todas as células eucarióticas e desempenham várias funções como resposta ao estresse, controle do ciclo celular, crescimento, diferenciação e apoptose.

1.3.1. Tipos de Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos (MAPKs)

As MAPKs pertencem a uma grande família que inclui a **quinase cJun N-terminal** (ou proteína quinase ativada por estresse - JNK/SAPK), a proteína quinase ativada por sinal extracelular (ERK1, 2, e 5) e a subfamília da MAPK p38. As MAPKs JNK e p38 podem ser ativadas por vários fatores de estresses tais como irradiação UV, estresse osmótico, citocinas pró-inflamatórias, dano oxidativo e xenobióticos (Wang e Ron, 1996; Minden e Karin, 1997; Feuerstein e Young, 2000; Kong et al., 2001). As MAPKs p38 e JNK mediam, entre outros processos, interrupção do ciclo celular, reparo ou apoptose (Tanoue et al, 1999, 2001).

1.3.2. Modulação das MAPKs

A regulação das proteínas quinases ativadas por mitógenos se dá, basicamente, por fosforilação e desfosforilação. No entanto, outros fatores como o sítio de ancoragem, domínio D, domínio Glu-Asp e as espécies reativas de oxigênio (EROs), contribuem significativamente para a atividade e especificidade dessas

enzimas (Minden e Karin, 1997; Camps et al, 1998; Holland e Cooper, 1999; Allen e Tresini, 2000; Tanoue et al, 2001; Kong et al., 2001).

1.4. Modelos Experimentais Utilizados no Trabalho

1.4.1. *In Vitro*

1.4.1.1. Linfócitos Humanos

Os linfócitos T, facilmente cultivados *in vitro*, são células que ficam em suspensão após serem plaqueadas. São responsáveis pela produção de diversas substâncias entre elas mediadores inflamatórios, como as citocinas e estas são peptídios solúveis secretados por uma variedade de células. Estas incluem os interferons (INF- α , β e γ) e interleucinas (IL) (Yassad et al., 1997). As proteínas fosfatases têm auxiliado na elucidação de vários eventos celulares dependentes de desfosforilação/fosforilação envolvidos nestas funções. Estas células expressam uma variedade de proteínas tirosina fosfatases (tabela 2) citoplasmáticas e de membranas (Palou et al., 1997; Mustelin et al., 2004).

Tabela 2: Proteínas Tirosina Fosfatases (PTPs) envolvidas na ativação de células T (Mustelin et al., 2004).

PTPs	Tipo de ativação	Mechanismo, função e substratos
CD45	Positiva	Regula positivamente as famílias de quinases Lck e Fyn.
HePTP	Negativa	Desfosforila e inativa Erk e p38 no citosol.
CD148	Negativa	Desfosforila PLCy e LAT
TCPTP	Negativa	Desfosforila Stat1 nos núcleo celulares.
LYP	Negativa	Desfosforila Lck, Fyn e atua nos loops de ZAP-70.
PTP-PEST	Negativa	Liga-se a Csk e desfosforila Cãs, She, Pyk2, Fak.
SHP1	Negativa	Mediação da inibição através ITIM contendo receptores, desfosforila ZAP-70 e Syk, etc.
SHP2	Positiva	Aumenta a ativação de Erk por mecanismo desconhecido.
PTP-MEG2	Não é claro	Regulação de secreção, não possui efeito sobre sinalização de TCR.
PTPH1	Negativa	Inibição, desfosforilação ITAMs e VCP.
PTP-MEG1	Negativa	Inibição, mecanismo desconhecido.
PAC-1	Negativa	Desfosforilação de Erk em núcleo de células.
VHR	Negativa	Ativada por ZAP-70, desfosforila Erk e Jnk.
VHX	Não é claro	Inibi a indução por TCR e reporta a ativação gênica.
MKP6	Não é claro	Interage com CD28, pode regular MAP quinases.
LMPTP	Positiva	Desfosforila ZAP-70 em Tyr-292.
PTEN	Negativa	Neutraliza PI3K, reduz a sobrevivência.

Fosforilação é o mais comum e bem entendido mecanismo regulatório no funcionamento celular. Os linfócitos T apresentam pelo menos dois tipos de proteína fosfatases características: uma PTP tipo receptor (CD45) presente na membrana e uma proteína Ser/Thr fosfatase citoplasmática (calcineurina ou PP2B), as quais apresentam importante papel na transdução de sinal.

A **CD45** é uma glicoproteína de peso molecular entre (180–220kDa) e é expressa exclusivamente em células hematopoiéticas, exceto eritrócitos maduros e plaquetas (Sasaki, et al. 2001). Em células T e B ela ocupa cerca de 10% da área da superfície celular, é composta de três porções distintas: um domínio extracelular variável, um único domínio intramembranar e uma grande região citoplasmática contendo dois domínios PTP. O primeiro domínio citoplasmático próximo à membrana chamado de D1 tem atividade PTPase enquanto que o segundo domínio D2 não tem atividade PTPase significativa devido uma mudança crítica nos aminoácidos essenciais para a catálise. Entretanto, o domínio D2 é requerido para propriedade de enovelamento e/ou recrutamento do substrato (Frearson e Alexander, 1996). A família *Src* quinase é ativada pela CD45 através de desfosforilação no resíduo regulatório negativo de tirosina. A CD45 tem sido extensivamente estudada e aceita pela comunidade científica como um regulador positivo dos receptores de célula T (TCR) e B (BCR) mediando a sinalização necessária para ativação e desenvolvimento de linfócitos (Figura 3) (Sasaki et al., 2001).

A ativação dos linfócitos via interleucina 2 (IL-2) necessita de segundos mensageiros como o diacilglicerol (DAG) e o inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) e tem um papel fundamental na ativação da Proteína quinase C (PKC) permitindo ativação da cascata de quinase ativada por mitógeno (MAPK) ou através da via RAS. O IP3 é um importante elemento controlador da liberação do cálcio do retículo endoplasmático para o citoplasma e subsequente ativação de proteínas dependentes de cálcio como a calmodulina. Bloquear o receptor de IL-2 é uma estratégia extremamente importante, pois doenças degenerativas neoplásicas ou de natureza

infecciosa estão diretamente relacionadas com ativação da célula T e conseqüentemente à interação da IL-2 com o seu receptor (IL-2R).

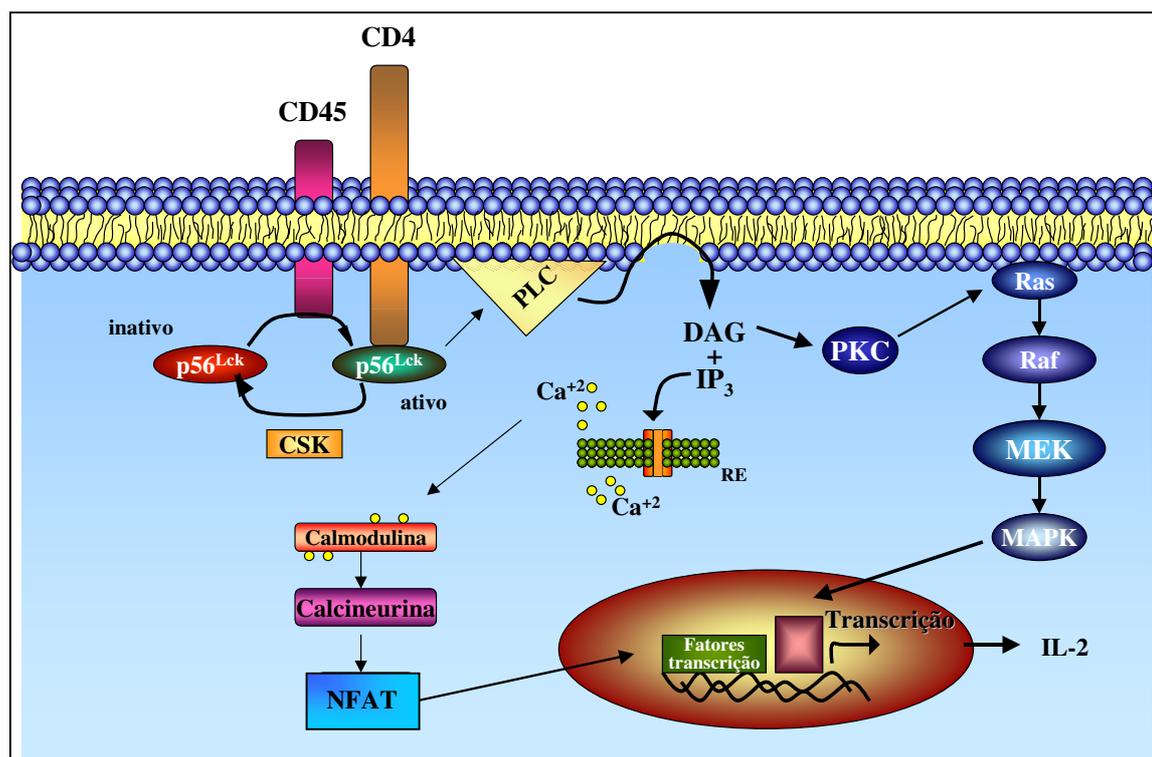


Figura 3 - Via de ativação dos linfócitos T. A via de ativação da proliferação linfocitária se inicia a partir da interação do antígeno com o TCR e conjuntamente recrutamento das proteínas de membrana CD45 e CD4, as quais indiretamente ativam duas vias de sinalização que tem participação da proteína ser/thr fosfatase(PP2B) e das MAPK(s) – (para detalhe das vias, vide texto).

1.4.1.2. Linhagem Celular da Leucemia Mielóide Humana (HL60)

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

As células da leucemia mielocítica humana HL60 foram isoladas do sangue de um paciente com leucemia mielocítica aguda e proliferam continuamente em suspensão, consistindo predominantemente de promielócitos (Newburger et al., 1979; Breitman, 1990). Porém, 4-5% delas mostram características morfológicas de células mielóides mais maduras, como mielócitos, metamielócitos, bastões e leucócitos polimorfonucleares (Newburger et al., 1979). Estas células representam um sistema experimental para o estudo *in vitro* da diferenciação leucêmica, bem como alvo do estudo de possíveis drogas que poderão ser utilizadas no tratamento dos diferentes tipos de leucemias (Sokoloski e Sartorelli, 1997; Uzunoglu et al., 1999).

As células HL60 apresentam pelo menos 5 tipos de proteínas fosfatases: proteína serina/treonina fosfatases (PP1 e PP2A), proteínas tirosina fosfatases CD45, SHP-1 e cdc25. A modulação da atividade da CD45 apresenta importante papel na diferenciação e/ou manutenção de várias linhagens de células leucêmicas num estado antiproliferativo (Buzzi et al., 1992). A proteína tirosina fosfatase SHP-1 também está envolvida na regulação da diferenciação destas células (Uesugi et al., 1999). A proteína tirosina nuclear controla a progressão do ciclo celular da fase G1 para S, e a expressão desta fosfatase está associada com um aumento da quantidade da proteína c-myc (Ganapati et al., 2001). A PP1 está envolvida na indução de apoptose pela desfosforilação da proteína retinoblastoma (pRb). A proteína Rb fosforilada é responsável pela progressão do ciclo celular de G1 para S, através da indução da expressão de ciclinas e liberação do fator EF2 (Wang et al., 2001). A PP2A participa na regulação do metabolismo, transcrição, processamento do mRNA (“splicing”), tradução, diferenciação, ciclo celular, transformação oncogênica e

transdução de sinal. A atividade desta enzima pode ser modulada por fosforilação e metilação do C-terminal. A ação antiapoptótica das fosfatases PP1 e PP2A foi evidenciada com a utilização de inibidores destas enzimas (ácido okadáico e caliculina, respectivamente) os quais induzem apoptose das células HL60 (Uzunoglu et al., 1999).

1.4.1.3. Fosfatases como Biomarcadores

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

Devido ao fato das fosfatases participarem de diferentes processos celulares, as mesmas podem servir como ferramenta para se avaliar a viabilidade celular através de estudos de citotoxicidade. Nestes tipos de estudos se avalia a função celular através da integridade da membrana, funcionamento de organelas (mitocôndria e lisossomo), conteúdo de DNA, além da atividade de certas enzimas como succinato desidrogenase (Loveland et al., 1992; Repetto e Sanz, 1993; Olivier et al., 1995). Além disso, as mesmas podem ser úteis como indicadores da via envolvida na resposta celular frente a agentes externos, como fármacos. Aoyama et al. (2000), propuseram a utilização de proteínas fosfatases como biomarcadores da viabilidade de fibroblastos tratados com ácido okadáico (inibidor de proteínas serina/treonina fosfatases), uma vez que os resultados obtidos revelaram uma reprodutibilidade e boa resposta na avaliação da viabilidade celular quando comparado com outros parâmetros usualmente empregados.

De maneira geral, os estudos sobre o controle do crescimento celular implicam na identificação e caracterização das enzimas envolvidas no processo, bem como no conhecimento dos possíveis substratos e moduladores fisiológicos. A identificação e utilização de compostos que alteram a atividade das enzimas que controlam o ciclo celular também são ferramentas importantes tanto para a

compreensão do mecanismo cinético como também potenciais instrumentos terapêuticos.

1.4.1.4. Estudos de Citotoxicidade

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

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

O estudo toxicológico *in vivo* tem sido preterido em virtude da utilização de elevado número de animais, acarretando alto custo financeiro, além de aspectos éticos questionados por entidades protetoras de animais. Desta forma, estudos *in vitro* têm sido cada vez mais utilizados, já que o efeito deletério de um xenobiótico em determinada linhagem celular é um indicativo da sua toxicidade *in vivo*. Além disto, apesar das limitações da cultura de células, os resultados obtidos são muito reprodutíveis (Freshney, 1994; Rodriguez e Haun, 1999).

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

Estudos de citotoxicidade são realizados para avaliar a viabilidade celular, os quais podem avaliar a função celular através da integridade da membrana e de organelas, conteúdo celular (metabólito ou macromolécula) e atividade enzimática

(Loveland et al., 1992; Repetto e Sanz, 1993; Olivier et al., 1995). Vários métodos foram descritos nas últimas décadas, para a avaliação da toxicidade *in vitro*, sendo ainda usualmente empregados:

Exclusão do azul de tripan - avalia a integridade da membrana celular, pois células viáveis excluem este corante (Renzi et al., 1993).

Redução do MTT [brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio]- avalia a função mitocondrial através da atividade de enzimas como a succinato desidrogenase (Mosmann, 1983).

Incorporação do vermelho neutro (cloridrato de 2-amino-3-metil-7-dimetil-amino fenanzina) - analisa a função lisossomal (Renzi et al., 1993).

Conteúdo de ácidos nucléicos e proteína - fornecem uma estimativa do número de células (Cingi et al., 1991).

Atividade da fosfatase total - dá indicação do metabolismo celular em relação ao metabolismo do fosfato (Aoyama et al., 2000).

1.4.2. Estudo *in Vivo* de Flavonóides

Por um longo tempo, as ciências relacionadas à saúde humana têm concentrado esforços em potentes toxinas de plantas que podem ser ingeridas acidentalmente podendo levar a morte ou em substâncias que possuem um elevado potencial médico. Em contraste, produtos naturais, que são regularmente ingeridos em altas quantidades com componentes alimentares da dieta humana, com baixa ou insignificante toxicidade, são ignorados. Os flavonóides estão nesta categoria de compostos. Recentemente, a ingestão destes compostos de baixa toxicidade está adquirindo destaque farmacológico por acumular-se nos principais órgãos como o fígado, ou por induzir modificações no sistema imunológico. Os flavonóides estão incluídos nesta categoria de compostos investigados (Di Carlo et al., 1999; Wada et al., 1999; Alía et al., 2003; Bhatia e Jain, 2004). As razões mais importantes para a baixa toxicidade dos flavonóides são: a baixa solubilidade em água da aglicona

(flavonóide sem açúcar) e o rápido catabolismo do núcleo pirrólico no fígado. A baixa solubilidade dos flavonóides em água também se apresenta como uma grande dificuldade de aplicação destas substâncias para área médica. Entretanto, com o desenvolvimento de flavonóides semi-sintéticos, com solubilidade em água maior que os compostos naturais, como, por exemplo, flavonóides usados no tratamento de hipertensão e reposição hormonal, tem mostrado um grande avanço no estudo dos efeitos destas substâncias (Calias et al, 1996).

2. OBJETIVOS

Os flavonóides têm despertando grande interesse das ciências da saúde, nos últimos anos, devido as suas propriedades preventivas em relação a estresse oxidativo, doenças cardíacas, cânceres e outros. Já as fosfatases possuem um papel biológico importante no desenvolvimento e manutenção das atividades celulares, podendo ser também, consideradas marcadores em prognósticos de diferentes tipos de câncer estando relacionada com mecanismos de controle de proliferação celular. Este trabalho tem a finalidade de estudar o efeito de flavonóides sobre a atividade de fosfatases *in vitro* e *in vivo* por modulação química ou por oxirredução. Apesar de se conhecer algumas funções das fosfatases ácidas, como citado anteriormente, sua modulação por agentes químicos ou oxirredutores *in vivo* têm muito por ser analisado, apesar dos resultados apresentados nesta tese. Desta forma, o objetivo foi analisar o efeito de moduladores químicos, flavonóides, em diferentes estágios: diretamente sobre a atividade fosfatásica *in vitro*; a influência de flavonóides sobre a viabilidade celular usando as fosfatases como biomarcadores (comparando com métodos largamente utilizados); e o efeito de flavonóides sobre a atividade fosfatásica *in vivo*. Assim, este trabalho foi dividido em três objetivos principais:

- a) Purificação e caracterização de uma fosfatase de membrana de linfócitos (CD45), e análise *in vitro* do efeito de agentes oxidantes e flavonóides;
- b) Estudo da viabilidade celular de linfócitos humanos normais e células HL60 na presença de flavonóides utilizando as fosfatases como possíveis marcadores biológicos e avaliando, também, o efeito da fisetina na expressão e atividades das MAPKs;
- c) Estudar o efeito de flavonóides quercetina e morina, *in vivo*, sobre a atividade fosfatásica em camundongos.

Desta forma, os resultados e as discussões destas três etapas serão apresentados individualmente.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

Os linfócitos foram obtidos de sangue periférico de voluntários saudáveis que não estavam fazendo uso de medicamentos (conforme aprovação pela Comissão de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, nº 219/2000).

As células HL60 foram generosamente doadas pelo Dr. Rui Curi e Dr. Valdemir Vieira Colleone, do Instituto de Ciências Biomédicas - USP.

Os camundongos foram obtidos do CEMIB (Centro de Bioterismo da UNICAMP). Todos os experimentos realizados encontravam-se de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal, do Instituto de Biologia da UNICAMP (Protocolo nº 578-1).

Os flavonóides, substratos, resinas cromatográficas, marcadores de massa molecular e outros compostos específicos foram obtidos da Sigma Chemical Company e Amersham Biosciences (GE Health Care).

3.2. Métodos

3.2.1. Purificação e Caracterização Cinética das Fosfatases de Linfócitos Humanos Normais

a) Obtenção dos linfócitos

Os linfócitos foram obtidos por centrifugação em gradiente, utilizando-se o reagente Ficoll-PaqueTM Plus (Amersham Biosciences).

b) Obtenção das fosfatases totais de linfócitos

Os linfócitos obtidos pela centrifugação em gradiente foram ressuspensos em tampão Tris-HCl 50mM (pH 7,4) contendo 0,5% (v/v) de ditioneitol (DTT), 0,25mM de EDTA, 0,25mM de EGTA e 150mM de NaCl (Tampão A). Os linfócitos (mantidos a 0°C) foram sonicados com 6 pulsos de 30s de duração para ruptura da membrana, em equipamento da Sonics e Materials Inc., modelo VC50, com frequência de 20kHz e potência de 50W. O lisado foi centrifugado a 1.000 x g por 10 min, a 4°C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante coletado foi centrifugado a 9.000 x g por 10 min, a 4°C. O sobrenadante resultante foi utilizado para determinação das fosfatases presentes em linfócitos.

c) Determinação da atividade fosfatásica ácida

A atividade enzimática foi determinada através da formação do p-nitrofenol, utilizando-se o p-nitrofenil fosfato (p-NPP) como substrato. Para um volume final de 1,0 ml, a reação foi iniciada pela adição do extrato de linfócitos que continha as fosfatases a um meio contendo 100 mM de tampão acetato de sódio (pH 5,0) e 5,0 mM de p-NPP. A paralisação da reação ocorreu pela adição de 1,0 ml de NaOH 1,0 M, após incubação por 40 min à 37°C. A formação do p-nitrofenol foi determinada espectrofotometricamente pela leitura da absorbância à 405 nm, tomando-se o valor de 18.000 M⁻¹ cm⁻¹ como coeficiente de extinção molar do p-nitrofenóxido (Chaimovich e Nome, 1970).

Na presença de flavonóides e aminoácidos fosforilados (Tyr-P, Ser-P e Thr-P) a atividade enzimática foi determinada através da quantificação do fosfato inorgânico durante a hidrólise do substrato (p-NPP), como descrito por Lowry e Lopez (1946). Para um volume final de 1,0 mL, a reação foi iniciada pela adição da enzima a um meio contendo tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0 e de p-NPP 5,0 mM. A paralisação ocorreu pela adição de 1,0 mL de molibdato de amônio 3% (em acetato de sódio 200 mM, pH 4,0). A coloração foi desenvolvida pela adição de 0,1mL de ácido ascórbico 1% (em acetato de sódio 200 mM, pH 4,0). Nos controles, a enzima foi adicionada após a

paralisação com molibdato de amônio 3% em todos os ensaios. Após 30 minutos à temperatura ambiente, mediu-se a absorbância a 700 nm. O coeficiente de extinção molar do azul de molibdênio é $4.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

d) Efeito de inibidores na atividade das fosfatases de linfócitos

A atividade enzimática foi determinada, utilizando-se pNPP ou aminoácidos fosforilados como substrato, de acordo com o método descrito acima. Foram analisados como inibidores: fluoreto, tartarato e p-cloromercuribenzoato (pCMB).

A atividade de fosfatase total é medida na ausência de inibidores. Na presença de fluoreto, toda a fosfatase ácida lisossomal é inibida; a atividade residual observada é devida à fosfatase ácida de baixa Mr. Na presença de tartarato e pCMB, a atividade residual é devida à fosfatase ácida tartarato-resistente.

e) Determinação dos parâmetros cinéticos (K_m , K_{cat} , K_{cat}/K_m)

Os parâmetros cinéticos, K_m e V_{max} , foram determinados através do ajuste da curva ($V \times [S]$) utilizando o modelo da hipérbole retangular. A constante catalítica, K_{cat} , foi obtida pela razão entre a V_{max} e a concentração molar da enzima utilizada nos experimentos.

Os parâmetros cinéticos também foram determinados na presença do aminoácido fosforilado Tyr-P como substrato.

f) Determinação do efeito do pH

A atividade enzimática foi determinada como descrito acima, utilizando-se tampões na concentração final de 0,1 M, nos seguintes valores de pH: 2,5 e 9,0 (glicina); 3,0 (citrato); 3,5 - 5,5 (acetato); 6,0 - 7,0 (bis-tris); 8,0 (hepes).

g) Obtenção de Fosfatase de Membrana de Linfócitos

O sobrenadante resultante do item 3.2.1 (b) foi submetido a ultracentrifugação de $100.000 \times g$ por 1 hora. O sobrenadante foi armazenado para análise das fosfatases

citossólicas e o precipitado foi ressuspenso no Tampão A, sendo submetido a ultra centrifugação de 100.000 x g por 1 hora. O sobrenadante foi descartado e o precipitado formado foi ressuspenso em tampão A contendo Triton X-100 0,5% (v/v) para solubilização das proteínas de membranas. Para auxiliar este processo após ressuspensão da membrana, o material foi sonificado, no mesmo equipamento citado anteriormente, com 4 pulsos de 30s de duração. Em seguida foram realizadas dosagens de proteína, pelo método de Bradford (1976), e de atividade enzimática.

h) Cromatografia de Troca Iônica (DEAE-Sephadex)

As proteínas extraídas da membrana de linfócitos com o Tampão A e Triton X-100 (0,5%) foram submetidas à cromatografia de troca iônica (DEAE-sephadex), com fluxo de 2,0 mL/ min. As proteínas que aderiram à resina foram eluídas com o mesmo tampão A (com Triton X-100) contendo 1,0 M de NaCl. A eluição foi acompanhada com dosagem da atividade enzimática e com eletroforese SDS-PAGE.

i) Cromatografia de Exclusão por Massa Molecular (Sephacryl-S200)

As frações que apresentaram atividade enzimática após a eluição da cromatografia de troca iônica foram reunidas e concentradas em sistema de filtração centrífuga Ultrafree-15 de membrana Biomax-PB, em polietersulfona (Millipore) a 2.000 x g. Após a concentração, o pool contendo fosfatase de membrana foi submetido à cromatografia de exclusão (Sephacryl-S200), com fluxo de 0,5 mL/min. A eluição foi acompanhada por dosagem da atividade fosfatásica e eletroforese SDS-PAGE.

j) Estudos eletroforéticos em condições não desnaturantes, em pH 8,3

A mobilidade eletroforética, em condições não desnaturantes, foi determinada por eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, de acordo com a técnica de Weber e Osborne (1969).

Os géis de corrida (10%) e de empacotamento (5%) foram preparados em tampão Tris-HCl 0,3M (pH 8,8 e 6,8 respectivamente) e colocados para

polimerizar em placas de (7,0 x 10,0 cm). Os dois compartimentos da cuba foram preenchidos com o tampão de corrida (0,2M de glicina e 25 mM de Tris pH 8,3). As amostras para a corrida, sendo 25,0 µg da amostra para coloração da atividade e 25,0 µg da amostra para as colorações de proteína, foram preparadas tomando-se 1 volume de cada amostra e 1 volume do tampão da amostra (10% de glicerol, 0,08% do tampão Tris-HCl 1M, pH 6,8 e 2 gotas do azul de bromofenol 0,2%). Realizou-se uma pré-corrida de 2h utilizando o mesmo tampão de corrida em uma corrente de 60 mA e, em seguida, correu-se a amostra por 5h, sob refrigeração. O azul de bromofenol foi utilizado como marcador da corrida. Após o término da corrida os géis foram corados para atividade fosfatásica e proteína.

k) Coloração para detecção de proteína

A coloração dos géis foi realizada durante 12h com uma solução contendo 500 mg de "Coomassie Brilliant Blue" em uma mistura de 400 mL de metanol, 100 mL de ácido acético glacial e 500 mL de H₂O. A descoloração foi obtida após lavagens sucessivas em uma solução contendo 100 mL de ácido acético glacial, 400 mL de metanol e 500 mL de água deionizada. Logo após, os géis foram armazenados em ácido acético 7%.

l) Coloração para detecção da atividade enzimática

A atividade enzimática foi demonstrada no gel, de acordo com a técnica de Gomes (1978). Após a corrida o gel foi incubado a 37°C em tampão Bis-Tris 100 mM, pH 6,0, contendo 50 mM de β-naftil fosfato e 1 mg de fast blue BB/mL, até o aparecimento da coloração. Esta variou conforme a quantidade de enzima utilizada na corrida. Logo após a coloração, o gel foi descorado por lavagens em solução contendo 80 mL de ácido acético e 250 mL de etanol por litro de solução e mantido em ácido acético 7%.

m) Eletroforese SDS-PAGE em condições desnaturantes

A mobilidade eletroforética em condição desnaturante foi determinada por eletroforese em gel de poliacrilamida, cuja concentração foi de 5% de acrilamida e 10% de bis-acrilamida. A solução de acrilamida foi preparada em tampão Tris-HCl 0,3 M (pH 8,8) contendo 0,1% de SDS e polimerizada em placas de vidro de 12,0 X 8,0 cm. O tampão de corrida foi constituído de 0,2 M de glicina, 25 mM de Tris (pH 8,3) e 0,1% de SDS. As amostras para corrida, 25 µg de proteína total, foram preparadas por diluição 1:1 em tampão apropriado (10% de glicerol, 4% de SDS, 0,08% de tampão Tris-HCl 1 M, pH 6,8 e 2 gotas de azul de bromofenol 0,2%). A coloração e a descoloração dos géis foram realizadas como descrito no item 3.2.1 (k).

3.2.2. Estudos de Citotoxicidade com HL60 e Linfócitos humanos Normais

a) Cultura de células da leucemia mielóide humana

As células HL60 foram mantidas em cultura contínua, através de repiques periódicos (72 horas), quando atingiram uma densidade de 1×10^6 células/mL. O cultivo foi realizado em meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) contendo glutamina 0,2 g/L, antibióticos (100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL estreptomicina) e suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado. A incubação foi feita em estufa a 37°C sob atmosfera úmida e contendo 5% de CO₂.

b) Avaliação da Viabilidade Celular

As células HL60 foram cultivadas em placas de 24 cavidades ($3,0 \times 10^5$ células/mL), incubadas a 37°C sob atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Setenta e duas horas após o plaqueamento, parte do meio foi cuidadosamente retirado e as células tratadas com diferentes concentrações de 0 a 200µM de flavonóides (catequina, fisetina, morina, quercetina, rutina e taxifolina) durante 24 horas a 37°C. Em seguida, foram realizados os estudos de viabilidade: redução do MTT, dosagem de proteínas e atividade

fosfatásica.

c) Redução do MTT

O meio foi removido e trocado por outro sem soro contendo MTT (0,5 mg/mL), e as células incubadas durante 3 a 4 h (37°C), tempo necessário para a redução do corante. O meio foi retirado cuidadosamente e o formazan produzido foi dissolvido em 1 mL de etanol. As placas foram agitadas por 5 minutos e a absorbância correspondente a cada poço foi lida no espectrofotômetro a 570 nm (Mosmann, 1983; Denizot e Lang, 1986).

d) Dosagem da Atividade Fosfatásica Ácida

O meio de cultura foi retirado cuidadosamente de cada poço e então, adicionado o tampão acetato 1 mM pH 5,5 para que houvesse a lise celular, com conseqüente obtenção da enzima no extrato celular. A atividade enzimática foi determinada utilizando-se pNPP como substrato, incubando-se por 30 min a 37°C, como descrito no item 3.2.1 (c) (Aoyama et al., 2000).

e) Dosagem de Proteína

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry, como descrito por Hartree (1972).

f) Exclusão do Azul de Tripán

As células (3×10^5 células/mL) foram mantidas em cultura contínua por 72 horas quando atingiram uma densidade de 1×10^6 células/mL. Após este período de tempo a viabilidade celular foi avaliada pelo teste de exclusão do azul de tripan (Morita et al., 1992). As células foram coletadas, para contagem em microscópio óptico, e adicionou-se o corante azul de tripan. As células viáveis não permitem a entrada deste corante formando um anel azul ao redor da membrana celular. As células não viáveis

permitem a entrada do corante, apresentando o corante em todo seu interior.

g) Cultura primária de linfócitos

g.1) Isolamento de células mononucleares do sangue total

O sangue total coletado foi homogeneizado por inversão e diluído com meio de cultura não suplementado RPMI, na proporção de 1:1. O sangue diluído (11mL) foi colocado em tubos de centrífuga contendo 3 mL de Ficoll-paqueTM Plus[®] e centrifugado por 30 minutos a 1500 rpm. Em seguida, a nuvem linfocitária foi retirada com pipeta Pasteur e lavada duas vezes com meio de cultura RPMI não suplementado para remoção de plaquetas. Em seguida, os linfócitos foram utilizados para cultura de células.

g.2) Cultura de Linfócitos

Das células obtidas, como descrito anteriormente, 90% são células mononucleares. Os linfócitos foram plaqueados numa densidade de $1,0 \times 10^6$ células/ mL em placas de 24 poços e mantidos em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, antibióticos 100 µg/mL (estreptomicina e penicilina e fitohemaglutinina 5µg/mL (mitógeno). Os linfócitos foram incubados em estufa (Forma Scientifica[®]) a 37°C com 5% de CO₂ durante 48 horas ou nos tempos indicados. Após o período de incubação, o meio foi removido e adicionado um novo meio de cultura RPMI com diferentes flavonóides (catequina, fisetina, morina, quercetina e taxifolina) e incubados por 24 horas nas condições citadas anteriormente. Após o tratamento das células, foram utilizados como parâmetros de viabilidade celular: atividade fosfatásica total, conteúdo total de proteínas e redução de MTT.

g.4) Western Blotting

As células (3×10^7) foram lisadas com 200 µl de tampão de lise [Tris-HCl 50 mM (pH 7.4), Tween 20 (1%), deoxicolato de sódio 0,25%, NaCl 150 mM, EGTA 1 mM, O-Vanadato 1 mM, NaF 1 mM e inibidores de proteases (aprotinina 1 µg/ml, leupeptina

10 µg/ml e PMSF 1 mM) e deixadas em banho de gelo por 2h. Em seguida, o extrato foi clarificado por centrifugação a 14.000 rpm por 5 minutos e a concentração de proteína determinada pelo método de Lowry. O precipitado foi descartado e ao sobrenadante foi adicionado tampão de amostra na proporção de 1:1 [Tris-HCl 100 mM (pH 6,8), DTT 200 mM, SDS 4%, azul de bromofenol 0.1 % e glicerol 20%]. As amostras foram fervidas por 5 min e aplicadas em gel de poliacrilamida (12%) contendo SDS (SDS-PAGE). Após a corrida, realizou-se a transferência para membranas de PDVF. As membranas foram bloqueadas com leite (2%) ou com BSA (3%) preparado em tampão Tris contendo Tween 20 (0,05%) - TBST e incubadas “overnight” com os anticorpos primários diluídos 1:1000. Em seguida, as membranas foram lavadas com TBST e incubadas com anticorpos secundários (1:2000) por 1h. Após lavagem das membranas com TBS, as bandas foram detectadas por quimiluminescência (ECL).

3.2.3. Efeito de Flavonóides, *in Vivo*, sobre a Atividade de Fosfatases

a) Experimentação Animal

Os camundongos albinos machos da linhagem Swiss, com idade de 8 semanas, com peso variando entre 25 e 35 gramas foram submetidos a ciclos claro/escuro de 12 horas, com água e alimentação *ad libitum*, temperatura ambiente monitorada entre 22°C, alojados coletivamente (5 animais por gaiola) e aclimatados ao local de experimentação por pelo menos 7 dias. Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos: grupo controle de solução oleosa (óleo de milho), grupo de quercetina, e grupo de morina. Foi administrado a cada animal dos grupos quercetina e morina 300mg de flavonóides/kg de animal, para que a concentração final administrada fosse de 100µM. Para os animais dos grupos controles, foi administrada a mesma quantidade em volume de óleo de milho que correspondesse à quantidade de flavonóides ministrada aos outros grupos. A administração foi realizada subcutaneamente na região lombar de cada animal, com um volume máximo de solução de 0,1 mL. Após 24 horas à administração, cada animal foi sacrificado por deslocamento cervical e foram coletados os fígados, rins e o sangue para a

extração do plasma.

b) Tratamento dos órgãos

Os órgãos (fígado e rins), após extraídos, foram pesados e colocados em solução tampão acetato de sódio 0,1 M gelado (contendo 0,5% em volume de β -mercaptoetanol e 10mM de fosfato inorgânico) na proporção de 1g de órgão/4 mL de solução. Os órgãos foram triturados em um homogeneizador (Omnixer, Sorvall), seguida de centrifugação a 17.000 rpm para separação do tecido dilacerado do extrato contendo as enzimas a serem estudadas. Em seguida, o extrato enzimático foi mantido a 4°C para realização dos ensaios enzimáticos.

c) Obtenção do plasma

O sangue foi coletado em tubos Eppendorf de 2mL e diluídos em solução salina 0,9% na proporção de 1:1. Em seguida, o sangue foi centrifugado por 10 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante, constituído de plasma, foi separado e armazenado a 4°C para análise enzimática.

d) Dosagem das Fosfatases presentes nos extratos

d.1) Fosfatase Ácida Total (FAT):

Para um volume final de 1,0 mL, a reação foi iniciada pela adição do extrato a um meio de reação contendo 5mM de pNPP como substrato, determinando-se a quantidade de produto formado (pNP), após incubação por 10 minutos a 37°C, como descrito anteriormente. Nos controles o extrato foi adicionado após a colocação do NaOH (Taga e Van Etten, 1982).

d.2) Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato (TRAP)

O ensaio foi realizado como descrito acima, exceto pela adição de pCMB e tartarato. O pHMB inibe toda a atividade de fosfatase ácida de baixa Mr e o tartarato inibe

a atividade de fosfatase de alta Mr. A atividade residual corresponde à atividade da TRAP.

d.3) Fosfatase Ácida de Baixa Massa Molecular Relativa (FABMr)

O ensaio foi realizado como descrito acima, exceto pela adição de tartarato e fluoreto, que são inibidores de fosfatases de alta e média massa molecular relativa, respectivamente.

d.4) Determinação da Fosfatase Alcalina de Membrana (FAlc)

A atividade enzimática, para um volume final de 1,0 mL, foi determinada através da formação do pNP, em um meio de reação contendo glicina 25mM (pH 9,4), 2mM de MgCl₂, 1 mM de pNPP e 0,05mL da amostra, por incubação à 37°C, por 10 minutos (Ciancaglini et al., 1992).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização Cinética das Fosfatases de Linfócitos Humanos Normais e Purificação da Fosfatase de Membrana

4.1.1. Caracterização Cinética da Fosfatases Totais de Linfócitos Humanos Normais

As fosfatases totais de linfócitos foi caracterizada cineticamente sob vários aspectos: pH ótimo para catálise, afinidade pelo substrato, efeito de cátions e de potenciais inibidores. Estes estudos são necessários e fundamentais para se estudar os efeitos de qualquer composto na atividade destas enzimas. Além disto, nos ensaios de citotoxicidade, que serão mostrados a seguir, um dos parâmetros analisados foi a atividade das fosfatases totais presente nas células HL60 e linfócitos normais (Freire et al., 2003).

A Figura 4 mostra que as fosfatases presentes nos linfócitos apresentaram um pH ótimo para catálise de 6,5, além disso no pH fisiológico as mesmas ainda mantiveram expressiva atividade.

Outro parâmetro analisado foi a especificidade por substratos (Figura 5). O “pool” de fosfatases de linfócitos hidrolisou de forma significativa a tirosina fosforilada (60%), quando comparamos com a hidrólise do pNPP. Todas as fosfatases podem hidrolisar o p-nitrofenilfosfato (pNPP), um substrato sintético, portanto, a atividade enzimática quando o mesmo foi utilizado como substrato, foi considerada como sendo 100% (Tsuchiya et al., 1997; Kawada et al., 1999). Os outros aminoácidos fosforilados utilizados, serina fosfato e treonina fosfato, não foram significativamente hidrolisados. Nossos resultados estão de acordo com os relatados na literatura. Freire e colaboradores (2003) e Mustelin e colaboradores (2004) demonstraram que o principal tipo de fosfatase presente em linfócitos e também em células HL60 se tratava de proteína tirosina fosfatase.

Na análise dos principais inibidores de fosfatases e cátions que poderiam modular a ação de algumas fosfatases, observou-se que as fosfatases de linfócitos foram significativamente inibidas pelo vanadato, pCMB e Cu^{+2} (Figura 6). Esta alta inibição pelo vanadato se deve a sua analogia estrutural com o fosfato, uma vez que este inibidor é específico para classe das tirosinas fosfatases. O pCMB e o Cu^{+2} se ligam especificamente aos grupamentos $-\text{SH}$ livres no sítio ativo de enzimas, essenciais para a catálise (Laidler et al., 1982; Zhang e Dixon, 1993, Cuncic et al., 1999; Tracey, 2000). A inibição por estes compostos reforçou que a enzima presente em linfócitos é uma tirosina proteína fosfatase, enzima que contém dois resíduos de cisteína no sítio ativo. Os demais íons metálicos (Mg^{+2} , Ca^{+2} e K^{+}) não apresentaram nenhum efeito, o que demonstrou a independência destas enzimas por estes metais para sua atividade.

Um composto redutor de grupos sulfidrilas (β -mercaptoetanol) e um quelante de metais divalentes (EDTA – dado não mostrado) foram analisados e não apresentaram efeito sobre as fosfatases de linfócitos. O fluoreto inibiu somente 15% da atividade enzimática. A ausência de inibição por ácido okadáico, ausência de ativação por Mg^{+2} e Ca^{+2} , e ausência de atividade em presença de serina-fosfato e treonina-fosfato, sugerem que a principal fosfatase de linfócitos não se trata de uma proteína serina/treonina fosfatase (PP1, PP2A e PP2B).

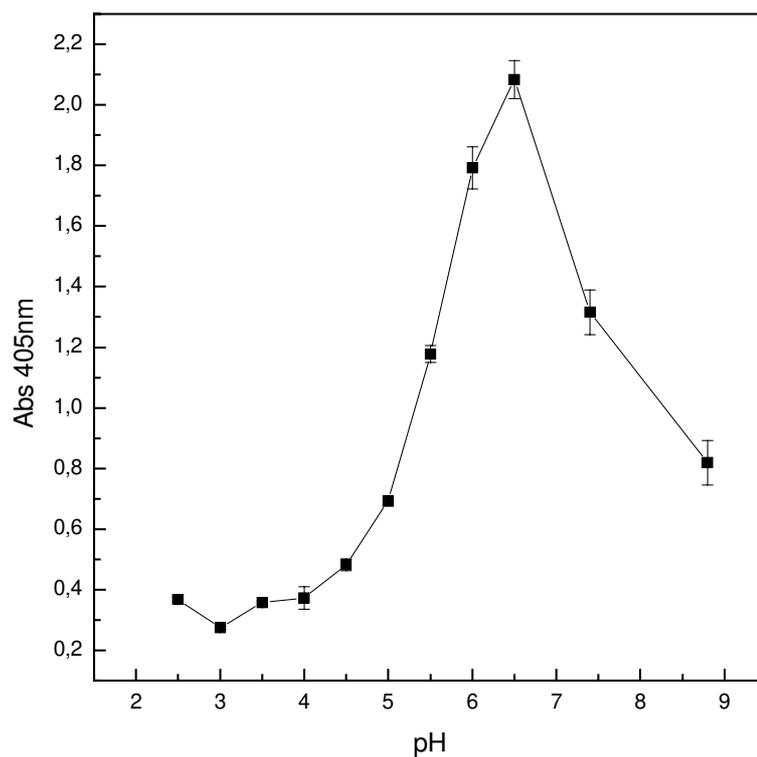


Figura 4 - Efeito do pH na atividade das fosfatases de linfócitos.

A atividade foi determinada de acordo com Materiais e métodos 3.2.1.(f). Os tampões utilizados na concentração de 0,1M foram: Glicina (pH= 2,5), Citrato (pH= 3,0 e 3,5), Acetato de sódio (pH= 4,0, 4,5, 5,0, 5,2, 5,5 e 5,7), Bis-Tris (pH= 6,0), Tris-HCl (pH= 6,8 e 8,8) e Imidazol (pH= 7,4). Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD).

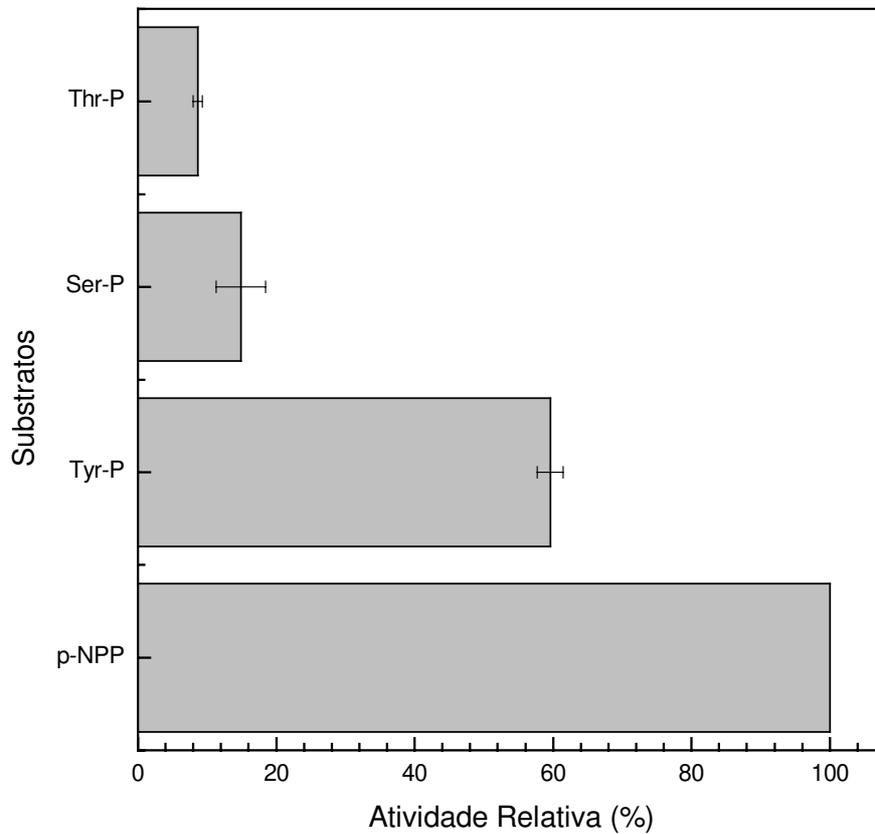


Figura 5 - Atividade das fosfatases de linfócitos sobre diferentes substratos.

Os substratos serina fosfato (Ser-P), treonina fosfato (Thr-P), e tirosina fosfato (Tyr-P) foram utilizados numa concentração final de 5mM. A atividade foi determinada como descrito em Métodos 3.2.1.(c), pelo fosfato inorgânico liberado. A atividade quando o p-NPP foi utilizado como substrato foi considerada como 100%. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD).

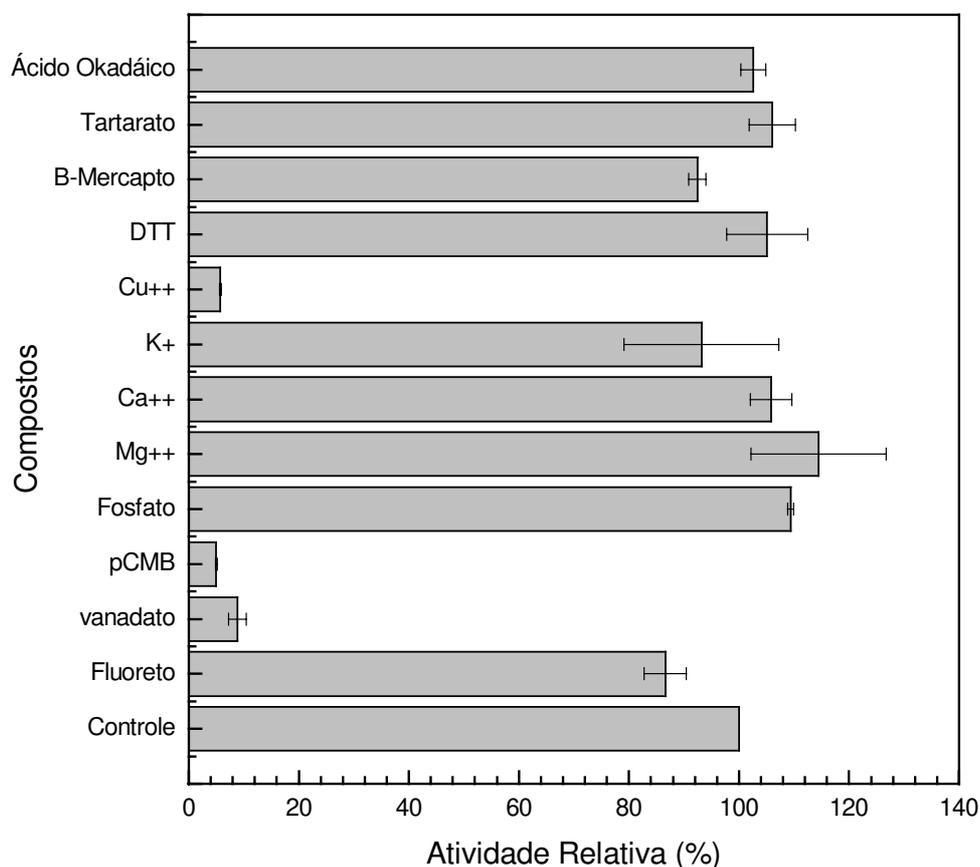


Figura 6 - Efeito de cátions e potenciais inibidores sobre a atividade das fosfatases de linfócitos.

Os cátions e inibidores foram adicionados diretamente no meio de reação concentrações de: Fluoreto= 10mM, Vanadato= 1mM, pCMB= 1mM, Fosfato inorgânico= 1mM, Mg⁺⁺= 10mM, Ca⁺⁺= 10mM, K⁺= 10mM, Cu⁺⁺= 10mM, DTT= 100mM, β-Mercaptoetanol= 100mM, Tartarato= 1mM e Ácido Okadáico= 11,9nM. A atividade da enzima foi determinada como descrito em Métodos 3.2.1.(d). A atividade na ausência de cátions e inibidores (controle) foi considerada como 100%. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD).

Os resultados discutidos até aqui indicam que a maioria das fosfatases presentes em linfócitos são PTPs. Como foi relatado na literatura há diferentes tipos e isoformas de PTPs nessas células, assim, realizamos um estudo eletroforético das proteínas totais extraídas dos linfócitos. Pode-se observar na Figura 7 que existem, pelo menos, cinco fosfatases que podem ser observadas no gel em condições nativas (Figura 7B e 7D).

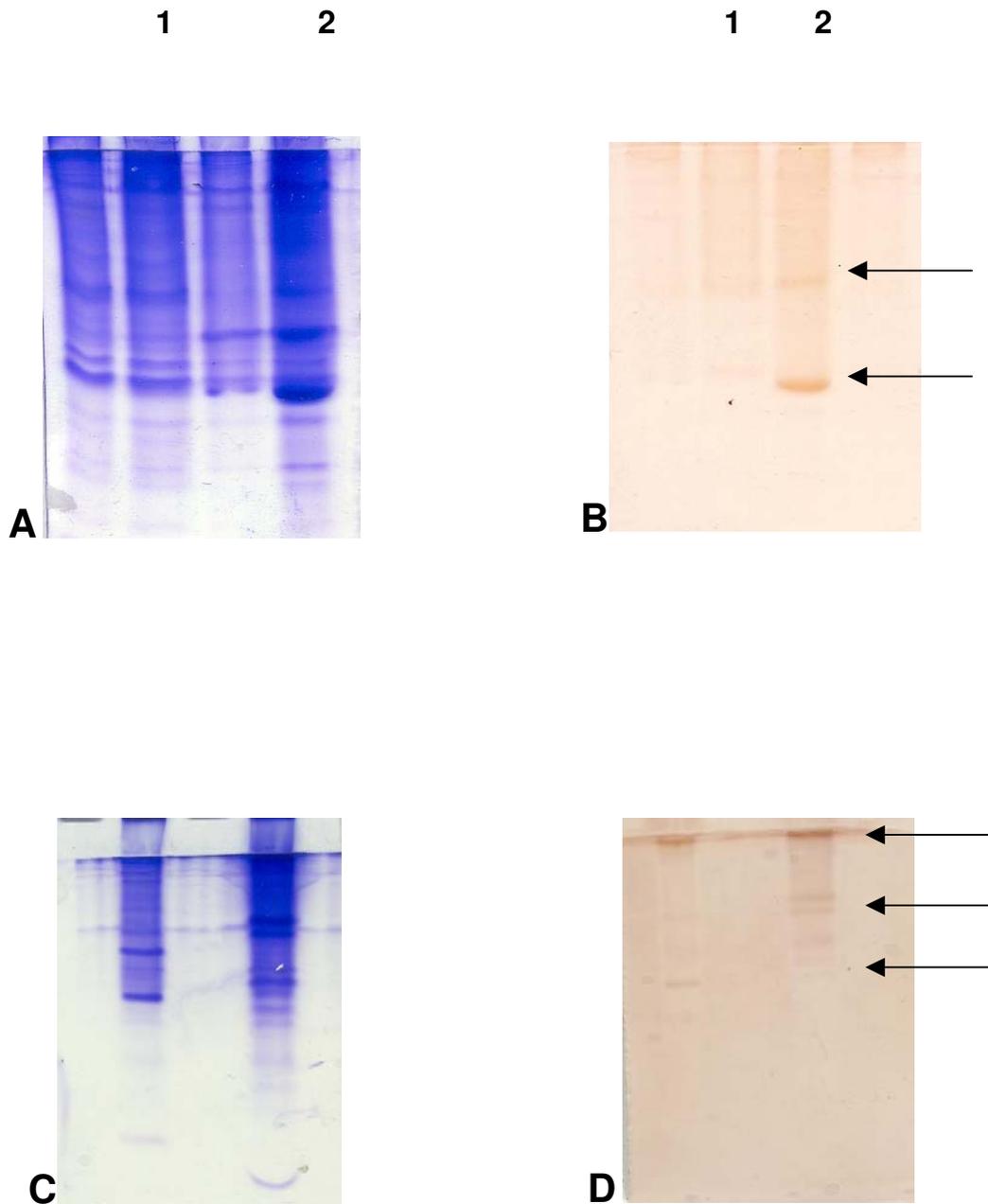


Figura 7 – Estudo eletroforético das fosfatases de linfócitos.

As condições de corrida foram descritas em Métodos 3.2.1 (j, k, l). Foram aplicados 25 μ g de proteínas. Os géis A e C representam as proteínas totais e os géis B e D foram corados para atividade fosfatásica. O número 1 representa a lise celular com solução hipotônica e o número 2 por sonicação. As setas indicam a existência de atividade fosfatásica no gel de eletroforese.

4.1.2. Caracterização Cinética da Fosfatase de Membrana de Linfócitos Humanos Normais

Vários autores têm relatado que as principais fosfatases presentes na membrana de linfócitos são as PTPs, CD45 e CD148 (Palou et al., 1997 e Sasaki et al., 2001; Mustelin et al., 2004) com as suas respectivas isoformas, sendo a mais expressa a CD45 (Huntington e Tarlinton, 2004; Cannons e Schwartzberg, 2004). A CD45 compreende 10% do total de todas as proteínas expressas na membrana e é essencial para as funções de proliferação, diferenciação e sinalização celular (Huntington e Tarlinton, 2004). CD45 é a PTP responsável pela modulação das proteínas tirosinas quinases (PTK) da famílias das Lck e Src.

A ativação do receptor de antígeno em células T (TCR) é a chave dos eventos de disparo da sinalização celular à resposta fisiológica aos antígenos de células T. A antecipação do chamado do TCR nos passos de sinalização celular, como fosforilações em tirosina, ativação de proteínas como *ras* e indução do fluxo de Ca^{+2} , são iniciados na membrana plasmática das células T. Estes processos tem sido associados à membrana plasmática, especificamente em determinadas regiões designadas como domínios de membrana (DRMs) ricos em colesterol e esfingolipídios (designados como lipídios conjugados), que são capazes de formar plataformas para a regulação e transdução de sinais do TCR da membrana plasmática. Para que ocorra a transdução de sinal durante uma sinapse imunológica os DRMs possuem a capacidade de locomoção horizontal e, conseqüentemente, aproxima a maior parte das proteínas ancoradas internamente a membrana necessárias a ativação das células T. Como as sinalizações celulares se desenvolve por processos de fosforilação realizadas pelas proteínas tirosina quinases (PTKs), como por exemplo, as famílias Lck e Src (reguladas pela ação da CD45), as proteínas tirosina fosfatases são excluídas destes complexos de membrana.

No entanto, durante a ativação de linfócitos do tipo T por antígenos mitogênicos, CD45 mostrou-se necessária para a regulação do TCR promovendo a ativação da fosfolipase C e mobilização de Ca^{+2} . Esta PTP de membrana também pode regular a

atividade das PTKs que realizam a mediação dos sinais ocorridos na membrana destas células no complexo TCR para outras moléculas envolvidas na sinalização celular durante a sinapse imunológica. Acredita-se que a PTP CD45 seja capaz de manter estas PTKs (Lck e Src) em estado de prontidão, através de desfosforilação, para participarem na transdução de sinal.

Desta forma, estudos tem sido realizados no sentido de determinar-se a localização da CD45 juntamente com as outras proteínas de membrana responsáveis pela sinalização celular. Assim, estudos foram realizados no sentido de verificar a influência dos componentes dos tampões de extração, inclusive de detergentes não iônicos como Triton X-100 e série Brij. A purificação da CD45 pode ser utilizada para verificar a ação de substâncias moduladoras e o efeito destas sem a influência dos complexos moleculares envolvidos na sinalização celular capazes de modificar a ação destas substâncias, como por exemplo, os flavonóides.

Da mesma forma que foram caracterizadas as fosfatases de linfócitos, realizamos a mesma caracterização para as fosfatases de membrana, para que assim, fossem obtidos resultados mais conclusivos (Figura 8). O efeito dos potenciais inibidores foi extremamente importante para se determinar qual a fosfatase predominante presente na membrana. As fosfatases foram inibidas na presença do vanadato 1,0mM (100%), pCMB 0,01mM (10%), tartarato 1mM (20%) e não foi inibida por fluoreto 10mM.

Os metais foram acrescentados ao meio de reação e testados para determinar o efeito sobre a enzima. Observou-se uma inibição na presença do Cu^{+2} (60%). Os demais íons metálicos (Mg^{+2} , Ca^{+2} , K^{+}) não apresentaram nenhum efeito; isto confirma a independência destas enzimas por estes metais para sua atividade.

Um composto redutor de grupos sulfidrilas (β -mercaptoetanol) e um quelante de metais divalentes (EDTA) foram analisados e não apresentaram efeito sobre a fração das enzimas de membrana.

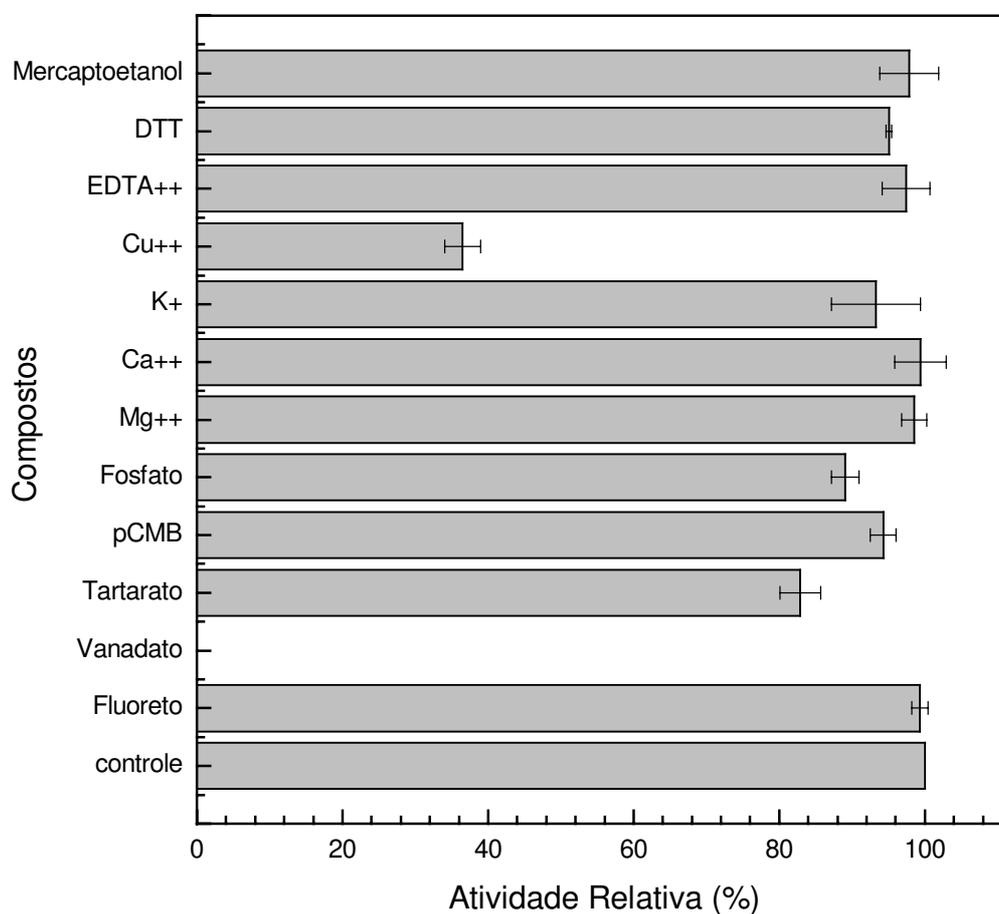


Figura 8: Efeito de potenciais inibidores sobre a atividade das fosfatases de membrana de linfócitos.

Os inibidores foram adicionados diretamente no meio de reação. As concentrações dos compostos foram de: 10mM de Mg^{+2} , Ca^{+2} , K^+ , Cu^{+2} , EDTA, DTT, Mercaptoetanol e Fluoreto; 1mM de Vanadato, Tartarato e Fosfato; 0,01mM de pCMB. A atividade foi determinada como descrita em Métodos 3.2.1.(d). A atividade na ausência de compostos foi considerada como 100%. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD).

4.1.3. Purificação da CD45 de Membrana de Linfócitos

Para a purificação da CD45 de membrana de linfócitos utilizou-se cromatografias de troca iônica (DEAE-Sepharose) e gel filtração (Sephacryl-S200) no sentido de obter-se a enzima com alto grau de pureza e homogeneidade.

O cromatograma para a troca iônica (Figura 9) mostra que as frações de 9 a 15 e 54 a 59 apresentaram atividade enzimática. Estas frações foram utilizadas em eletroforese SDS-PAGE para a verificação do grau de pureza das amostras eluídas (Figura 10). As frações de 56 a 59 apresentaram banda na faixa de 220 kDa, quando comparadas com os marcadores de alta massa molecular. Nesta faixa, a proteína fosfatase de membrana é a CD45, portanto, estas frações foram concentradas para cromatografia de exclusão molecular. Nas frações 10 e 15, as proteínas que aparecem são de massa molecular baixa (aproximadamente 18,5 kDa), que correspondem às proteínas que não se ligaram a resina DEAE ($pI < 8,0$) e foram eluídas com o tampão A (início da corrida). Pode-se observar que as frações apresentam um bom grau de pureza.

A fosfatase de membrana (frações 56 a 59) possuía uma alta concentração salina (32% de NaCl) e ainda certas proteínas de baixa massa molecular que poderiam interferir no ensaios cinéticos. Desta forma, a amostra foi aplicada a uma coluna de gel filtração (Sephadryl S200) com a finalidade de se obter um grau de pureza maior e efetuar a substituição do tampão A inicial por outro que possuísse menos interferentes químicos como altas concentrações de DTT e EDTA. Então, o tampão utilizado foi Tris-HCl 50mM (pH 8,0) contendo 0,1% de β -mercaptoetanol e 0,1% de Triton-X-100 (Figura 11). O cromatograma mostra um pico de proteína coincidente com o pico de atividade enzimática. No entanto, a amostra apresentou-se muito diluída, resultando em um SDS-PAGE pouco visível (resultado não mostrado). Observou-se que a separação por exclusão molecular não foi a técnica mais indicada, uma vez que, não houve uma nítida separação entre o pico da fosfatase e outra proteína desconhecida de massa molecular próxima. Porém, como os resultados com a DEAE-Sepharose indicaram que a amostra já apresentava um grau de pureza bastante elevado, observado através do SDS-PAGE

(Figura 10), os parâmetros cinéticos foram determinados com as amostras obtidas logo após a Sephacryl S200. Como a prioridade era classificar e avaliar o efeito de compostos sobre a atividade fosfatásica, através de parâmetros cinéticos, o grau de pureza obtido foi o suficiente para realização dos experimentos seguintes.

Para comparar com os dados iniciais de inibidores específicos para as PTP realizou-se os mesmos testes com a proteína eluída da cromatografia de exclusão molecular. A enzima foi inibida por vanadato 1 mM (95%), pervanadato 10 nM (20%), peróxido de hidrogênio 0,1 mM (85%) e pCMB 1 mM (80%) (Figura 12). A enzima não apresentou dependência por cátions divalentes e foi altamente inibida por um coquetel inibidor de PTP adquirido da Sigma. O peróxido também atua em resíduos específicos de -SH provocando a sua oxidação podendo gerar pontes de dissulfeto (-S-S-), ácido sulfênico (-SOH), ácido sulfínico (-SO₂H) e ácido sulfônico (-SO₃H) que podem ser formas irreversíveis de oxidação (Aoyama et al., 2003).

Vetter e colaboradores (2000) relataram que algumas fosfatases podiam atuar sobre um aminoácido isolado, no entanto eram incapazes de atuar sobre um resíduo de aminoácido em um peptídeo. Desta forma, optou-se por analisar o efeito dos inibidores específicos sobre a atividade enzimática utilizando-se o substrato específico para proteína tirosina fosfatase – a tirosina fosfato (Figura 13). Assim, pode-se observar que a enzima foi inibida por vanadato 1 mM (60%), pervanadato 10 nM (75%) e pCMB 1 mM (75%). Os resultados foram semelhantes aos observados quando se analisou os mesmos inibidores utilizando-se pNPP como substrato.

Após a caracterização cinética e eletroforética da proteína tirosina fosfatase, determinou-se os parâmetros cinéticos, como constante de Michaelis (K_m), velocidade máxima (V_{max}) e constante de especificidade (V_{max}/K_m), utilizando-se pNPP (Figura 14) e Tyr-P (Figura 15) como substratos.

Estes parâmetros cinéticos são mostrados na Tabela 3. Observa-se através dos resultados descritos nesta tabela que a K_m da enzima é dez vezes maior quando se utilizava Tyr-P como substrato, em comparação com pNPP, mas como a V_{max} manteve-se na mesma ordem de grandeza, a constante de especificidade (V_{max}/K_m) para Tyr-P foi

cerca de sete vezes menor que para pNPP, como substrato, indicando que a CD45 reconhecia mais eficientemente o substrato sintético pNPP.

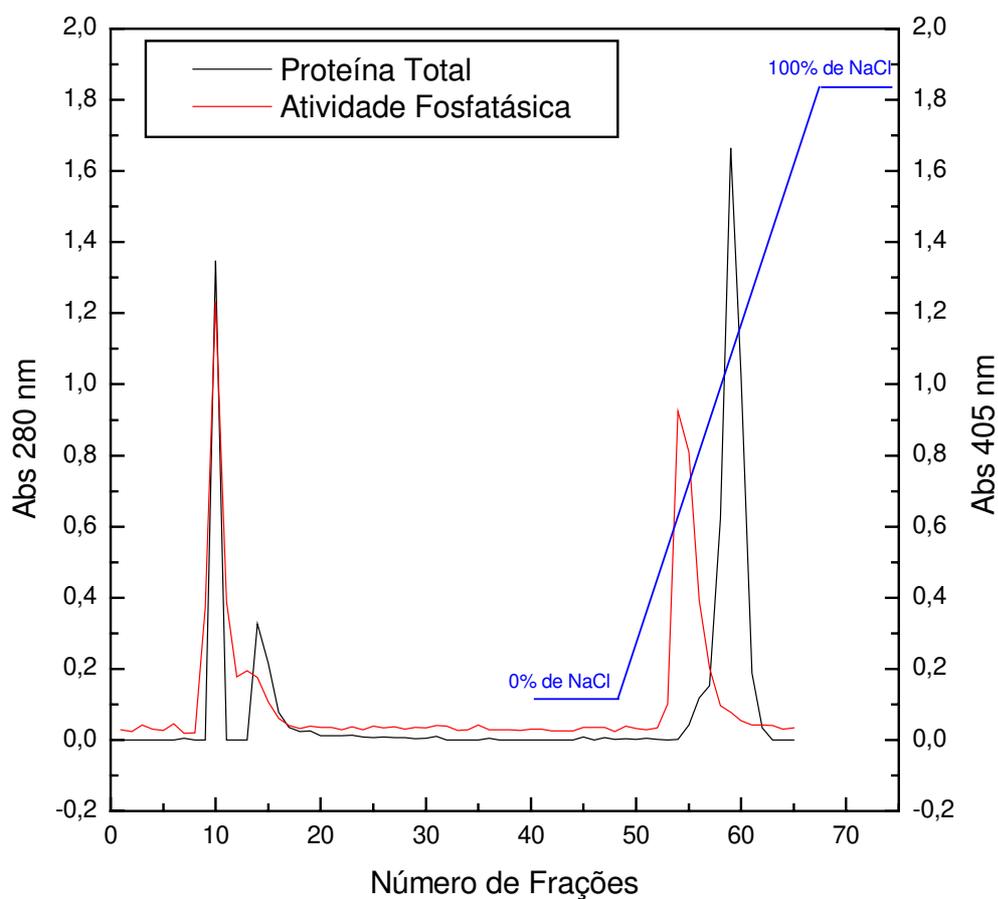


Figura 9: Cromatograma de troca Iônica (DEAE-Sepharose) da fração de membrana de linfócitos humanos.

O procedimento foi realizado conforme descrito em Métodos 3.2.1.(h). A linha em preto representa a quantidade de proteínas a 280nm e a linha em vermelho a atividade enzimática realizada conforme Métodos 3.2.1.(c).

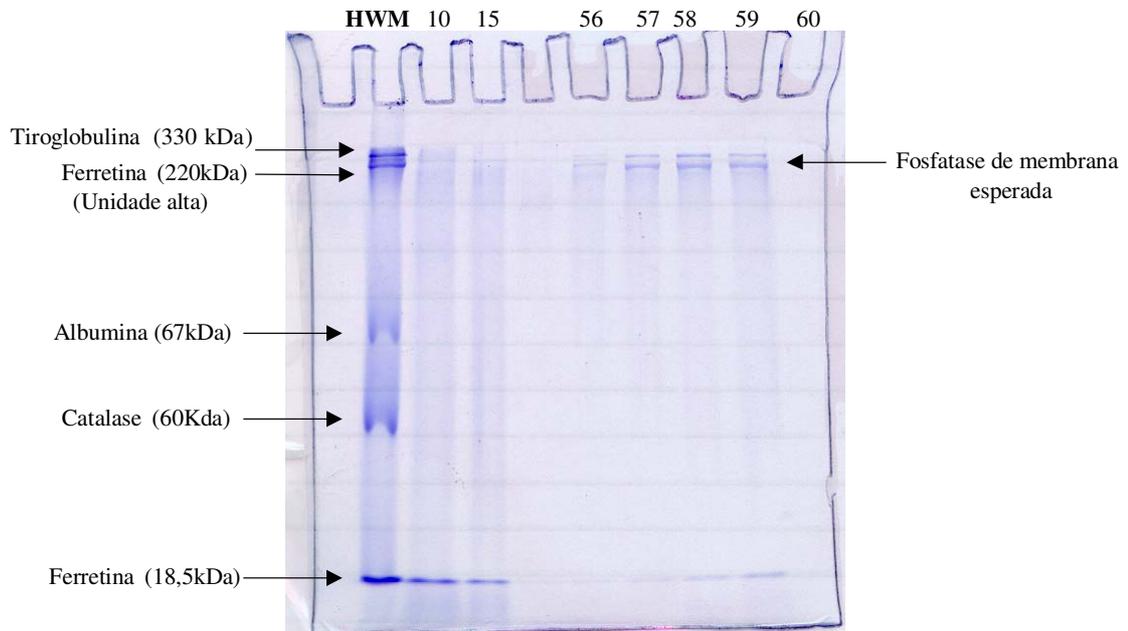


Figura 10: Eletroforese SDS-PAGE das frações que apresentaram atividade enzimática na eluição da cromatografia DEAE-Sepharose.

O procedimento foi realizado conforme descrito em Métodos 3.2.1.(m). HWM representa os marcadores de massa molecular padrão obtidos da Amersham Bioscience.

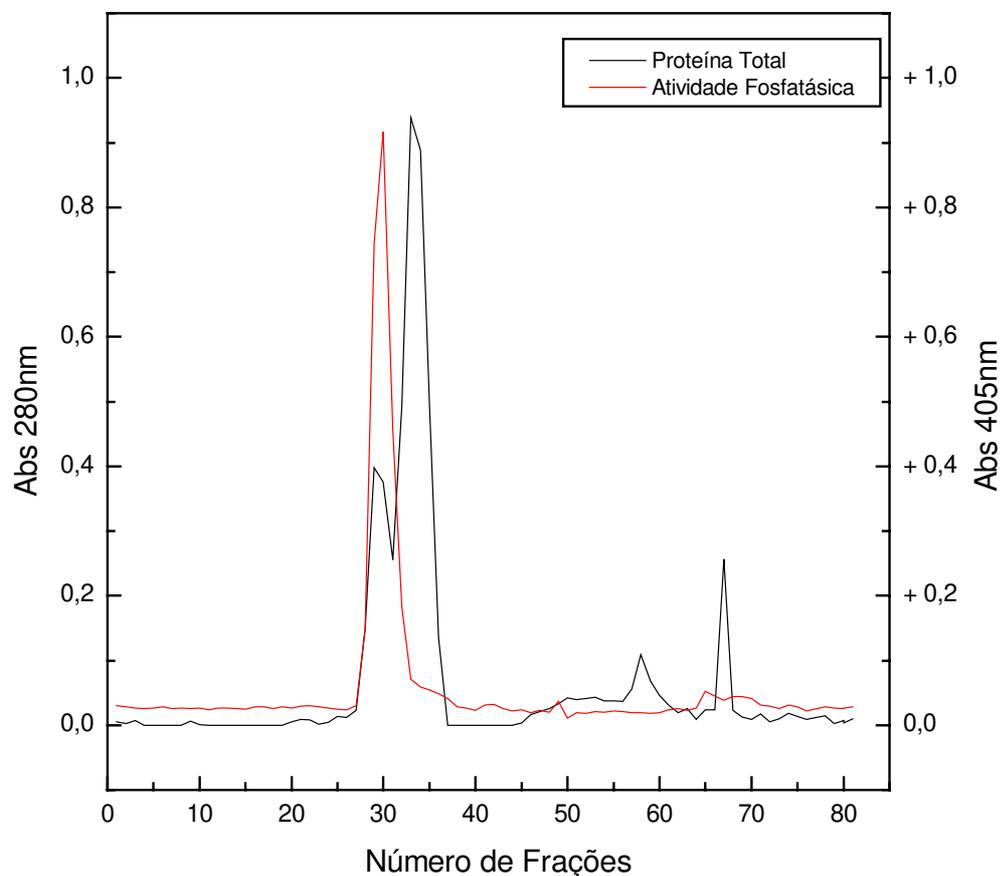


Figura 11: Cromatograma de exclusão de massa molecular (Sephacryl-S200) das frações 56 a 59 eluídas da DEAE-Sepharose.

O procedimento foi realizado conforme Métodos 3.2.1.(i). A linha em preto representa a quantidade de proteínas a 280nm e a linha em vermelho a atividade enzimática realizada conforme Métodos 3.2.1.(c).

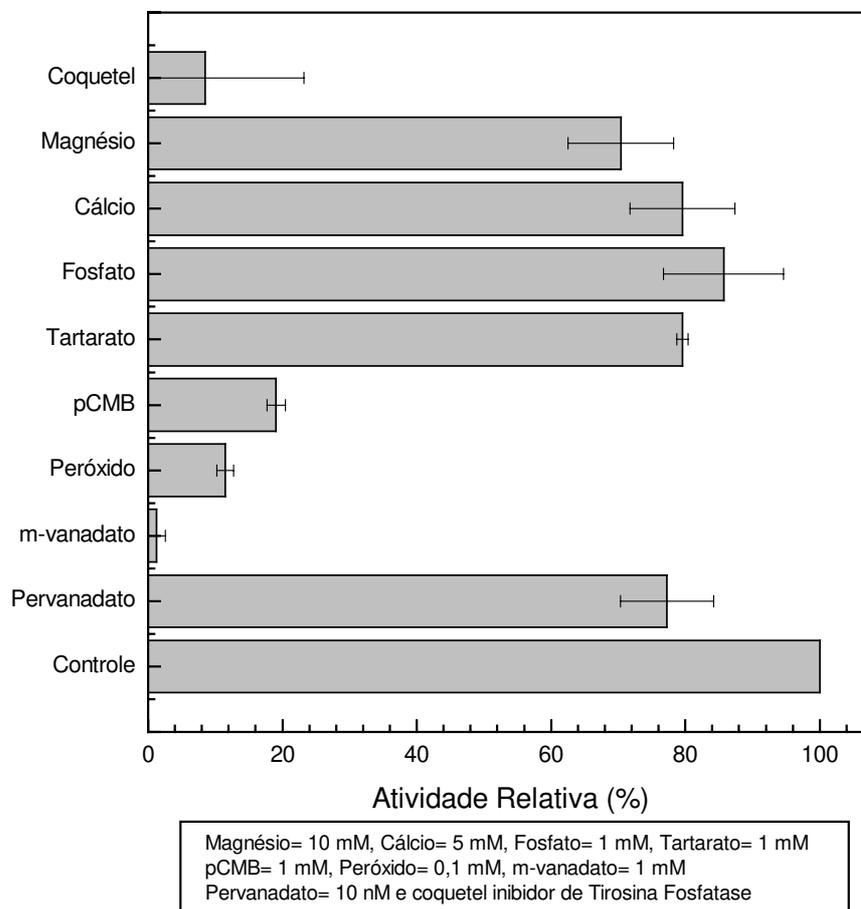


Figura 12 - Efeito de potenciais inibidores sobre a atividade da fosfatase de membrana de linfócitos utilizando pNPP como substrato

Os inibidores foram adicionados diretamente no meio de reação. A atividade foi determinada como descrita em Métodos 3.2.1.(d). A atividade na ausência de compostos foi considerada como 100%. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD).

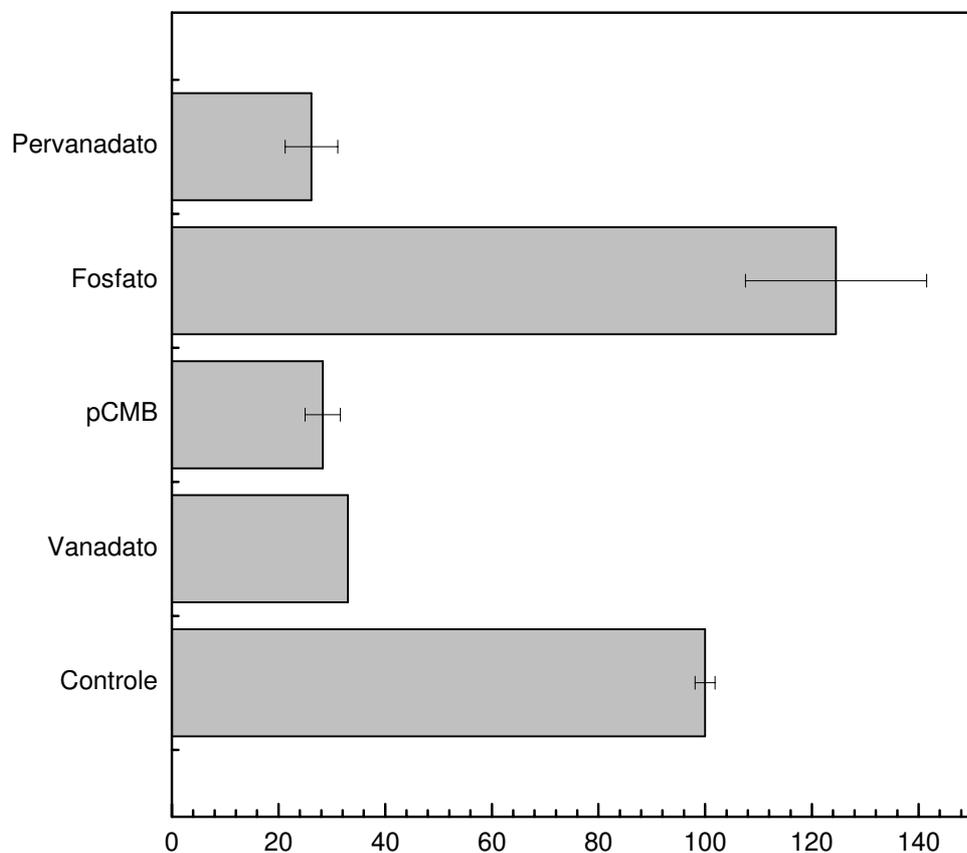


Figura 13 - Efeito de potenciais inibidores sobre a atividade da fosfatase de membrana de linfócitos utilizando Tyr-P como substrato.

Os inibidores foram adicionados diretamente no meio de reação nas concentrações de Vanadato 2mM, pCMB 1mM, Fosfato 1mM e Pervanadato 10nM. A atividade foi determinada como descrita em Métodos 3.2.1.(d). A atividade na ausência de compostos foi considerada como 100%. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD).

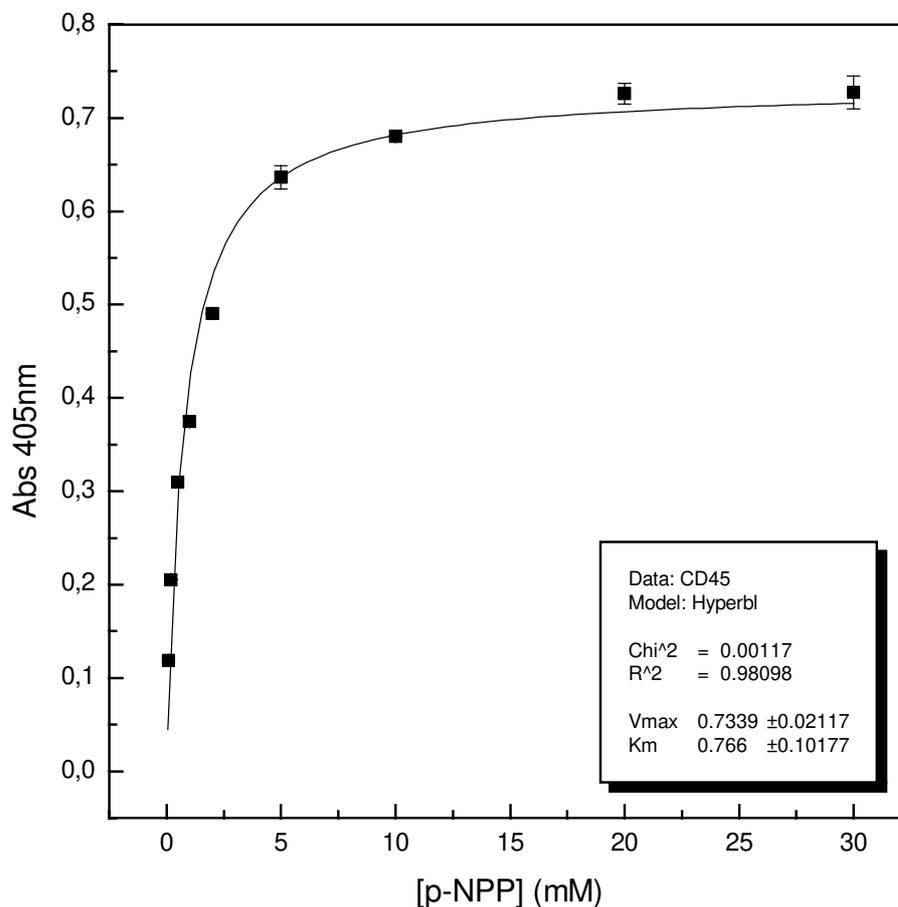


Figura 14 – Determinação dos parâmetros cinéticos Km e Vmax para CD45 utilizando pNPP como substrato.

Os parâmetros cinéticos foram obtidos por ajuste de curva hiperbólica equilátera do programa ORIGIN 6.0[®]. Utilizou-se pNPP como substrato em diferentes concentrações conforme em Métodos 3.2.1.(e). Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD).

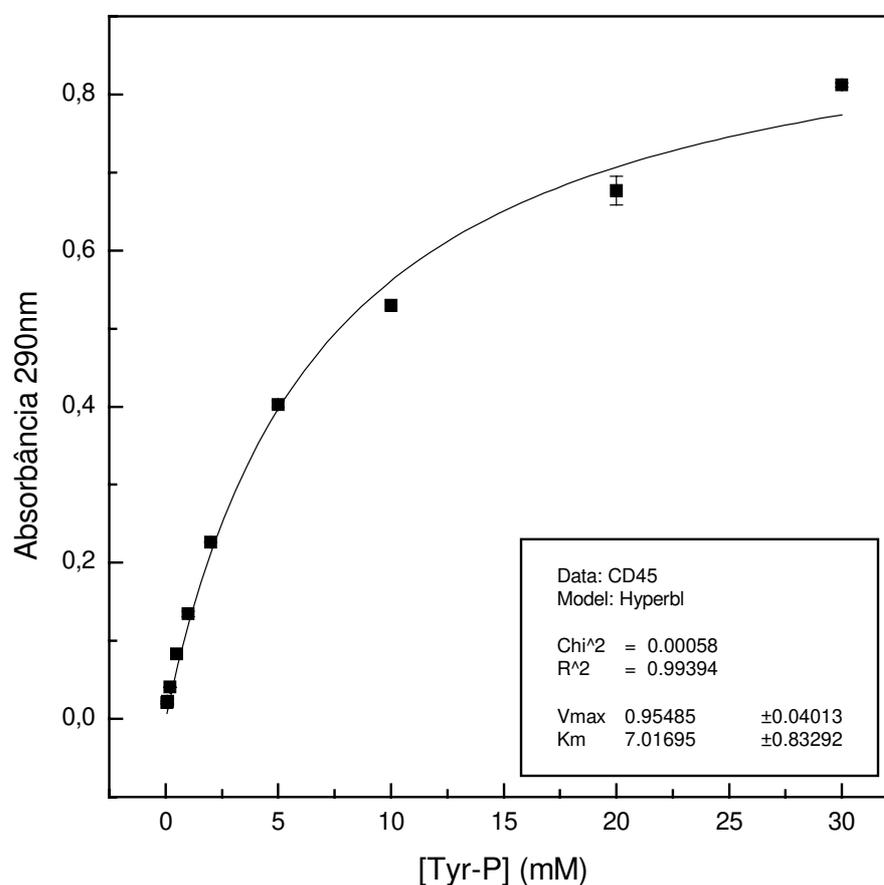


Figura 15 – Determinação dos parâmetros cinéticos Km e Vmax para CD45 utilizando Tyr-P como substrato.

Os parâmetros cinéticos foram obtidos por ajuste de curva hiperbólica equilátera do programa ORIGIN 6.0[®]. Utilizou-se Tyr-P como substrato em diferentes concentrações conforme em Métodos 3.2.1.(e). Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD).

Tabela 3: Determinação dos Parâmetros cinéticos para a Proteína Tirosina Fosfatase CD45.

Os valores de Km e Vmax foram obtidos dos gráficos de Michaelis, utilizando-se pNPP (Figura 14) e Tyr-P (Figura 15) como substratos.

Substrato	Km (mM)	Vmax (Absorbância)	Vmax/Km
pNPP	0,766	0,7339	0,95
Tyr-P	7,017	0,9548	0,13

4.1.4. Efeito Dos Flavonóides na Atividade da Fosfatase de Membrana

Quando se analisou o efeito de flavonóides sobre a atividade enzimática da CD45 (Figura 16), pôde-se observar que houve inibição por morina (30%) e ativação por fisetina (30%). Nas mesmas condições, quercetina, narigina, taxifolina, catequina, rutina e hesperitina não apresentaram efeitos significativos. Em resultados anteriores, observou-se que a morina apresentou também um efeito inibitório, para proteína tirosina fosfatase purificada de rim bovino (Miranda et al, 2005). Uma vez que, os efeitos ativador da fisetina e inibitório da morina pudessem ser dependentes de suas concentrações, determinou-se a atividade enzimática relativa (%) em diferentes concentrações destes flavonóides (Figura 17). Interessante destacar que o aumento da concentração de fisetina proporcionou um aumento significativo da atividade enzimática, sendo que a ativação máxima ocorria em 300µM (cerca de 80%) e em seguida ocorria uma queda na ativação. Já o aumento da concentração de morina mostrou um efeito inibitório, com máximo de inibição em 100µM (aproximadamente em 20%), mantendo-se praticamente constante até 400µM.

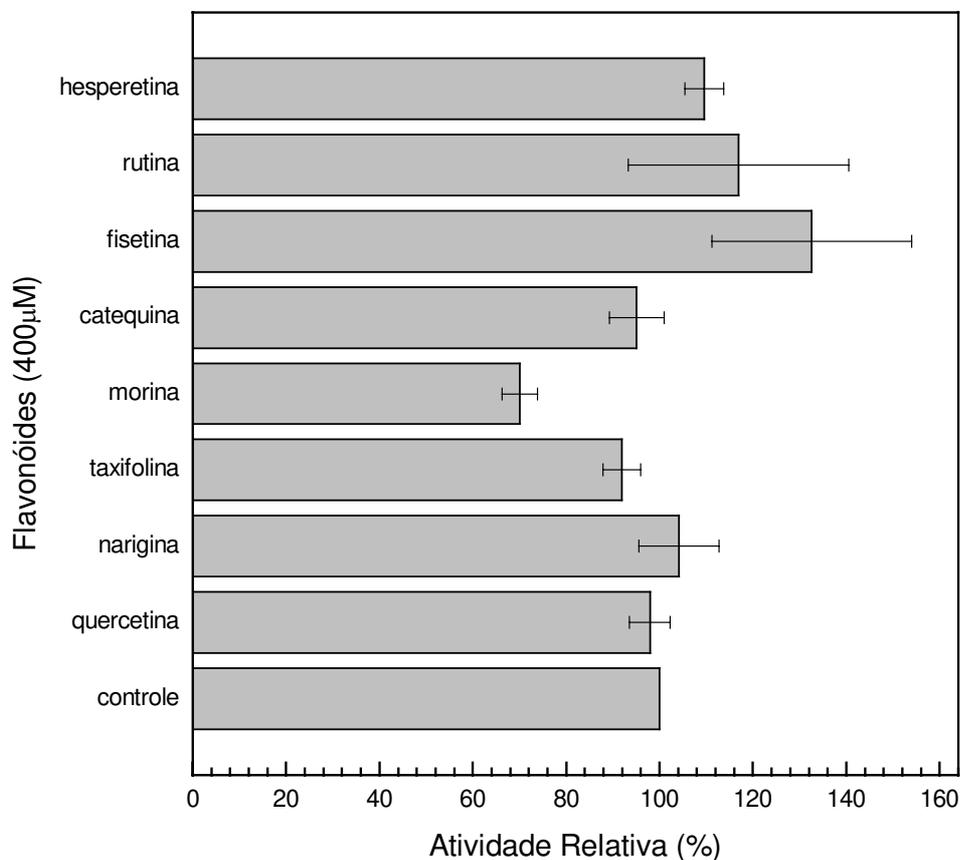


Figura 16 – Efeito dos flavonóides sobre a Atividade da Fosfatase CD45 utilizando pNPP como substrato.

Os flavonóides foram adicionados diretamente no meio de reação. A atividade foi determinada como descrita em Métodos 3.2.1.(c). A atividade na ausência de compostos foi considerada como 100%. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD).

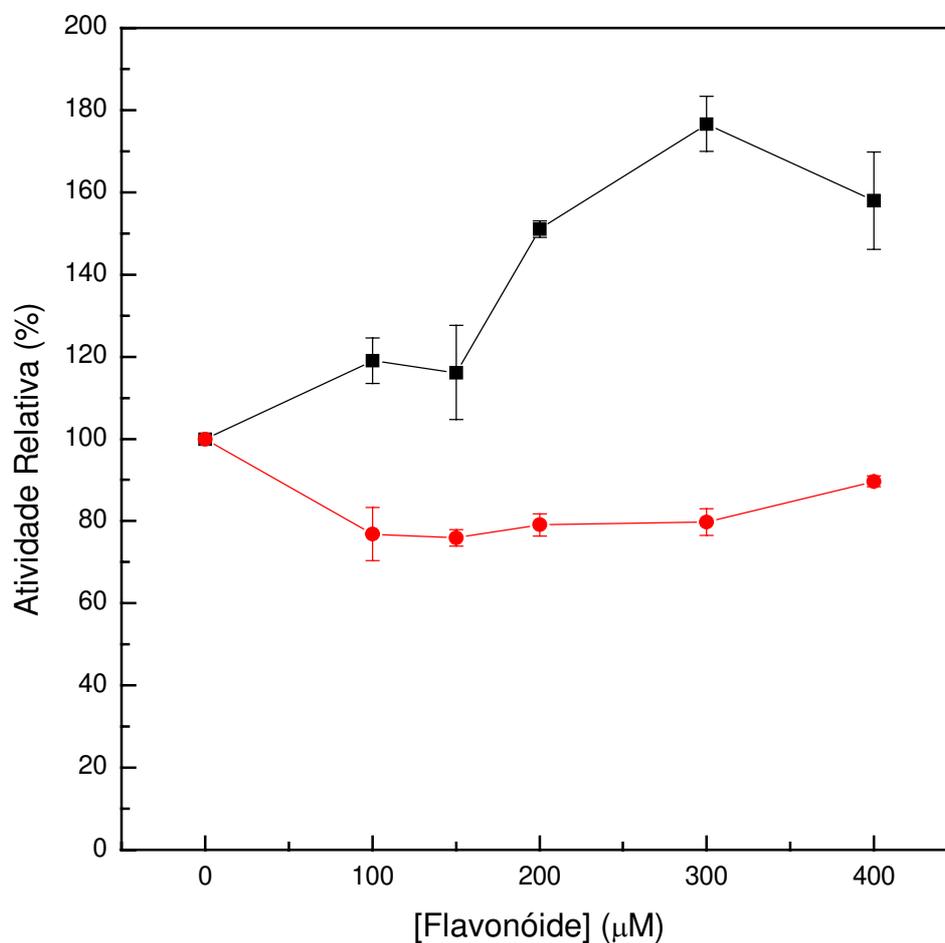


Figura 17 – Efeito da Concentração de Fisetina e Morina sobre a atividade Fosfatásica da CD45 utilizando pNPP como substrato.

A atividade enzimática foi determinada como descrito em métodos 3.2.1.(d), na ausência e em presença de diferentes concentrações de morina (●) e fisetina (■). Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD).

4.2. Estudos da citotoxicidade dos flavonóides sobre as células HL60 e Linfócitos normais

Vários compostos naturais originários de plantas (fitoquímicos) são potenciais quimiopreventivos e quimioterápicos. Como agentes terapêuticos, os fitoquímicos podem matar células cancerosas ou evitar seu crescimento promovendo a remissão do câncer em modelos animais. Alguns dos agentes quimioterápicos para câncer derivam de plantas que são usualmente utilizados em clínica, como por exemplo, paclitaxel (Taxol), vincristine (Oncovin), podophyllotoxin e captothecin (Pezutto, 1997).

Para realizar os testes do potencial biológico de fitoquímicos utilizam-se, normalmente, linhagens de células tumorais humanas ou culturas primárias como passos iniciais para a avaliação de produtos como potenciais agentes de prevenção ou tratamento para câncer (Williams et al., 2004). Um importante grupo de compostos com potente atividade antitumoral é pertencente aos flavonóides, encontrado na forma sintética ou como constituinte de alimentos e bebidas de consumo humano.

Desta forma, foram analisados os efeitos de seis flavonóides, de diferentes classes, que poderiam apresentar atividade citotóxica sobre a linhagem de células de leucemia mielocítica humana (HL60) e linfócitos humanos normais. Os resultados são mostrados nas Figuras 18, 19 e 20.

Na Figura 18 estão representados os resultados obtidos para o tratamento das células HL60 com 200 μ M de flavonóides por 24h. Estes resultados foram obtidos por contagem de células viáveis, capazes de excluir o azul de tripan. Pode-se observar que os flavonóides que apresentaram maiores efeitos foram fisetina e morina, provocando aproximadamente 90% de morte celular. Já, catequina e taxifolina induziram morte celular acima de 30%, sendo considerada significativa em relação ao controle. A rutina não apresentou efeito significativo.

Para os flavonóides utilizados na Figura 18, procurou-se obter os valores de IC₅₀ (concentração do flavonóide que promove a redução de 50%) quando foram analisados os seguintes parâmetros de viabilidade celular: quantificação de proteína total, redução do

MTT e atividade fosfatásica total. A redução do MTT avalia a função mitocondrial das células revelando uma diminuição no número de células viáveis; o decréscimo no conteúdo de proteína pode significar uma diminuição na massa celular, não podendo afirmar a ocorrência de morte ou diferenciação celular; a redução da atividade fosfatásica indica alteração no metabolismo celular em relação ao metabolismo do fosfato.

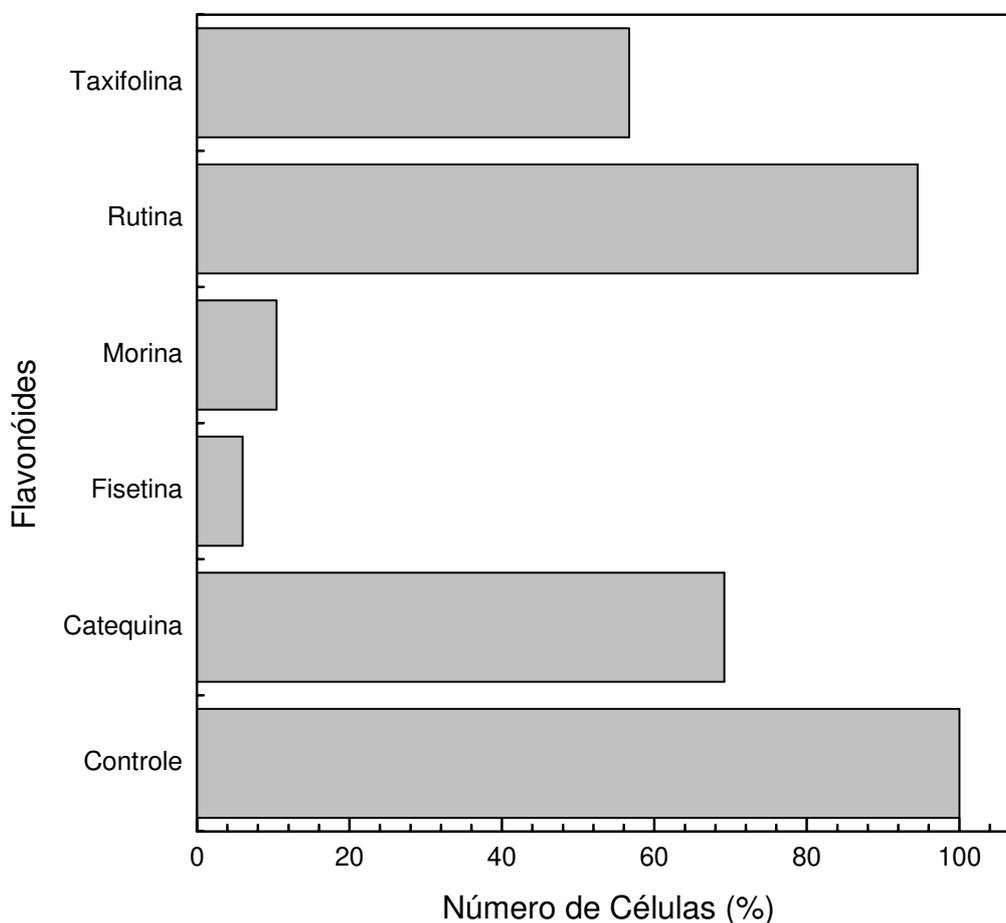


Figura 18 – Estudo da citotoxicidade dos flavonóides nas células HL60.

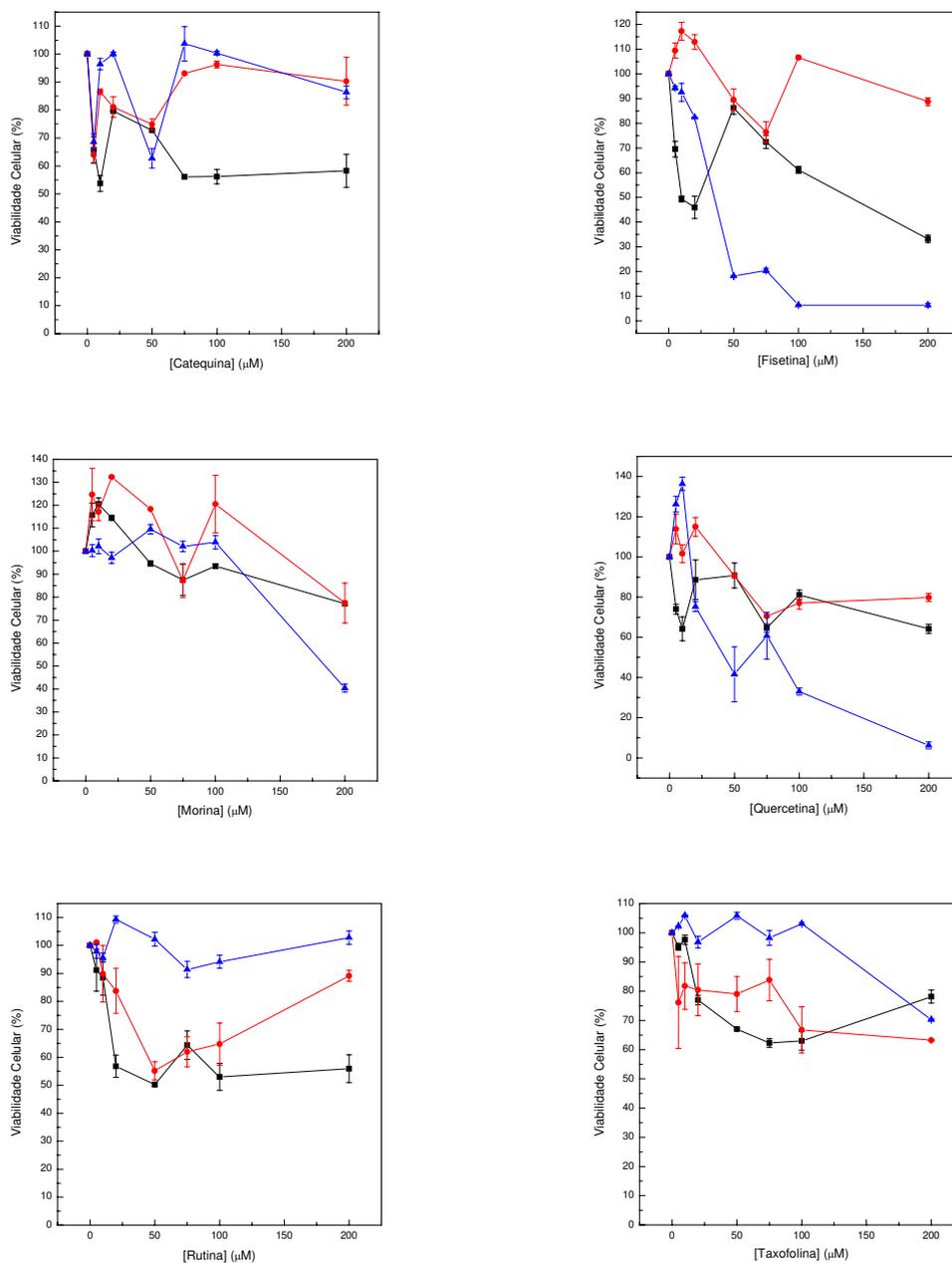
As barras mostram o efeito citotóxico provocado pelos flavonóides na concentração de 200 μM nas células HL60. O controle foi obtido na ausência destes compostos e tomado como 100%. Todos os experimentos foram realizados em placa de Petri, e a contagem de células foi realizada utilizando-se o método de exclusão por Tripan Blue.

Como observado na figura 19, a IC₅₀ para o parâmetro fosfatase ácida total foi de 50 e 150µM, para rutina e fisetina, respectivamente. Para os demais flavonóides (catequina, morina, quercetina e taxifolina) não foi possível a obtenção dos valores de IC₅₀ nas mesmas condições experimentais. Também não se obteve os valores de IC₅₀ para nenhum dos flavonóides estudados, quando foi avaliado o conteúdo total de proteína. Quanto à redução do MTT, obteve-se 45, 190 e 80µM de IC₅₀ para fisetina, morina e quercetina respectivamente. Assim, podemos verificar que, isoladamente, nenhum dos parâmetros utilizados para avaliação da viabilidade celular pode ser utilizado para confirmar o efeito citotóxico da fisetina e morina apresentados na Figura 18.

A Figura 20 mostra o efeito dos flavonóides na cultura primária de linfócitos humanos normais, tendo sido obtidos os valores de IC₅₀ para proteína total e atividade fosfatásica total apenas para fisetina, com valores de 75 e 100µM respectivamente. Para os demais flavonóides (catequina, morina, quercetina e taxifolina) não foram obtidos valores de IC₅₀ para nenhum dos parâmetros avaliados nas condições experimentais utilizadas. No entanto, para morina e taxifolina houve um aumento de 40% e 20% no conteúdo total de proteína, nas concentrações de 10 e 20µM, respectivamente. Já para quercetina, a partir da concentração de 10µM houve um aumento de 50% no conteúdo total de proteína. O aumento deste parâmetro pode indicar que esteja havendo proliferação celular, ou seja, um aumento no número total de células sem que haja uma alteração significativa dos outros parâmetros avaliados. Para o parâmetro atividade fosfatásica total observa-se um aumento da atividade de 10% e 40%, para catequina e morina, nas concentrações de 50µM e 20µM respectivamente.

Observou-se, nestes estudos de citotoxicidade, uma alta toxicidade para as células HL60 quando tratadas com fisetina e quercetina (90% de morte celular) e com morina (60%) na concentração de 200µM. Para linfócitos, a fisetina foi o único flavonóide que apresentou efeito tóxico, tendo sido possível obter a sua IC₅₀. O efeito apresentado por estes flavonóides pode ser associado com a relação estrutura-atividade do composto. Vários autores vêm discutindo a importância da estrutura do flavonóide e sua

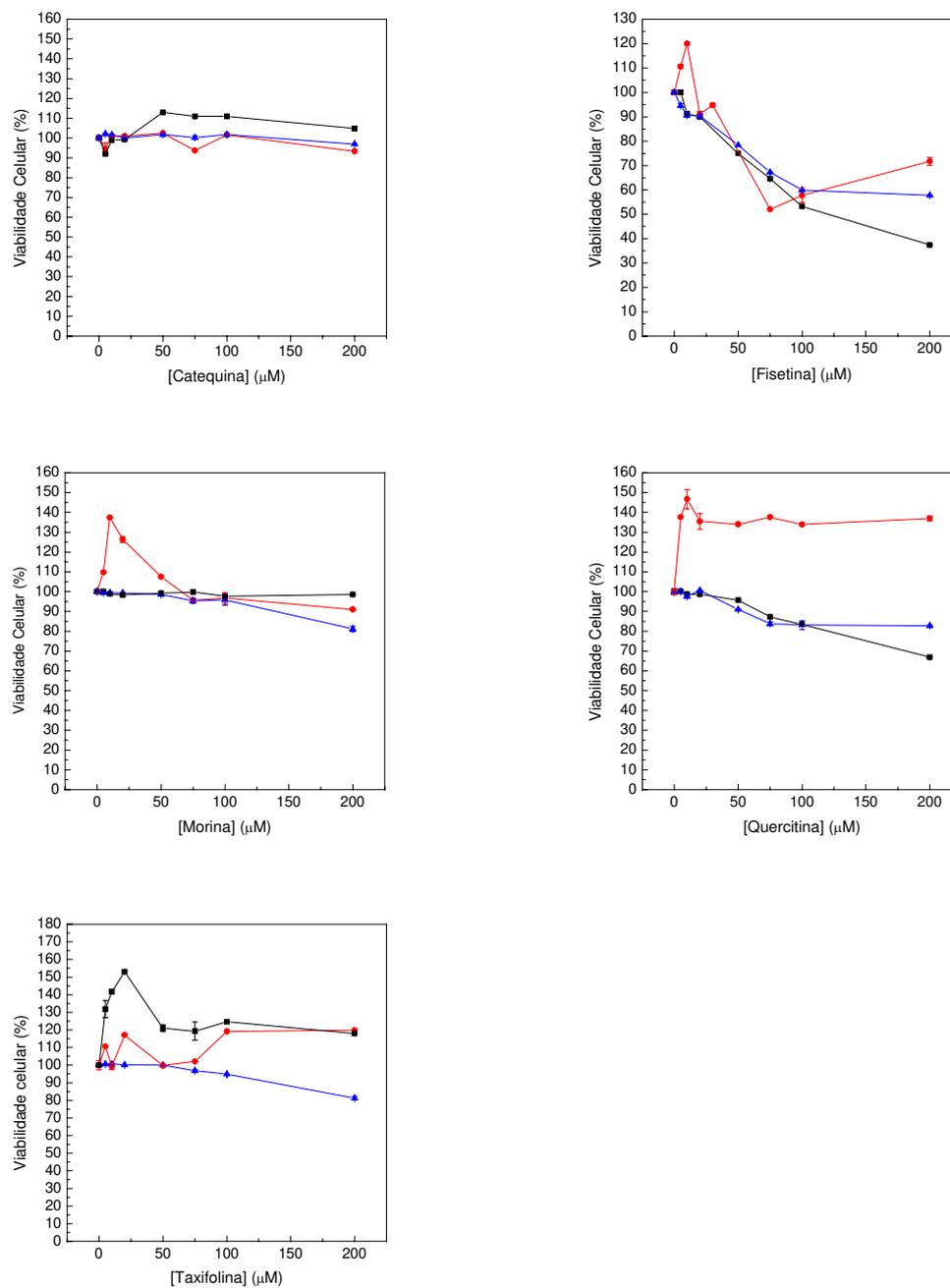
influência nos sistemas analisados. É de comum acordo que para apresentarem efeitos tóxicos os flavonóides devem ter grupos –OH ligados ao anel B (Tabela 1). Estes pontos possuem alta densidade eletrônica, propícia para interações como pontes de hidrogênio do tipo intermolecular (Ferriola et al., 1989; Williams et al., 2004) e a variação destes grupos modifica o tipo de efeito provocado.



■ Atividade Fosfatásica Total ● Proteína Total ▲ MTT

Figura 19 - Estudo da citotoxicidade de flavonóides em células HL60.

A viabilidade das células HL60 foi avaliada através dos seguintes parâmetros: dosagem da atividade fosfatásica (405 nm), quantificação de proteína (660 nm) e redução do MTT (570 nm). Ao controle, ausência de flavonóides, foi atribuído o valor 100%. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD).



■ Atividade Fosfatásica Total ● Proteína Total ▲ MTT

Figura 20 - Estudo da citotoxicidade de flavonóides em cultura primária de linfócitos normais.

A viabilidade dos linfócitos foi avaliada através dos seguintes parâmetros: dosagem da atividade fosfatásica (405 nm), quantificação de proteína (660 nm) e redução do MTT (570 nm). Ao controle, ausência de flavonóides, foi atribuído o valor 100%. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD).

Uma outra parte importante nos flavonóides, relacionada com a estrutura-atividade, está na dupla ligação nas posições 2 e 3 e um grupo –OH ligado ao carbono 3 (Tabela 1). Esta característica confere ao flavonóide a capacidade de realizar uma tautomeria do tipo ceto-enol, importante para o efeito anti ou pró-oxidante dos flavonóides. Além desse fato, esta dupla ligação na posição 2, através de deslocamentos de densidade eletrônica do anel B, poderia intensificar e potencializar o efeito do flavonóide, como a quercetina e a morina (Nikolovska-Coleska et al., 1998; Kim et al., 1999; Williams et al., 2004).

Já a glicosilação ou metilação dos grupos –OH nas posições indicadas anteriormente diminui drasticamente o efeito dos flavonóides (Murakami et al., 1999; Williams et al., 2004; Galati e O'Brien, 2004). É o caso da rutina que apresenta uma glicosilação, com uma rutinose no grupo –OH da posição 3. A substituição que ocorre nesta posição anula o efeito que a dupla ligação nos carbonos 2 e 3 poderia ter de deslocamento da densidade eletrônica, intensificando o efeito do flavonóide.

Um fato importante a ser salientado em relação aos flavonóides utilizados nos estudos de citotoxicidade com linfócitos normais e linhagem de leucemia mielocítica, é o potencial que estes compostos apresentam no tratamento de diferentes doenças inclusive o câncer, apresentados em vários artigos recentes (Williams et al., 2004; Galati e O'Brien, 2004; Walle, 2004).

Além dos estudos cinéticos, o efeito dos flavonóides sobre a atividade das proteínas tirosina fosfatases, quinases totais e sobre as MAPKs também foi determinado pela utilização de anticorpos contra proteínas fosforiladas em resíduos de tirosina e MAPKs fosforiladas (ativas). Através desse experimento o perfil da atividade de proteínas quinases também pôde ser avaliado de forma indireta.

Dos vários flavonóides analisados o único que apresentou efeito considerável foi a fisetina, que através da análise do western blotting da Figura 21 pôde-se verificar um aumento crescente na atividade da proteína quinase p38 (o anticorpo é específico para a forma ativa da p38) com o aumento da concentração da fisetina. Por outro lado, observamos uma inibição das ERKs (p42/44) e JNK (Figura 21).

Na literatura vários trabalhos relatam a atividade antiproliferativa dos flavonóides em células HL60 (Kong, et al., 2001; Allen e Tresini, 2000). Existem alguns possíveis mecanismos da ação da fisetina, como por exemplo, a inibição de proteínas tirosina quinases (como verificado para as MAPKs ERK e JNK) que são responsáveis pela regulação da proliferação celular. Outro possível mecanismo é a ativação da via de sinalização celular (como observamos a ativação da p38) que pode levar a interrupção do ciclo celular e conseqüentemente reparo ou apoptose.

A Figura 22 representa a análise por western blotting da quantidade total de proteínas fosforiladas em tirosina. Pode-se observar que há um aumento na intensidade de bandas de proteínas fosforiladas em tirosina nas concentrações utilizadas de 25, 50 e 100 μ M de fisetina. Desta forma, esse resultado sugere a inibição das proteínas tirosina fosfatases em células HL60 tratadas com a fisetina. As proteínas tirosina fosfatases são responsáveis por regular a ação das proteínas quinases, e desta forma regula os processos de sinalização celular (Mustelin et al., 2004). Portanto, este resultado indica que a inibição de PTPs pode ser crucial para a interrupção da proliferação celular.

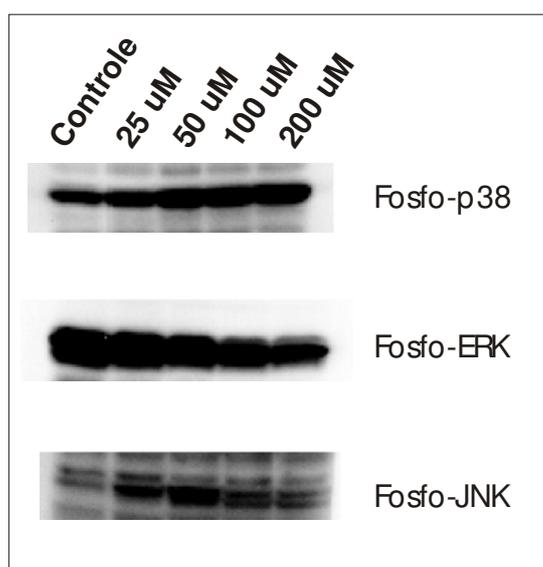


Figura 21 – Análise da expressão e fosforilação das proteínas ativadas por mitógenos (MAPKs).

As células foram tratadas com diferentes concentrações de fisetina e em seguida preparadas para análise por Western Blot como descrito em Métodos 3.2.2 (g.4). A análise das bandas de proteínas foram realizadas por quimiluminescência (ECL) em membrana de PDVF, após incubação com os respectivos anticorpos primários e secundários.

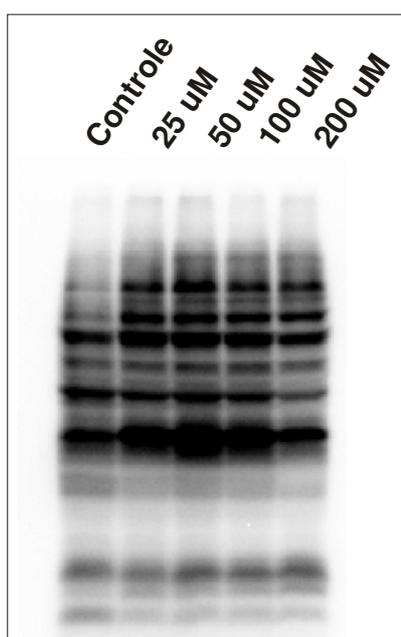


Figura 22 – Análise por Western Blot das Proteínas Fosforiladas em Tirosina em cultura de HL60.

As células foram tratadas com diferentes concentrações de fisetina e em seguida preparadas para análise por Western Blot como descrito em Métodos 3.2.2 (g.4). A análise das bandas de proteínas foram realizadas por quimiluminescência (ECL) em membrana de PDVF, após incubação com os respectivos anticorpos primários e secundários.

4.3. Efeitos *in vivo* de Flavonóides sobre a Atividade de Fosfatases

É possível que os flavonóides possam agir sobre a atividade das fosfatases, modulando-as, de três maneiras: aumentando a atividade das enzimas antioxidantes e níveis de GSH, atuando diretamente sobre aminoácidos importantes para a catálise enzimática (por exemplo, resíduos de -SH) ou como sequestradores diretos de espécies reativas de oxigênio. Desta forma, avaliou-se o efeito dos flavonóides morina e quercetina sobre o conteúdo total de proteínas, a atividade das fosfatases ácidas totais (FAT), tartarato resistente (TRAP), proteína tirosina fosfatases (FAB) e fosfatase alcalina (FAlc). Pode-se observar nestes resultados que a ação destes flavonóides pode ser dependente da sua estrutura, do órgão e/ou sistema alvo e da fosfatase analisada.

Na Figura 23, pode-se observar que a quantidade total de proteína sofreu alteração no fígado e nos rins quando administrados os flavonóides morina e quercetina e quando comparados com o controle. No fígado a morina aumentou a quantidade total de proteína em aproximadamente 17%, enquanto a quercetina não provocou nenhuma alteração considerável. Pelos valores estatísticos de significância ($p < 0,05$) pode se indicar que há uma possível indução de síntese protéica pelo flavonóide morina em relação ao controle (administração apenas de óleo) e a quercetina. Nos rins, tanto morina quanto quercetina provocaram alterações consideráveis na quantidade total de proteínas. Observa-se uma diminuição de 10% na quantidade total de proteína provocada pela ação da morina, enquanto que a quercetina provocou uma diminuição de 17%. No entanto, devido aos valores de desvio padrão serem considerados nos testes estatísticos, não houve uma significância relevante para estes resultados. A diminuição na quantidade total de proteínas, possivelmente, está associada à ação inibitória que os flavonóides possuem sobre o metabolismo de DNA e RNA (Middleton et al., 2000).

Nas Figuras 24 e 25 estão representadas as análises feitas dos efeitos de morina e quercetina sobre as atividades das fosfatases ácida e alcalina do fígado. Pode se verificar que a morina não provocou nenhuma alteração significativa nas atividades destas enzimas. No entanto, a quercetina provocou uma diminuição na atividade da fosfatase

ácida tartarato resistente (TRAP) da ordem de 17% com significância menor que 0,05 e uma ativação da ordem de 15% para a fosfatase ácida de baixa massa molecular relativa (FAB) e fosfatase alcalina (FAlc). Porém, os resultados para FAB e FAlc não apresentaram significância considerável através das análise estatística.

Nos rins a morina diminuiu a atividade da fosfatase ácida total (FAT) em 10% e da FAlc em 60% (Figura 26). No entanto, foi considerado como resultado significativo apenas a inibição da FAlc ($p < 0,01$). Já a quercetina (Figura 27) aumentou as atividades de TRAP (75%), FAB (18%) e da FAlc (15%). Porém, apresentaram resultados com significância estatística a ativação da TRAP e FAB ($p < 0,001$). É importante destacar o efeito dos flavonóides morina e quercetina sobre a atividade fosfatásica nos rins. Enquanto a morina possui uma tendência clara de inibição fosfatásica a quercetina possui uma tendência a ativar estas enzimas. Podemos verificar este fato quando observamos as enzimas TRAP, ativada por quercetina e inalterada pela morina, e FAlc praticamente inalterada para quercetina e inibida por morina.

Para o plasma, nas Figuras 28 e 29, observa-se uma diminuição da atividade enzimática para a FAT (45%) e FAB (40%) provocada pela ação da morina. Porém, apenas a inibição da FAT pode ser considerada estatisticamente significativa com $p < 0,05$. Enquanto isto, a quercetina aumentou a atividade enzimática da FAB em 100% ($p < 0,01$). Novamente, pode-se observar o efeito antagônico dos flavonóides na atividade da FAB do plasma.

De maneira geral, pode-se observar que a morina provoca uma diminuição na atividade fosfatásica *in vivo*. Isto pode ser verificado pela diminuição das atividades enzimáticas das FAT e FAlc (nos rins – Figura 26), FAT e FAB (no plasma – Figura 28). Já a quercetina possui a capacidade de aumentar a atividade enzimática das fosfatases, também *in vivo*, observado pelo aumento da atividade enzimática das FAB e FAlc nos dois órgãos analisados e no plasma (Figuras 25, 27 e 29). Estes resultados são iguais aos obtidos *in vitro* para o efeito destes flavonóides sobre a atividade enzimática da proteína tirosina fosfatase de baixa massa molecular relativa (Miranda et al., 2005).

O fígado é o principal órgão responsável pela metabolização de xenobióticos, e com isto possui uma taxa metabólica elevada e é sujeito a muitos problemas em potencial causados pelo estresse oxidativo. Conseqüentemente, uma manutenção correta do sistema de defesa antioxidante hepático é de grande importância para a manutenção da saúde. O fígado é, também, o órgão principal envolvido no metabolismo de polifenóis junto com a mucosa intestinal e os rins, nos quais chegam através da corrente sanguínea após a absorção ao longo do trato gastrointestinal ou por outro método de administração. Conseqüentemente, os potenciais efeitos benéficos dos polifenólicos ocorreriam primeiramente no fígado e também no sangue e rins (Aliá et al., 2003). Foi verificado que os flavonóides podem alterar o estado redox nos órgãos e nas células sanguíneas, melhorando a capacidade antioxidante basal pela atividade de enzimas antioxidantes do fígado, suportando o conceito dos efeitos benéficos à saúde de produtos naturais. Embora, os níveis de flavonóides sejam baixos na circulação sanguínea, com uma absorção líquida reduzida e um tempo de meia vida relativamente rápido nas vias de excreção, as concentrações aumentadas destes compostos no plasma sanguíneo e nos rins aumenta a capacidade antioxidante total. Isto é comprovado nos testes realizados *in vivo* dosando-se as principais enzimas envolvidas no mecanismo de defesa antioxidante: superóxido dismutase, catalase e glutathione redutase, bem como os elevados níveis de glutathione reduzida remanescente.

Os radicais livres (ex: espécies reativas de oxigênio como superóxidos, radicais hidroxil, peróxido de hidrogênio, oxigênio singlete, hipoclorito e ozônio) podem degradar estruturas importantes nas células como os lipídios da membrana celular, proteínas e o DNA. Os radicais livres estão envolvidos em mais de 100 doenças diferentes incluindo doenças cardiovasculares e câncer (Wiseman, 1996). Muitas proteínas do organismo importantes nas catálises enzimáticas, regulações gênicas e dos componentes celulares podem ser degradadas por oxidação e podem ser consideradas um importante marcador biológico para a ação do estresse oxidativo (Minato et al., 2003). As fosfatases possivelmente podem ser uma destas enzimas marcadoras do estresse oxidativo, principalmente as serina/treonina fosfatases e proteína tirosina fosfatase. Estas enzimas,

por possuírem um grupo sulfidril no sítio catalítico susceptível à ação de espécies reativas de oxigênio, podem ser inativadas por oxidação irreversível destes grupos (Aoyama et al., 2003).

Ambos os flavonóides quercetina e morina possuem as características necessárias para a apresentarem efeitos sobre estes sistemas enzimáticos: a presença de um anel de catecol hidroxilado (3' e 4' para quercetina e 2' e 4' para a morina), dupla ligação e função cetona no anel B conferindo a possibilidade de tautomeria ceto-enol aumentando a capacidade antioxidante do composto e anel aromático hidroxilado (anel A) – (Figura 30). A única diferença entre a quercetina e a morina é a mudança na posição de uma das hidroxilas do anel de catecol (anel C). Esta pequena diferença, para as fosfatases, é capaz de provocar o efeito antagônico observado em resultados *in vitro* (Miranda et al., 2005) e *in vivo*. Enquanto a quercetina possuía um efeito ativador sobre as fosfatases, a morina possuía um efeito inibitório. Como as fosfatases fazem parte de diversos mecanismos de controle celular, e atuam antagonicamente com as proteínas quinases, estudar o efeito destes compostos naturais com diferentes efeitos sobre estes sistemas pode ser uma maneira de compreendê-los e aplicá-los no tratamento de diferentes doenças envolvidas com o desbalanço entre quinases e fosfatases (Cannons e Schwartzberg, 2004).

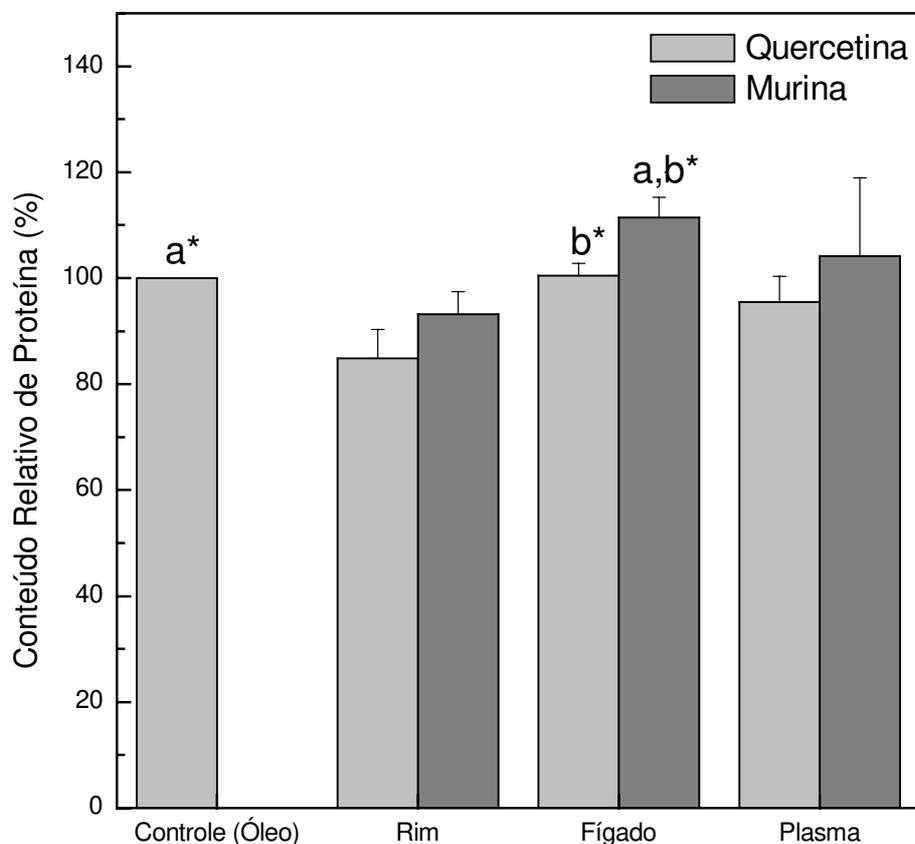


Figura 23 - Efeito de flavonóides sobre o conteúdo total de proteínas *in vivo*.

O conteúdo total de proteínas foi determinado como descrito em métodos 3.2.2.(e). Nos camundongos do grupo controle foram aplicados o volume correspondente em óleo. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD). As diferenças significantes foram determinadas por Student's *t*-test (* $p < 0,05$).

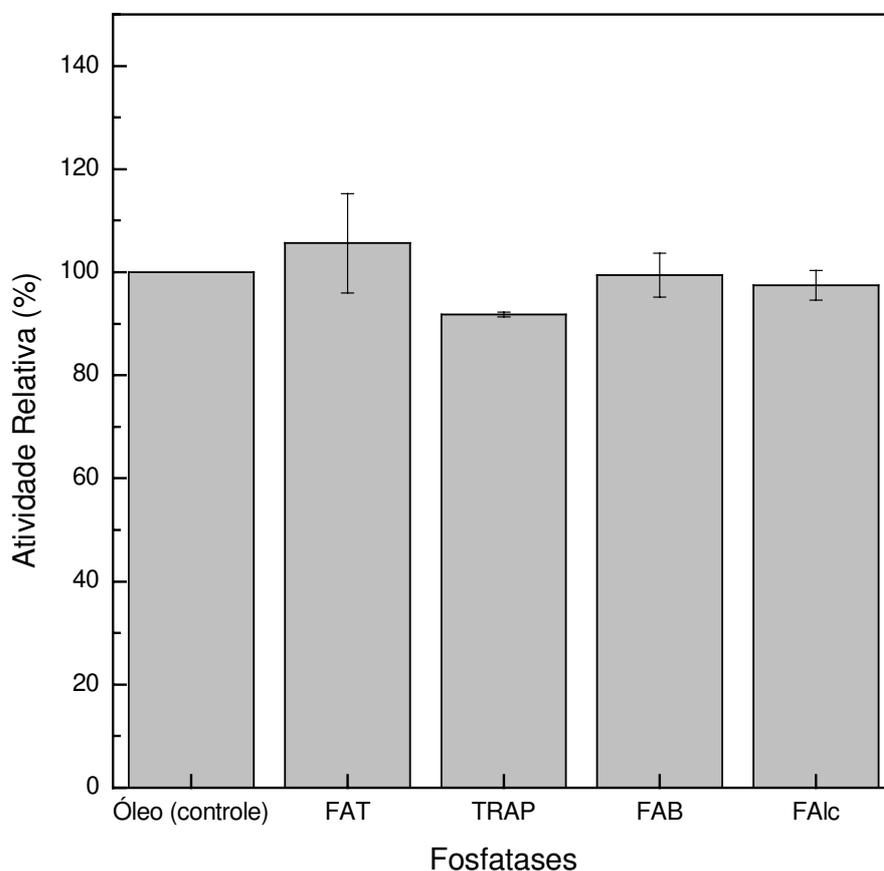


Figura 24 - Efeito de Morina sobre a atividade fosfatásica do fígado.

A análise foi realizada como descrito em métodos 3.2.3.(d). Nos camundongos do grupo controle foram aplicados o volume correspondente em óleo. FAT significa fosfatase ácida total; TRAP, fosfatase ácida tartarato resistênte; FAB, fosfatase ácida de baixa massa molecular relativa; e FAlc, fosfatase alcalina. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD). As diferenças significantes foram determinadas por Student's *t*-test.

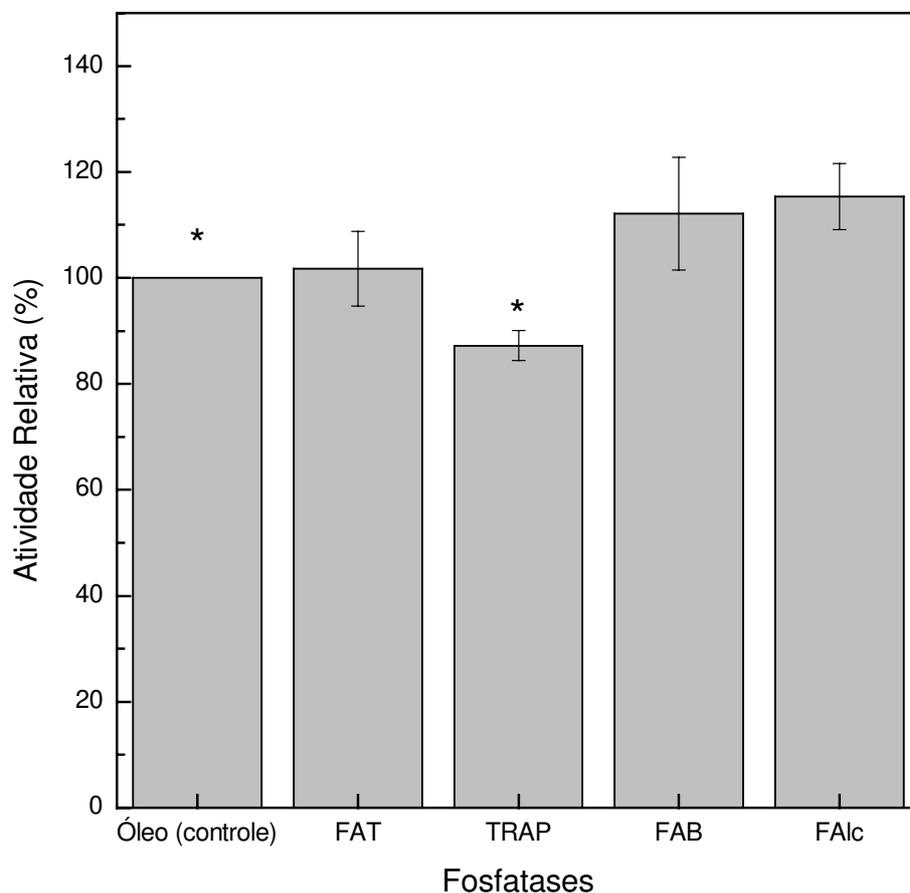


Figura 25 - Efeito de Quercetina sobre a atividade fosfatásica do fígado.

A análise foi realizada como descrito em métodos 3.2.3.(d). Nos camundongos do grupo controle foram aplicados o volume correspondente em óleo. FAT significa fosfatase ácida total; TRAP, fosfatase ácida tartarato resistênte; FAB, fosfatase ácida de baixa massa molecular relativa; e FAlc, fosfatase alcalina. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD). As diferenças significantes foram determinadas por Student's *t*-test (* $p < 0,05$).

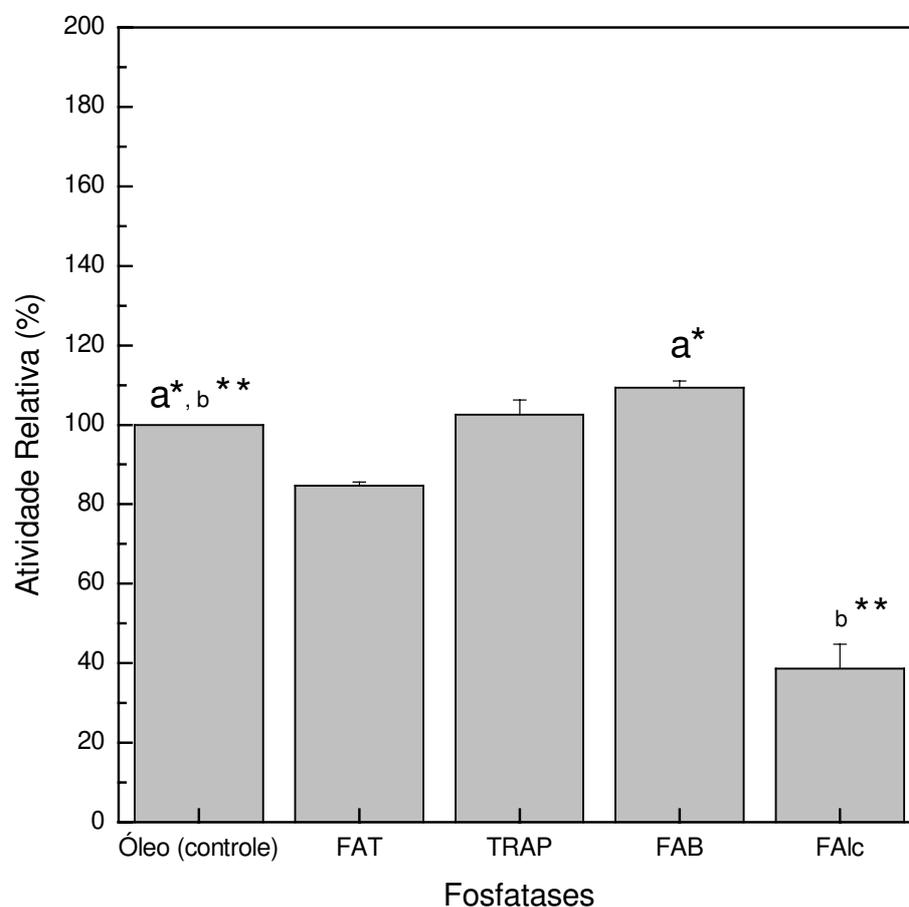


Figura 26 - Efeito de Morina sobre a atividade fosfatásica do rim.

A análise foi realizada como descrito em métodos 3.2.3.(d). Nos camundongos do grupo controle foram aplicados o volume correspondente em óleo. FAT significa fosfatase ácida total; TRAP, fosfatase ácida tartarato resistênte; FAB, fosfatase ácida de baixa massa molecular relativa; e FAlc, fosfatase alcalina. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD). As diferenças significantes foram determinadas por Student's *t*-test (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$).

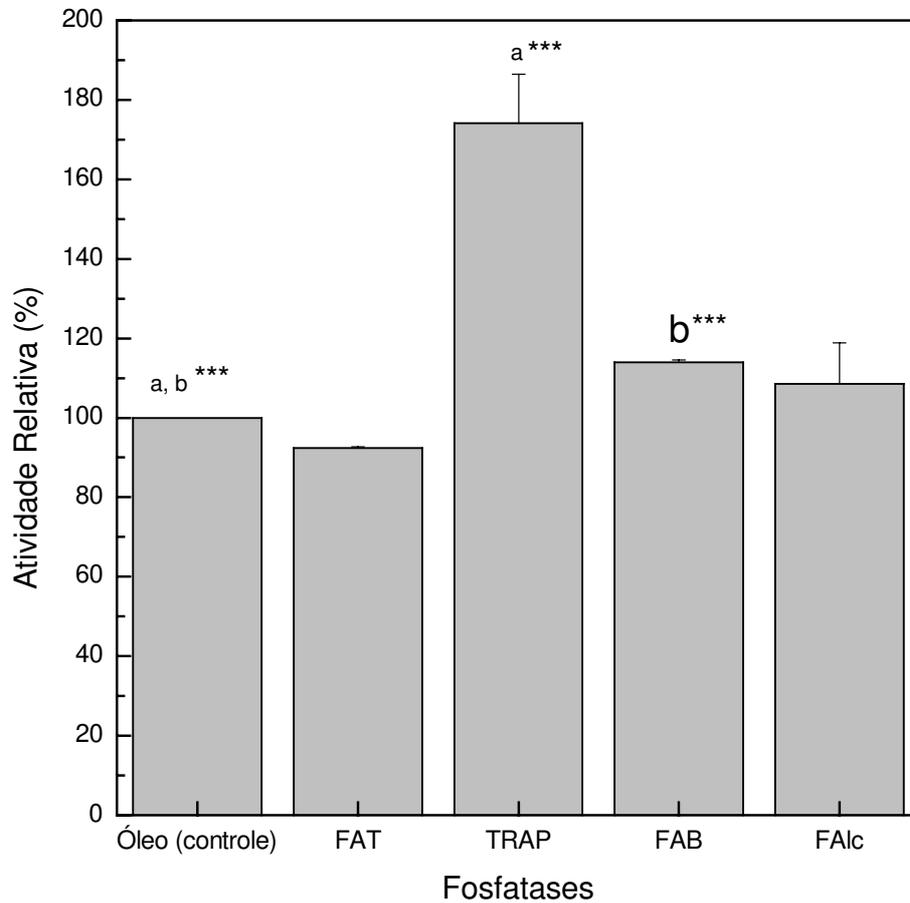


Figura 27 - Efeito de quercetina sobre a atividade fosfatásica do rim.

A análise foi realizada como descrito em métodos 3.2.3.(d). Nos camundongos do grupo controle foram aplicados o volume correspondente em óleo. FAT significa fosfatase ácida total; TRAP, fosfatase ácida tartarato resistênte; FAB, fosfatase ácida de baixa massa molecular relativa; e FAlc, fosfatase alcalina. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD). As diferenças significantes foram determinadas por Student's *t*-test (***) $p < 0,001$.

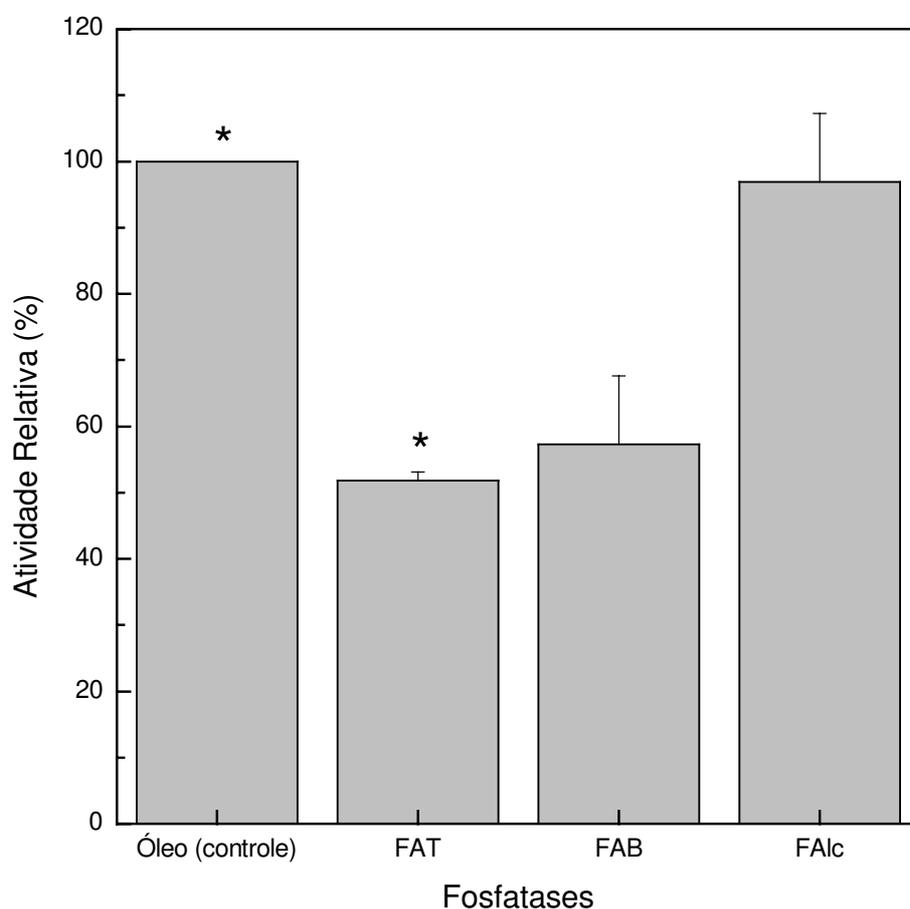


Figura 28 - Efeito de Morina sobre a atividade fosfatásica do plasma.

A análise foi realizada como descrito em métodos 3.2.3.(d). Nos camundongos do grupo controle foram aplicados o volume correspondente em óleo. FAT significa fosfatase ácida total; FAB, fosfatase ácida de baixa massa molecular relativa; e FAlc, fosfatase alcalina. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD). As diferenças significantes foram determinadas por Student's *t*-test (* $p < 0,05$).

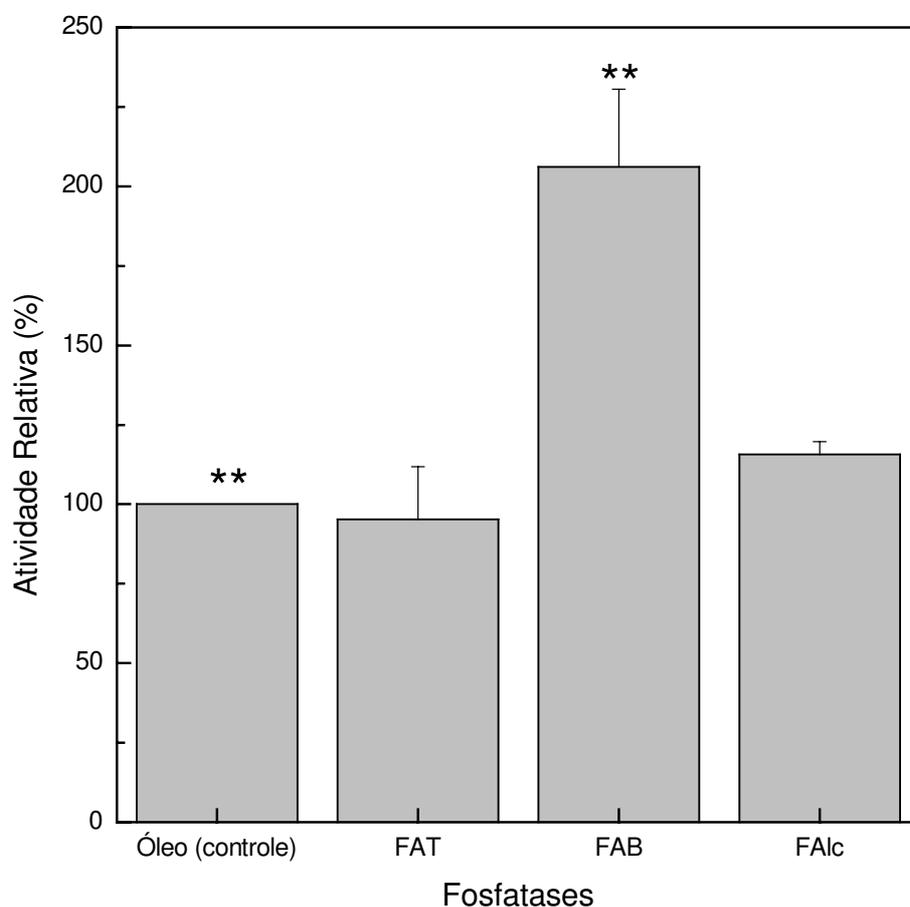


Figura 29 - Efeito de Quercetina sobre a atividade fosfatásica do plasma.

A análise foi realizada como descrito em métodos 3.2.3.(d). Nos camundongos do grupo controle foram aplicados o volume correspondente em óleo. FAT significa fosfatase ácida total; FAB, fosfatase ácida de baixa massa molecular relativa; e FAlc, fosfatase alcalina. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD). As diferenças significantes foram determinadas por Student's *t*-test (** $p < 0,01$).

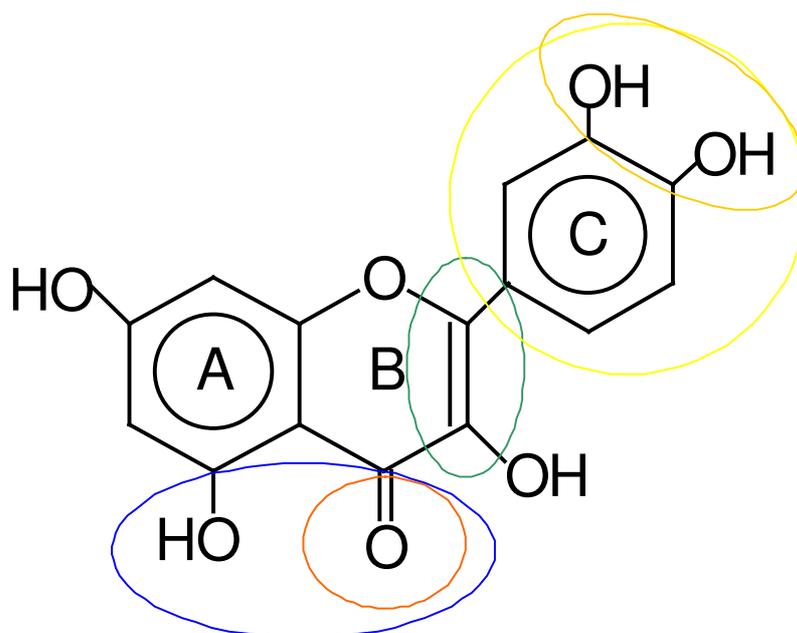


Figura 30. A estrutura do flavonol quercetina.

A representação através desta figura mostra os grupos mais importantes para a atividade dos flavonóides sobre os sistemas enzimáticos. O mais importante destes grupos é o anel C de catecol dihidroxilado (circulado em amarelo). Outra parte importante inclui a presença da insaturação no anel B (circulado em verde) e a presença da função 4-oxo (circulado em laranja). As hidroxilas (circuladas em azul e amarelo escuro) possuem capacidade de formar pontes de hidrogênio com moléculas de água ou capacidade quelante principalmente de íons Cu^{+2} e Fe^{+} .

5. CONCLUSÕES

Os flavonóides são os compostos naturais mais estudados nos últimos anos devido as suas promissoras atividades como modificadores da resposta biológica. Devido a este fato muitos estudos foram e estão sendo realizados no sentido de explorar todo este potencial. Pode-se observar a enorme quantidade de trabalhos realizados com flavonóides *in vitro* e *in vivo*, que surgem a cada ano nas bases de dados eletrônicos. No sentido de contribuir com resultados que auxiliem na elucidação do mecanismo de ação biológica destes compostos, este trabalho verificou a ação dos flavonóides sobre a atividade de fosfatases *in vitro* e *in vivo*. As fosfatases, de uma maneira geral, são divididas em grandes famílias responsáveis pela desfosforilação de proteínas e regulação de processos importantes na fisiologia celular. Assim, dos resultados obtidos pudemos concluir que:

- Como verificado anteriormente (Miranda et al., 2005), o efeito dos flavonóides é depende da sua fórmula estrutural e, para verificarmos os efeitos destes compostos na atividade da proteína tirosina fosfatase de membrana de linfócitos humanos normais foi necessário realizar a purificação e caracterização cinética desta proteína obtendo-a em grau de pureza adequado para análise cinética. Assim, através da análise de inibidores específicos e pela caracterização eletroforética, concluimos que a fosfoproteína tirosina fosfatase que analisamos foi a CD45 de membrana de linfócitos. A importância de estudar esta enzima está relacionada com o fato de ser a principal fosfatase de membrana de células imune e ser responsável pelo controle da sinalização celular. Assim, pudemos observar que a morina (inibição de 30%) e a fisetina (ativação de 30%) apresentaram efeitos significativos sobre esta enzima de maneira dose - dependente ;

- Os fitoquímicos (neste caso os flavonóides) são potenciais quimiopreventivos e quimioterápicos e como agentes terapêuticos eles podem matar células cancerosas e evitar o seu crescimento. Para realizar os testes de potencialidade biológica escolhemos a linhagem de células de leucemia mielocítica

(HL60) e cultura primária de linfócitos normais. Pode-se verificar que fisetina e morina foram capazes de promover 90% de morte celular em HL60. Foi também realizada a determinação da IC₅₀ (concentração que inibe 50%) para os seguintes parâmetros de viabilidade celular: quantificação de proteína total, redução de MTT e atividade fosfatásica. Foram obtidos os seguintes resultados: as IC₅₀ obtidas para o parâmetro fosfatase ácida total foi de 50 e 150µM para rutina e fisetina, respectivamente; quanto a redução de MTT, obteve-se uma IC₅₀ de 45, 190 e 80µM para fisetina, morina e quercetina, respectivamente; e não foi obtido os valores de IC₅₀ para o parâmetro quantidade de proteína total;

- Para a cultura primária de linfócitos humanos, analisando os mesmos parâmetros de viabilidade celular obteve-se os seguintes resultados: o valor de IC₅₀ para o conteúdo de proteína total e atividade fosfatásica apenas para fisetina e foram de 75 e 100µM, respectivamente; nenhum outro flavonóide ou parâmetro de viabilidade celular apresentaram IC₅₀. É importante destacar que para o parâmetro proteína total a morina, taxofolina e quercetina apresentaram aumentos consideráveis podendo indicar proliferação celular. Para a atividade fosfatásica total, há um aumento de 10% e 40% para catequina e morina nas concentrações de 50 e 20µM, respectivamente. Pode-se também verificar, que fisetina foi o único flavonóide que apresentou efeito tóxico, sendo obtido os valores de IC₅₀ para os três parâmetros de viabilidade celular. Verifica-se para os ensaios de citotoxicidade em HL60 e cultura primária de linfócitos que nenhum dos três parâmetros isolados pode ser utilizado para determinação do efeito tóxico dos flavonóides;

- Os resultados de western blotting para o tratamento de HL60 com fisetina indicaram a capacidade deste flavonóide de promover a ativação da MAPK p38 (forma ativa), crescente com o aumento da concentração e inibir as MAPKs ERK (dependente da concentração) e JNK (na concentração de 200µM). A atuação deste flavonóide sobre a atividade destas enzimas pode resultar em atividade antiproliferativa de células cancerosas.

- Os testes *in vivo* com quercetina e morina foram capazes de indicar o aumento da expressão de proteínas no fígado quando ministrado morina (17%). De uma maneira geral, a morina foi capaz de diminuir a atividade fosfatásica *in vivo*. Isto pode ser verificado pela diminuição das atividades enzimáticas de 10% e 60% respectivamente das FAT e FAlc (nos rins) e 45% e 40% para FAT e FAB respectivamente no plasma. Já a quercetina apresentou a capacidade de aumentar a atividade enzimática das fosfatases em 15% como FAB e FAlc no fígado. Nos rins, houve um aumento da atividade fosfatásica de 15%, 18% e 75% para FAlc, FAB, e TRAP respectivamente. No plasma sanguíneo houve 100% de aumento na atividade enzimática para FAB;

- De todos os flavonóides analisados, quercetina e morina possuem as características estruturais citadas pela literatura, para que apresentem os efeitos biológicos *in vitro* e *in vivo* analisados neste trabalho. No entanto, a única diferença existente entre morina e quercetina (a mudança de uma hidroxila no anel de catecol de 2' para 3') foi capaz de resultar no efeito antagônico observado nos resultados analisados. Enquanto a quercetina possui um efeito ativador sobre as fosfatases, a morina apresenta um efeito inibitório.

6. PERSPECTIVAS

As fosfatases fazem parte de diversos mecanismos de controle celular e atuam antagonicamente com as proteínas quinases. Estudar o efeito destes compostos naturais com diferentes efeitos sobre estes sistemas pode ser uma maneira de compreender e aplicar os conhecimentos obtidos no tratamento de diferentes doenças envolvidas com o desbalanço de fosforilação nas células.

Recentemente, muitos estudos tem sido apresentados à comunidade científica sobre a atuação de fitoquímicos como potenciais auxiliares no tratamento de diversas doenças como o câncer. Alguns resultados prévios, obtidos em nosso laboratório de enzimologia, indicam que antocianinas (uma classe de flavonóides) extraídas das cascas dos frutos de “Jambolão” e jabuticaba possam ter os efeitos benéficos descritos na literatura. Em um outro aspecto, muito tem sido falado da capacidade de seqüestrarem radicais livres apresentadas por flavonóides em sistemas biológicos. Em continuação a este trabalho, serão realizados experimentos *in vivo* que estimulem o estresse oxidativo e serão analisados capacidade dos flavonóides de inibir este estresse. Estará sendo associado a estas análises o efeito que o estresse oxidativo ocasiona nas fosfatases, podendo estas serem utilizadas como marcadores biológicos do estresse oxidativo e a possível proteção pelos flavonóides.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abalea, V., Cillard, J., Dubos, M. P., Sargent, O., Cillard, P and Morel, I. (1999) **Repair of iron-induced DNA oxidation by the flavonoid myricetin in primary rat hepatocyte cultures.** *Free Rad.l Biol. Med.* 26: 1457-1466.
- Afanas'ev, I. B., Dorozhko, A. I., Brodskii, A.V., Kostyuk, V. A. and Potapovitch, A. I. (1989). **Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation.** *Biochem. Pharmacol.* 38: 1763-1769.
- Alexander, A. (2000) **The CD45 tyrosine phosphatase: a positive and negative regulator of immune cell function.** *Sem. Immunol.* 12: 349-359.
- Alía, M.; Horcajo, C.; Bravo, L. and Goya, L. (2003) **Effect of grape antioxidant dietary fiber on the total antioxidant capacity and the activity of liver antioxidant enzymes in rats.** *Nut. Res.* 23: 1251-1267.
- Allen, R.G. and Tresini, M. (2000) **Oxidative stress and gene regulation.** *Free Radic. Biol. Med.* 28: 463-499.
- Antônio, M. A. and Brito, A. R. M. S. (1998) **Oral anti-inflammatory and anti-ulcerogenic activities of a hydroalcoholic extract and partitioned fractions of Turnera ulmifolia (Turneraceae).** *J. Ethnopharmacol.* 61: 215-228.
- Aoyama, H., Melo, P. S., Granjeiro, P. A., Haun, M. and Ferreira, C. V. (2000) **Cytotoxicity of okadaic acid and kinetic characterization of protein tyrosine phosphatase activity in V79 fibroblasts.** *Pharm. Pharmacol. Comm.* 6: 331-334.
- Aoyama, H., Silva, T. M. A., Miranda, M. A. and Ferreira, C.V. (2003) **Proteínas Tirosina Fosfatases: Propriedades e funções biológicas.** *Quim. Nova* 26 (6): 896 – 900.
- Baksh, S. and Burakoff, S. J. (2000). **The role of calcineurin in lymphocyte activation.** *Sem. Immunol.*, 12: 405-415.

- Barford, D. (1996) **Molecular mechanism of the protein serine/threonine phosphatases.** *Trends Biochem. Sci.* 21: 407-412.
- Bernier, L. and Wang, E. (1996) **A prospective view on phosphatase and replicative senescence.** *Experimen. Gerontol.* 31: 13-19.
- Bhatia, A. L.. and Jain, M. (2004) **Cspinacia oleracea L. Protects against gamma radiations: a study on glutathione and lipid peroxidation in mouse liver.** *Phytomed.* 11: 607-615.
- Birt, D. F., Mitchell, D., Gold, B., Pour, P and Pinch, H. C. (1997). **Inhibition of ultraviolet light induced skin carcinogenesis in SKH-1 mice by apigenin, a plant flavonoid.** *Anticancer Res.* 17: 85-92.
- Bormann, H. and Melzing, M. F. (2000) **Inhibition of metallopeptidases by flavonoids and related compounds.** *Pharmazie* 55: 129-132.
- Bradford, M. M. (1976) **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brady-Kalnay, S. M., Rimm, D. L. and Tonks, N. K. (1995) **Receptor protein tyrosine phosphatase PTP μ associates with cadherins and catenins in vitro.** *J. Cell Biol.* 130: 977-986.
- Breitman, T. R.(1990) **Growth and differentiation of human myeloid leukemia cell line HL60.** *Method. In Enzymol.* 190: 118-130.
- Brewis, N. D., Street, A. J., Prescott, A. R. and Cohen, P. T. (1993) **PPX, a novel protein serine/threonine phosphatase localized to centrosomes.** *EMBO J.* 12: 987-996.
- Buzzi, M., Lu, L., Lombardi, A. J., Posner, M. R., Brautigan, D. L., Fast, L. D. and Frackelton, A. R. (1992) **Differentiation-Induced Changes in Protein-Tyrosine Phosphatase-Activity and Commensurate Expression of CD45 in Human Leukemia-Cell Lines.** *Cancer Res.* 52: (14) 4027-4035.
- Calias, P., Galanopoulus, T., Maxwell, M., Khayat, A., Graves, D., Antoniadis, H.

- N. and Dalarcao, M. (1996) **Synthesis of inositol-2-phosphate-cuercetin conjugates.** *Carbohydr. Res.* 292: 83 - 90.
- Camps, M., Nichols, A., Gillieron, C., Antonsson, B., Muda, M., Chabert, C., Boschert, U. and Arkinstall, S. (1998) **Catalytic Activation of the Phosphatase MKP-3 by ERK2 Mitogen-Activated Protein Kinase.** *Science* 280: 1262 - 1265.
- Cannons J. L. And Schwartzberg (2004) **Fine-tuning lymphocyte regulation: what's new with tyrosine kinases and phosphatases?** *Curr. Op. Immunol.* 16: 1-8.
- Cano, E. and Mahadevan, L. C. (1995) **Parallel signal processing among mammalian MPKs.** *Trends Biochem. Sciences* 20 (3): 117-122.
- Carrero, P., Ortega, H, Botas, J. M., Coronado, D. G. and Lasunción, M. A. (1998) **Flavonoid induced ability of minimally modified low density lipoproteins to support lymphocyte proliferation.** *Biochem. Pharmacol.* 55: 1125-1129.
- Chaimovich, H. and Nome, F. (1970) **Purification and properties of an acid phosphatase from bovine brain.** *Arch. Biochem. Biophys.* 139: 9-16.
- Chaudhuri, M. (2001) **Cloning and characterization of a novel serine/threonine protein phosphatase type 5 from *Trypanosoma brucei*.** *Gene* 266: 1-13.
- Chinkers, M. (2001) **Protein phosphatase 5 in signal transduction.** *Trends Endocrinol. Met.* 12: 28-32.
- Chu, S. C., Hsieh, Y. S. and Lin, J. Y. (1992). **Inhibitory effects of flavonoids on moloney murine leukemia virus reverse transcriptase activity.** *J. Nat. Prod.* 55: 179-183.
- Ciancaglini, P., Pizauro, J. M., Leone, F. A. (1992). **Polioxy-Ethylene-9-Lauryl Ether-Solubilized Alkaline Phosphatase: Synergistic Stimulation By Zinc And Magnesium Ions.** *Int. J. Biochem.* 24: 611-615.
- Cingi, M. R., De Angelis, I., Fortunati, E., Reggiani, D., Bianchi, V., Tiozzo, R. and Zucco, F. (1991) **Choice and standardization of test protocols in**

- cytotoxicology: a multicentre approach.** *Toxicol. In Vitro.* 5: (2) 119-125.
- Clemedson, C., Mc Farlane-Abdulla, E., Andersson, M., Barile, F. A., Calleja, M. C., Chesné, C., Clothier, R., Cottin, M., Curren, R., Daniel-Szolgay, E., Dierickx, P., Ferro, M., Fiskesjo, G., Garza-Ocanãs, L., Gómez-Lechón, M. J., Gulden, M., Isomaa, B., Janus, J., Judge, P., Kahru, A., Kemp, R. B., Kerszman, G., Kristen, U., Kunimoto, M., Karenlampi, S., Lavrijsen, K., Lewan, L., Lilius, H., Ohno, T., Persoone, G., Roguet, R., Romert, L., Sawyer, T. W., Seibert, H., Shrivastava, R., Stamatii, A., Tanaka, N., Torres-Alanis, O., Voss, J. U., Wakuri, S., Walum, E., Wang, X., Zucco, F. and Ekwall, B. (1996) **MEIC evaluation of acute systematic toxicity. Part I: Methodology of 68 In Vitro toxicity assays used to test the first 30 reference chemicals.** *ATLA.* 24: 251-272.
- Cohen, P. (1992) **Signal integration at the level of protein kinases, protein phosphatases and their substrates.** *Trends Biochem. Sci.* 17, 408-413.
- Cohen, P. (2000) **The regulations of protein function by multisite phosphorylations – a 25 year update.** *Trends Biochem. Sciences* 25: 596 – 601.
- Cuncic, C., Desmarais, S., Detich, N. and Tracey, A. S. (1999). **Bis(N,N-dimethylhydroxamido)hydroxooxovanadate Inhibition of Protein Tyrosine Phosphatase Activity in Intact Cells.** *Biochem. Pharmacol.* 58: 1859-1867.
- Cushman, M., Nagarathmam, D., Burg, D. L. and Geahlen, R. L. (1991). **Synthesis and protein-tyrosine kinase inhibitory activities of flavonoids analogues.** *J. Med. Chem.* 34: 798-806.
- Cyert, M. S. and Thorner, J. (1989) **Putting it on and taking it off: phosphoprotein phosphatase involvement in cell cycle regulation.** *Cell.* 57: 891-893.
- Da Cruze, B., Da Cruze, F. and Cohen, P. T. (1988) **Identification of a novel protein phosphatase catalytic subunit by cDNA cloning.** *FEBS Lett.* 242: (1)

- 106-110.
- Das, D. K. (1994) **Naturally occurring flavonoids: Structure, chemistry, and high-performance liquid chromatography methods for separation and characterization.** *Meth. Enzymol.* 234: 410 - 420.
- Das, M. and Ray, P. K. (1988) **Lipid antioxidant properties of quercetin *in vitro*.** *Biochem.* 17: 203-209.
- Dawson, T. M., Steiner, J. P., Dawson, V. L., Dinerman, J. L., Uhl, G. R. and Snyder, S. H. (1993) **Immunosuppressant FK506 enhances phosphorylation of nitric oxide synthase and protects against glutamate neurotoxicity.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 9808-9812.
- Day, A. J., Cañada, F. J., Díaz, J. C., Kroon, P. A., Mclauchlan, R, Faulds, C. B., Plumb, G. W., Morgan, M. R. A. and Williamson, G. (2000) **Dietary flavonoids and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hidrolase.** *FEBS Lett.* 468: 166-170.
- Denizot, F. and Lang, R. (1986) **Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability.** *J. Immunol. Meth.* 89: 271-277.
- Deschner, E. E., Ruperto, J., Wong, G. and Newmark, H. L. (1991) **Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia.** *Carcinog.* 12: 1193-1196.
- Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A. A. and Capasso, F. (1999) **Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs.** *Life Sciences* 65: 337-353.
- Doostdar, H., Burke, M. D. And Mayer, R. T. (2000) **Bioflavonoids: selective substrates and inhibitors for cytochrome P450 CYP1A and CYP1B1.** *Toxicol.* 144: 31-38.
- Duff, S. M. G., Sarath, G. and Plaxton, W. C. (1994) **The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism.** *Physiol. Plant.* 90: 791-800.

- Erlund, I. (2004) **Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology.** *Nutr. Res.* 24, 851-874.
- Erlund, I., Meririnne, E., Alfthan, G. and Aro, A.(2001) **Plasma kinetics and urinary excretion of the flavonones naringenin and hesperitin in humans after ingestion of orange juice and grapefruit.** *J. Nutr.* 131:235- 241.
- Ferguson, L. R. (2001) **Role of plant polyphenols in genomic stability.** *Mutat. Res./Fund. Mol. Mechan. Mutagen.* 475: 89-111.
- Ferreira, A. C. F., Rosenthal, D. and Carvalho, D. P. (2000) **Thyroid peroxidase inhibition by *Kalanchoe brasiliensis* aqueous extract.** *Fd Chem. Toxic.* 38: 417-421.
- Ferreira, C.V.; Granjeiro, J. M.; Taga, E. M. and Aoyama, H. (1998) **Soybean seed acid phosphatases: unusual optimum temperature and thermal stability studies.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 242: 282-286.
- Ferriola, C. P., Cody, V. and Middleton, E. (1989) **Protein kinase C inhibition by plant flavonoids. – Kinetic mechanisms and structure-activity relationships.** *Biochem. Pharmacol.* 38: 1617–1624.
- Feuerstein, G. Z. and Young, P. R. (2000) **Apoptosis in cardiac diseases: stress- and mitogen-activated signaling pathways.** *Cardiovascular Research* 45: 560 - 569.
- Fischer, E. H., Charbonneau, H. and Tonks, N. K. (1991) **Protein tyrosine phosphatases: a diverse family of intracellular and transmembrane enzymes.** *Science.* 253: 401-406.
- Fischer, G., Witman Liebold, B., Lang, K., Kiefhaber, T. and Schmid, F. X. (1989) **Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins.** *Nature.* 337: 476-478.
- Formica, J. V. and Regelson W. (1995) **Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids.** *Fd Chem. Toxic.* 33: 1061–1080.

- Frearson, J. A. and Alexander, D. R. (1996) **Protein tyrosine phosphatases in T-cell development, apoptosis and signalling.** *Immunol. Today* 17 (8): 379-384.
- Freire, A. C. G. F., Assis, C. F., Frick, A. O., Melo, P. S. M., Haun, M., Aoyama, H., Duran, N., Sauer, M. M., Kallás, E. G. And Ferreira C. V. (2003) **Influence of protein phosphatase inhibitors on HL60 cells death induction by dehydrocrotonin.** *Leuk. Res.* 27: 823-829.
- Freshney, R. I. (1994) **In culture of animal cells. A manual of Basic Techniques.** 3rd . Ed. Wiley-Liss.
- Galati, G. and O'Brien, P (2004) **Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties.** *Free Rad. Biol. & Med.* 37, 287-303
- Ganapati, U., Gupta, S., Radha, V., Sudhakar, C., Manogaran, P.S. and Swarup, G. (2001) **A nuclear protein tyrosine phosphatase induces shortening of G1 phase and increase in c-myc protein level.** *Exp. Cell Res.* 265: 1-10.
- Gomes, P. B. (1978) **Caracterização e comparação de fosfatases ácidas.** *Dissertação de Mestrado*, Instituto de Química/USP.
- Groth, T., Falck, P. and Miethke, R. R. (1995) **Cytotoxicity of biomaterials—basic mechanisms and in vitro test methods: a review.** *ATLA.* 23: 790-799.
- Gugler, R., Leschik, M. and Dengler, H. J. (1975) **Disposition of quercetin in man after single oral and intravenous doses.** *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 9: 229 – 234.
- Haenen, G. R. M. M., Paquay, J. B. G., Korthouwer, R. E. M. and Bast, A. (1997) **Peroxynitrite scavenging by flavonoids.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236: 591-593.
- Harrison, S., Page, C. P. and Spina, D. (1999) **Airway nerves and protein phosphatases.** *Gen. Pharmacol.* 32: 287-298.
- Hartree, E. F. (1972) **Determination of proteins: a modification of the Lowry method that give a linear photometric response.** *Anal. Biochem.* 48: 422-

427.

- Havsteen, B. H. (2002) **The Biochemistry and Medicinal Significance of the Flavonoids.** *Pharmacol. & Therap.* 96: 67-202.
- Hertog, M. G. L. (1996) **Epidemiological evidence on potential health properties of flavonoids.** *Proc. Nutr. Soc.* 55: 385-397.
- Hertog, M. G. L., Feskens, E. J. M, Hollman, P. C. H., Katan, M. B. and Kromhout, D. (1993) **Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study.** *Lancet* 342: 1007–1011.
- Hirano, T., Gotoh, M. and Oka, K. (1994) **Natural flavonoids and lignans are potent cytostatic agents against human leukemic HL 60 cells.** *Life Science* 55: 1061-1069.
- Holland, P. M. and Cooper, J. A. (1999) **Protein modification: Docking sites for kinases.** *Cur. Biol.* 9, 329 – 331.
- Hollman, P. C. H., Van, Trijp, J. M. P., Buysman, M. N. C. P, Vandergaag, M. S., Mengelers, M. J. B., Vries, J. H. M. and Katan, M. B. (1997) **Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man.** *FEBS Lett.* 418: 152-156.
- Hollman, P. C. H. and Katan, M. B. (1998) **Bioavailability and health effects of dietary flavonols in man.** *Arch. Toxicol.* 20: 237-248.
- Hollman, P. C. H., Gaag, M. V. D., Mengelers, M. J. B., Trijp, J. M. P., Vries, J. H. M. and Katan, M. B. (1996) **Absorption and disposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man.** *Free Radical Biol. Med.* 21: 703-707.
- Hu, F., Lu, R., Bao, H. and Liang, M. (2004) **Free radical scavenging activity of extracts prepared from fresh leaves of selected Chinese medicinal plants.** *Fitoterapia* 75: 14-23.
- Hu, M., Krausz, K., Chen, J., Ge, X., Li, J., Gelboin, H. L. and Gonzales, F. J. (2003) **Identification of CYP1A2 as the main isoform for the phase I**

- hydroxylated metabolism of geneistein and a pro-drug converting enzyme of methylated isoflavones.** *Drug. Metab. Dispos.* 31: 924 – 931.
- Huntington, N. D. and Tarlinton, D. M. (2004) **CD45: direct and indirect government of immune regulation.** *Immunol. Lett.* 94:, 167-174
- Jia, Z. (1997) **Protein phosphatases: structures and implications.** *Biochem. Cell. Biol.* 75: 17-26.
- Jin, N.; Hatton, N.D.; Harrington, M.A.; Xia, X.; Larsen, S.H. and Rhoades, R.A. (2000) **H₂O₂-induced EGR-1, Fra-1, and C-Jun gene expression is mediated by tyrosine kinase in aortic smooth muscle cells.** *Free Rad. Biol. Med.* 29: 736-746.
- Kang, T. B., and Liang, N. C. (1997) **Studies on the inhibitory effects of quercetin on the growth of HL-60 leukemia cells.** *Biochem. Pharmacol.* 54: 1013-1018.
- Kawada, M., Amemiya, M., Ishizuka, M. and Takeuchi, T. (1999) **Cytostatin, an inhibitor of cell adhesion to extracellular matrix, selectively inhibits protein phosphatase 2A.** *Biochim. Biophys. Acta.* 1452: 209-217.
- Kim, H. K., Cheon, B. S., Kim, Y. H., Kim, S. Y. and Kim, H. P. (1999) **Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure-activity relationships.** *Biochem. Pharmacol.* 58: 759-765.
- Kong, A. T., Yu, R., Hebbar, V., Chen, C., Owuor, E., Hu, R. and Mandlekar, S. (2001) **Signal transduction events elicited by cancer prevention compounds.** *Mutat. Res./Fund. Mol. Mech. Mut.* 480-481: 231-241.
- Korkina, L. G. and Afanas'ev, I. B. (1997) **Antioxidant and chelating properties of flavonoids.** *Adv. Pharmacol.* 38: 151-163.
- Kuo, S. M. (1996) **Antiproliferative potency of structurally distinct dietary flavonoids on human colon cancer cells.** *Cancer Lett* 110: 41-48.
- Laidler, P.M.; Taga, E.M. and Van Etten, R.L. (1982) **Human liver acid phosphatases: Cysteine residues of the low-molecular-weight enzyme.**

Arch. Biochem. Biophys. 216: 512-521.

Le Marchand, L., Murphy, S. P., Hankin, J. H., Wilkens, L. R. and Kolonel, L. N. (2000) **Intake of flavonoids and lung cancer.** *J. Nat. Cancer Inst.* 92: 154-160.

Lee, H., Yeom, H., Kim, Y.G., Yoon, C.N., Jin, C., Choi, J.S., Kim, B.R., Kim, D.H. (1998) **Structure-related inhibition of human hepatic caffeine N3-demethylation by naturally occurring flavonoids.** *Biochem. Pharmacol.* 55: 1369 - 1375.

Lepley, D. M. and Pelling, J. C. (1997) **Induction of P21/WAF 1 and G1 cell-cycle arrest by the chemopreventive agent apigenin.** *Mol. Carcinog.* 19: 74-82.

Lepley, D. M., Li, B, Birt, D. F. and Pelling, J. C. (1996) **The chemopreventive flavonoid apigenin induces G2/M arrest in keratynocytes.** *Carcinogenesis*, 17: 2367-2375.

Li, L. and Dixon, J. E. (2000) **Form, function, and regulation of protein tyrosine phosphatases and their involvement in human diseases.** *Semin. Immunol.* 12: 75-84.

Loveland, B. E., Johns, T. G., Mackay, I. R., Vaillant, F., Wang. Z. X. and Hertzog, P. J. (1992) **Validation of the MTT dye assay for enumeration of cells in proliferative and antiproliferative assays.** *Biochem. Int.* 27: 501-510.

Metodiewa, D., Jaiswal, A. K., Cenas, N., Dickançaité, E. and Aguilar, J. S. (1999) **Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product.** *Free Radical Biol. & Med.* 26: 107-116.

Middleton, E. JR., Kandaswami, C. and Theoharides (2000) **The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease and Cancer.** *Pharmacol. Rev.* 52: 673 - 751.

Min, B. -S., Nakamura, N., Miyashiro, H., Kim, Y. -H. and Harttori, M. (2000)

- Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and ribonuclease H activities by constituents of juglans mandshurica.** *Chem. Pharmac. Bulletin* 48: 194-200.
- Minato, K. I., Miyake, Y, Fukumoto, S., Yamamoto, K., Kato Y., Shimomura, Y and Osawa, T. (2003) **Lemon flavonoid, eriocitrin, suppresses exercise-induced oxidative damage in rat liver.** *Life Sciences* 72: 1609-1616.
- Minden, A. and Karin, M. (1997) **Regulation and function of the JNK subgroup of MAP kinases.** *Biochim. Biophys. Acta (BBA)* 1333: 85 – 104.
- Miranda, M. A., Okamoto, A. K., Ferreira, C. V., Silva, T. L., Granjeiro, J. M. and Aoyama, H. (2005) **Differential effects of flavonoids on bovine kidney low molecular mass protein tyrosine phosphatase.** *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* Aceito para publicação
- Moon, T., Chi, M. H., Kim, D. -H., Yoon, C. N. and Choi, Y. -S. (2000) **Quantitative structure-activity relationships (QSAR) study of flavonoid derivatives for inhibition of cytochrome P450 1A2.** *Quant. Struc. -Act. Relat.* 19: 257 – 263.
- Moon, Y. H., Su, J. S. And William, W. A. (2001) **Anti-genotoxicity of galangin as a cancer chemopreventive agent candidate.** *Mutat. Res./Rev. in Mutat. Res.* 488: 135-150.
- Moore, F., Weekes, J. and Hardie, D. G. (1991) **Evidence that AMP triggers phosphorylation as well as direct allosteric activation of rat liver AMP-activated protein kinase.** *Eur. J. Biochem.* 199:691-697.
- Morita, K., Nishikawa, M., Kobayashi, K., Deguchi, K., Itoh, M., Nakano, T., Shima, H. Nagao, M., Kuno, T., Tanaka, C. and Shirakawa, S. (1992) **Augmentation of retinoic acid-induced granulocytic differentiation in HL-60 leukemia cells by serine/threonine protein phosphatase inhibitors.** *FEBS Lett.* 314: 340-344.

- Mosmann, T. (1983) **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.** *J. Immunol. Meth.* 65: 55-63.
- Murakami, S., Muramatsu, M. and Tomisawa, K. (1999) **Inhibition of gastric H⁺, K⁺-ATPase by flavonoids: A structure-activity study.** *J. Enz. Inhib.* 14: 151-166.
- Mustelin, T., Alonso, A., Bottini, N, Huynh, H, Rahmouni, S., Nika, K, Louis-dit-Sully, C., Tautz, L., Togo, S. H., Bruckner, S., Duran, A. V. M. and al-Khoury, A. M. (2004) **Protein tyrosine phosphatases in T cell physiology.** *Mol. Immunol.* 41: 687 – 700.
- Neel, B. G. and Tonks, N. K. (1997) **Protein tyrosine phosphatases in signal transductio.** *Cur. Op. Cell Biol.* 9: 193-204.
- Newburger, P. E., Chovoniec, M. E., Greenberger, J. S. and Cohen, H. J. (1979) **Functional changes in human leukemic cell line HL-60.** *J. Cell Biol.* 82: 315-322.
- Nikolovska-Coleska, Z., Suturkova, L., Dorevski, K, Krbavacic, A. and Solmajer, T. (1998) **Quantitative structure-activity relationships of flavonoid inhibitors of p56(lck) protein tyrosine kinase: A classical/Quantum chemical approach.** *Quant Structure-Act. Relationships* 17: 7-13.
- Noumi, K. H., Tsuchiya, T., Moriyama, Y. and Noumi, T. (2000) **Intra- and intermolecular interactions of the catalytic domains of human CD45 protein tyrosine phosphatase.** *FEBS Lett.* 468: 68-72.
- Olivier, P., Testard, P., Marzin, D. and Abbott, D. (1995) **Effect of high polyol concentrations on the neutral red absorption assay and tetrazolium-MTT test of rat hepatocytes in primary culture.** *Toxicon. Vitro.* 9: 133-138.
- Ono, K. and Nakane, H. (1990). **Mechanisms of inhibition of various cellular DNA and RNA polimerases by several flavonoids.** *J. Biochem.* 108: 609–

613.

- Otake, Y. and Walle, T. (2001) **Oxidation of the flavonoids galangin and kaempferide by human liver microsomes and CYP1A1, CYP1A2 and CYP2C9.** *Drug. Metab. Dispos.* 30: 103-105.
- Paganga, G. and Rice-Evans, C. A. (1997) **The identification of flavonoids as glycosides in human plasm.** *FEBS Lett.* 401: 78-82.
- Palou, E., de la Fuente-García, M. A., Nicolás, J. M., Vilardell, C., Vives, J. and Gayá, A. (1997) **CD148, a membrane protein tyrosine phosphatase, is able to induce tyrosine phosphorylation on human lymphocytes.** *Immunol. Lett.* 57 (1) 101-103.
- Pezutto, J. M. (1997) **Plant-derived anticancer agents.** *Biochem. Pharmacol.* 53: 121-133.
- Renzi, D.; Valtonila, M. and Foster, R. (1993) **The evaluation of a multi-endpoint cytotoxicity assay system.** *ATLA.* 21: 89-96.
- Repetto, G. and Sanz, P. (1993) **Neutral red uptake, cellular growth and lysosomal function: in vitro effect of 24 metals.** *ATLA.* 21: 501-507.
- Rice-Evans, C., Miller, N. J. and Paganga, G. (1996) **Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids.** *Free Radical Biol. Med.* 20: 933-956.
- Rodriguez, J. A. and Haun, M. (1999) **Cytotoxicity of trans-dehydrocrotonin from *Croton cajucara* on V79 cells and rat hepatocytes.** *Plant. Med.* 65: 1-5.
- Sabbagh, W. Jr., Flatauer, L. J., Bardwell, A. J. and Bardwell, L (2001) **Specificity of MAP Kinase Signaling in Yeast Differentiation Involves Transient versus Sustained MAPK Activation.** *Mol. Cell* 8: 683 - 691.
- Sasaki, T., J. I. and Penninger J. M. (2001) **New insights into the transmembrane protein tyrosine phosphatase CD45.** *Int. J. Biochem. & Cell Biol.* 33 (11): 1041-1046.
- Shenolikar, S. (1994) **Protein serine/threonine phosphatases—new avenues for**

- cell regulation.** *Annu. Rev. Cell Biol.* 10: 55-86.
- Shimizu, I. (2000) **Sho-saiko-to: Japanese herbal medicine for protection against hepatic fibrosis and carcinoma.** *J. Gastroenterol. Hepatol.* 15: 84-90.
- Shimizu, K., Kondo, R. and Sakai, K. (2000) **Inhibition of tyrosinase by flavonoids stilbenes and related 4-substituted resorcinols: Structure-activity investigations.** *Planta Medica* 66: 11-15.
- Shinozuka, K, Kikuchi, Y, Nishino, C., Mori, A. and Tawata, S. (1988) **Inhibitory effect of Flavonoids on DNA-dependent DNA and RNA polymerases.** *Experientia* 44: 882–885.
- SoKoloski, J. A. and Sortorelli, A. C. (1997) **Induction of the differentiation of HL-60 promyelocytic leukemia cells by nonsteroidal anti-inflammatory agents in combination with low levels of vitamin D₃.** *Leukemia. Res.*, 22: 153-161.
- Solimani, R. (1997) **The flavonols quercetin, rutin and morin in DNA solution: UV-vis dichroic (and mid-infrared) analysis explain the possible association between the biopolymer and a nucleophilic vegetable-dye.** *Biochim. Biophys. Acta* 1336: 281-294.
- Srivastava, A. K. (1985) **Inhibition of phosphorylase kinase, and tyrosine protein kinase activities by quercetin.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 131: 1–5.
- Swanson, R. V., Alex, L. A. and Simon M. I. (1994) **Histidine and aspartate phosphorylation: two-component systems and the limits of homology.** *Trends Biochem. Sciences* 19: 485 – 490.
- Taga, E. M. and Van Etten, R. L. (1982) **Human liver acid phosphatase: purification and properties of a low molecular weight isoenzymes.** *Arch. Biochem. Biophys.* 214: 505-515.
- Takakura, K., Beckman, J. S., MacMillan-Crow, L. A. and Crow, J. P. (1999) **Rapid and irreversible inactivation of protein tyrosine phosphatases PTP1B, CD45, and LAR by peroxynitrite.** *Arch. Biochem. Biophys.* 369: 197-207.

- Tanoue, T., Moriguchi, T. and Nishida, E. (1999) **Molecular Cloning and Characterization of a Novel Dual Specificity Phosphatase, MKP-5.** *J. Biol. Chem.*, 274: 19949 – 19956.
- Tanoue, T., Yamamoto, T, Maeda, R. and Nishida, E. (2001) **A Novel MAPK Phosphatase MKP-7 Acts Preferentially on JNK/SAPK and p38 α and β -MAPKs.** *J. Biol. Chem.* 276: 26629 - 26639.
- Tonks, N. K. and Neel, B. G. (1996) **From form to function: signaling by protein tyrosine phosphatases.** *Cell* 87: 365-368.
- Tracey, A. S. (2000) **Hydroxamino vanadates: aqueous chemistry and function in protein tyrosine phosphatase and cell cultures.** *J. Inorg. Biochem.* 80: 11-16.
- Tsiani, E., and Fantus, I.G. (1997) **Vanadium compounds: Biological Actions and Potential as Pharmacological Agents.** *Trends Endocrinol. Metabol.* 8: 51-58.
- Tsuchiya, T., Ikeda, N., Obara, K. and Hartshorne, D. J. (1997) **A type 2A protein phosphatase from Clam Smooth Muscle. Use of 4-methylumbelliferyl phosphate as substrate.** *Comp. Biochem. Physiol.* 118B: 17-21.
- Tsyrllov, I. B., Mikhailenko, V. M. and Gelboin, H. V. (1994) **Isozyme- and species-specific susceptibility of cDNA-expressed CYP1A P-450s to different flavonoids.** *Biochim. Biophys. Acta (BBA)* 1205: 325-335.
- Uddin, S and Choudhry, A. (1995) **Quercetin, a bioflavonoid, inhibits the DNA synthesis of human leukemia Cells.** *Biochem. Mol. Biol. Int.* 36: 545–550.
- Uesugi, Y., Fuse, I., Toba, K., Kishi, K., Furukawa, T., Koike, T. and Aizawa, Y. (1999) **Involvement of SHP-1, a phosphotyrosine phosphatase, during myeloid cell differentiation in acute promyelocytic leukemia cell lines.** *Eur. J. Haematol.* 62: (4) 239-245.
- Uzunoglu, S., Uslu, R., Tobu, M., Saydam, G., Terzioglu, E., Buyukkececi, F. and Omay, S. B. (1999) **Augmentation of methylprednisolone-induced differentiation of myeloid leukemia cells by serine/threonine protein**

- phosphatase inhibitors.** *Leukemia. Res.* 23: 507-512.
- Vetter, S. W., Keng, Y. F., Lawrence, D. S. and Zhang, Zhong-Yin. (2000) **Assessment of protein-tyrosine phosphatase 1B substrate specificity using “Inverse alanine scanning”.** *J. Biol. Chem.* 275: 2265-2268.
- Wada, S., He, P., Watanabe, N., Sakata, K. and Sugiyama (1999) **Suppression of D-galactosamine-induced rat liver injury by glycosidic flavonoids-rich fraction from green tea.** *Biosci. Biotechnol. biochem.* 63: 570 - 572.
- Walle, T. (2004) **Absorption and metabolism of flavonoids.** *Free Rad. Biol. & Med.* 36: 829-837
- Walle, T., Otake, Y., Brubaker, J. A., Walle, U. K. and Halushka, P. V. (2001) **Disposition and metabolism of the flavonoid chrysin in normal volunteers.** *Br. J. Clin. Pharmacol.* 51: 143 – 146.
- Walton, K. M. and Dixon, J. E. (1993) **Protein tyrosine phosphatases.** *Annu Rev. Biochem.* 62: 101-120.
- Wang, H. K., Xia, Y., Yang, Z. Y., Natschke, S. L. and Lee, K. H. (1998) **Recent advances in the discovery and development of flavonoids and their analogues as antitumor and anti-HIV agents.** *Adv. Exp. Med. Biol.* 439: 191-225.
- Wang, I. K., Lin-Shiau, S. Y. and Lin, J. K. (1999) **Introduction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells.** *Eur. J. Cancer* 35: 1517-1524.
- Wang, R. H., Liu, C. W. Y., Avramis, V. I. and Berndt, N. (2001) **Protein phosphatase 1 alpha-mediated stimulation of apoptosis is associated with dephosphorylation of the retinoblastoma protein.** *Oncogene.* 20: 6111-6122.
- Wang, X. Z. and Ron, D (1996) **Stress-Induced Phosphorylation and Activation of the Transcription Factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase.** *Science* 272: 1347 - 1349.

- Weber, K and Osborn, M. (1969) **The reability of molecular weight determination by dodecyl sulfate – poliacrilamide gel eletrophoresis.** *J. Biol. Chem.* 244: 4406 – 4412.
- Weiseman, H. (1996) **Dietary influences on membrane function: Importance in protection against oxidative damage and disease.** *Nutr. Biochem.* 7: 2 – 15.
- Williams, R., Spencer, J. P. E. and Rice-Evans, C. (2004) **Flavonoids: antioxidants or signalling molecules?** *Free Rad. Biol. and Med.* 36: 838-849
- Yamaga, A.; Taga, M.; Hashimoto, S. and Ota, C. (1999). **Comparison of bone metabolic markers between maternal and cord blood.** *Hormone Res.* 51: 277-279.
- Yang, X. and Gabuzda, D. (1998) **Mitogen-activated Protein Kinase Phosphorylates and Regulates the HIV-1 Vif Protein.** *Biol. Chem.* 273: 29879 – 29887.
- Yassad, A., Lavoinne, A., Bion, A., Daveau, M. and Husson, A. (1997) **Glutamine accelerates interleukin-6 productio by rat peritoneal macrophages in culture.** *FEBS Lett.* 413(1): 81-84
- Zhai, S., Daí, R., Wei, X, Friedman F. K. and Vestal, R. E. (1998) **Inhibition of methoxyresorufin demethylase activity by flavonoids in human liver microsomes.** *Life Sciences* 63:119 – 123.
- Zhang, M., Zhou, M., Van Etten, R. L. and Stauffacher, C. V. (1997) **Crystal structure of bovine low molecular weight phosphotyrosyl phosphatase complexed with the transition state analog vanadate.** *Biochem.* 36: 15-23.
- Zhang, Z. Y. (2001) **Protein tyrosine phosphatases: prospects for therapeutics.** *Current.Opinion in Chemical Biology.* 5: 416-423.
- Zhang, Z. Y. (2003) **Mechanistic Studies on Protein Tyrosine Phosphatases.** *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 73: 171 - 220.
- Zhang, Z. Y. and Dixon, J. E. (1993) **Active site labeling of the Yersinia protein tyrosine phosphatase: The determenation of the pK_a of the active site**

cysteine and the function of the conserved histidine 402. *Biochemistry.* 32: 9340-9345.

Zhang, Z.Y., Zhou, B., Xie, L. (2002). **Modulation of protein kinase signaling by protein phosphatases and inhibitors.** *Pharm.Therap.* 1:1-11.

Zi, X., Mukhtar, H and Agarwal, R. (1997) **Novel cancer chemopreventive effects of a flavonoid antioxidant silymarin: inhibitor of mRNA expression of an endogenous tumor promoter TNF.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239: 334-399.

Zolnierowicz, S. (2000) **Type 2A Protein Phosphatase, the Complex Regulator of Numerous Signaling Pathways.** *Biochem. Pharmacol.* 60: 1225-1235.