

Paty Karoll Picardi

RELAÇÃO ENTRE A ATIVIDADE DA PROTEÍNA TIROSINA
FOSFATASE E A AÇÃO CITOTÓXICA DE ANTIMALÁRICOS
SOBRE LINFÓCITOS HUMANOS

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Paty Karoll Picardi
[assinatura]
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Departamento
de Bioquímica do Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do título de Mestre em
Biologia Funcional e Molecular, na área
de Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Carmen Veríssima Ferreira

Co-Orientador: Prof. Dr. Hiroshi Aoyama

2002

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	T/Unicamp
	P58r
V	EX
TOMBO BC/	53029
PROC.	16-127-03
C	☐
D	☒
PREÇO	
DATA	02-04-03
Nº CPD	

CM00181391-7

313 10 287614

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

P58r **Picardi, Paty Karoll**
 Relação entre a atividade da proteína tirosina fosfatase e a ação
 citotóxica de antimaláricos sobre linfócitos humanos/Paty
 Karoll Picardi. --
 Campinas, SP: [s.n], 2002.

Orientador: Carmen Veríssima Ferreira

Co-Orientador: Hiroshi Aoyama

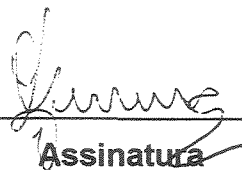
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.

Instituto de Biologia

1.Linfócitos. 2.Fosfatase. 3.Citotoxicidade. 4.Antimaláricos.
 I.Ferreira, Carmen Veríssima. II.Aoyama, Hiroshi. III.Universidade
 Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV.Título.

BANCA EXAMINADORA:

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


Assinatura

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


Assinatura

Prof. Dr. Ronilson Agnaldo Moreno
UNICAMP - FCM - Dep. Farmacologia


Assinatura

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


Assinatura

Dedico este trabalho

Aos meus pais, Célia e Antônio, por sempre zelarem pela minha educação e meu bem estar, me apoiando nos momentos em que mais precisei. Minha eterna gratidão. Agradeço aos meus irmãos Larissa e Alyson, pelo imenso carinho e incentivo.

Ao Prof. Hiroshi Aoyama, uma pessoa inigualável em seu caráter e bondade, sempre muito sábio, contribuindo não só para o meu desenvolvimento intelectual, mais acima de tudo pessoal.

À Carmen, uma pessoa dinâmica, empreendedora, muito capaz. Agradeço a oportunidade de ter estado ao seu lado esse tempo. Pelos momentos agradáveis e de aprendizado, sua amizade e confiança. Por sua paciência e dedicação, não poupando esforços para o meu desenvolvimento.

Ao meu namorado Geraldo, por muitos momentos felizes de minha vida e por toda a sua compreensão e apoio.

À minhas eternas amigas, que participaram de uma maneira muito especial
nessa etapa da minha vida:

À Ana Claudia, pelos conselhos sensatos e por toda a sua dedicação comigo. Uma pessoa que vou guardar para sempre em meu coração.

À Cristiane por dividir comigo momentos bons e difíceis, sua colaboração foi muito importante no desenvolvimento desse trabalho. Uma amiga para todas as horas.

À Karina por estar ao meu lado desde o início dessa jornada, me dando apoio e incentivo. Uma amiga fiel.

À Telma pela sua amizade, alegria e principalmente pelo seu companherismo, sempre muito prestativa.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela minha vida!!!

À professora Dra. Marcela Haun, pelo acolhimento em seu laboratório para a realização dos experimentos de citotoxicidade.

À Patrícia da Silva Melo, pelo seu auxílio durante a minha passagem no laboratório de cultura de células.

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

À Andréia e a Marina, secretárias do Departamento de Bioquímica, pela dedicação e atenção.

A todos do laboratório de Enzimologia, em especial Niko, Cláudio, Márcio, Alexandre e Érika que colaborarão para o andamento do meu trabalho, e por momentos agradáveis.

À Janaína por me acolher em sua casa, no momento em que mais precisei.

Ao André Okamoto, pela sua amizade, paciência e colaboração sempre nos momentos em que eu o solicitei.

À Marilena, uma pessoa especial que sempre tem uma palavra amiga para dar.

Aos Voluntários (doadores de sangue) que tornaram possível a execução desse trabalho.

Ao Daniel, que contribui para que trabalho ficasse mais completo.

Aos professores Ronilson e José Camillo pela contribuição ao trabalho.

A todos do departamento de Bioquímica que de alguma forma contribuíram para a realização desta dissertação.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Fosfatases	1
1.2. Importância das proteínas fosfatases	1
1.3. Classificação das proteínas fosfatases	2
1.3.1. Proteínas tirosinas fosfatases (PTPs)	3
1.3.2. Proteínas serinas/ treoninas fosfatases	5
1.4. Linfócitos X Proteínas fosfatases	7
1.5. Fosfatases como Biomarcador	10
1.6. Fármacos Antimaláricos	11
1.6.1. Cloroquina	12
1.6.2. Quinina	14
1.6.3. Desferoxamina	15
1.7. Estudo de Citotoxicidade	16
2. OBJETIVOS	20
3. METODOLOGIA	21
3.1. Materiais	21
3.2. Métodos	21
3.2.1. Obtenção de linfócitos	21
3.2.2. Separação dos linfócitos do sangue total	21
3.2.3. Obtenção das fosfatases de membrana e citoplasmática	22
3.2.4. Estudo Cinético	22
a) Obtenção da fosfatase total de linfócitos	22
b) Determinação da atividade enzimática	22
c) Efeito de antimaláricos, antioxidantes e desferoxamina na	23

13. Efeito da cloroquina em presença do ácido ascórbico e GSH na atividade da PTP de linfócitos	43
14. Efeito da desferoxamina em presença do ácido ascórbico e GSH na atividade da PTP	44
15. Efeito da desferoxamina na ação dos antimaláricos (cloroquina e quinina) na atividade da PTP de linfócitos	48
16. Avaliação da citotoxicidade da cloroquina em linfócitos humanos.	53
17. Avaliação da citotoxicidade da quinina em linfócitos humanos.	56

ABREVIATURAS

CD45	Antígeno comum de leucócito (Proteína tirosina fosfatase)
Cdc25	Controle da divisão celular (Proteína tirosina fosfatase dual)
DAG	Diacilglicerol
GSH	Glutathiona reduzida
IC₅₀	Concentração que inibe 50% da atividade enzimática/viabilidade celular
IP3	Inositoltrifosfato
MAPK(s)	Proteína(s) quinase(s) ativada(s) por mitógeno(s)
MAPK(s)	Proteína (s) quinase (s) ativada(s) por mitógeno(s).
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio)
NFAT	Fator de transcrição nuclear de células T ativadas
Pi	Fosfato inorgânico
PKC	Proteína quinase C
pNPP	p-Nitrofenilfosfato
PTP	Proteína tirosina fosfatase
Raf	Proteína serina treonina quinase
Ras	Proteínas ativadora de GTP
Rb	Retinoblastoma
SHP-1/SHP-2	Proteína tirosina fosfatase citoplasmática que contém Domínio SH2

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito de antimaláricos na atividade das fosfatases isoladas de linfócitos humanos e a ação destes fármacos na viabilidade dos linfócitos. A atividade fosfatásica foi determinada através da dosagem do p-nitrofenol e a viabilidade celular foi avaliada através de 3 parâmetros: redução do MTT (integridade mitocondrial), dosagem de proteína (indicação do número de células) e atividade fosfatásica (metabolismo celular). A cloroquina não apresentou efeito significativo sobre as fosfatases de membrana, citoplasmáticas e da fração total. No entanto, o efeito inibitório de 25% sobre as fosfatases citoplasmáticas e de 30% fração total foi observado após pré incubação da enzima na presença da quinina. Ao contrário dos outros antimaláricos, a desferoxamina ativou as fosfatases da fração total (40%) e de membrana (70%). Nos estudos de citotoxicidade a cloroquina mostrou baixa citotoxicidade analisando a atividade da fosfatase total ($IC_{50}=360\mu M$) e quantificação de proteína ($IC_{50}=346\mu M$), quando comparada com a maior toxicidade observada para o teste do MTT ($IC_{50}=75\mu M$). A quinina também apresentou uma toxicidade maior para a mitocôndria (aumento de 130% na redução do MTT), quando comparado com a quantificação da proteína e atividade fosfatásica (inibição de 40%). Nossos resultados sugerem que a ação citotóxica dos antimaláricos (quinina e cloroquina) pode ser devido a dois fatores: inibição direta de proteínas fosfatases, já que estudos cinéticos mostraram que as fosfatases predominantes em linfócitos são proteínas tirosina fosfatases e proteínas serina/treonina fosfatases ou inibição de enzimas dependentes de grupamento sulfidril e alteração de organelas como mitocôndria por induzirem estresse oxidativo. A desferoxamina teve uma ação ativadora sobre as proteínas fosfatases de membrana, provavelmente agindo na CD45. A presença de antioxidantes (GSH e ácido ascórbico) causou ativação das fosfatases, porém, em presença da quinina, cloroquina e desferoxamina essa ativação foi ainda maior.

ABSTRACT

The aim of this work was to verify the effect of antimalarial drugs in phosphatases isolated from human lymphocytes and the action of these pharmaceutical drugs on lymphocytes viability. Phosphatase activity was determined through the p-nitrophenol assay and cell viability through 3 parameters: MTT reduction (mitochondrial integrity), protein content (cell number index) and phosphatase activity (cell metabolism). Phosphatases from membrane and cytoplasm were not affected by chloroquine. However, an inhibitory effect on cytoplasmic phosphatases (30%) on total fraction (25%) was observed after pre-incubation of the enzyme in presence of the quinine. In contrast to other antimalarials desferoxamine, the phosphatases activated from the total fraction and membrane, 40 and 70%, respectively. In the cytotoxicity studies, chloroquine showed low cytotoxicity when the activity of total phosphatase ($IC_{50}=360\mu M$) and protein content ($IC_{50}=346\mu M$) were analysed, when compared to the toxicity observed with MTT test ($IC_{50}=75\mu M$). Quinine also had a high toxicity for the mitochondria (130% increased MTT the reduction), when compared to protein quantification and phosphatase activity (40% inhibition). Our results suggest that the cytotoxic action of antimalarials (quinine and chloroquine) can be due to two factors: direct inhibition of protein phosphatases, since kinetic studies had shown that the predominant phosphatases in lymphocytes are protein tyrosine phosphatases and protein serine/threonine phosphatases or inhibition of sulfhydryl group dependent enzymes and alteration of organelas such as mitochondria by inducing oxidative stress. Desferoxamine had an activator action in membrane protein phosphatases of, probably acting on the CD45. Antioxidant substances (GSH and ascorbic acid) caused activation of phosphatases, but, in presence of quinine, cloroquine and desferoxamine this activation was more significative.

INTRODUÇÃO

1.1. Fosfatases

Fosfatases são enzimas da classe das hidrolases que catalisam a desfosforilação de fosfato monoésteres. Estas enzimas podem ser divididas em 3 famílias: fosfatases ácidas, fosfatases alcalinas e proteínas fosfatases (Bernier and Wang, 1995; Jia, 1997). Estas hidrolases estão amplamente distribuídas nos diferentes tecidos e compartimentos celulares (Duff *et al.*, 1994; Lee, 1998; Ferreira *et al.*, 1998b; Harrison *et al.*, 1999).

Enquanto as proteínas fosfatases atuam desfosforilando resíduos de aminoácidos (Tyr, Thr e Ser) em proteínas, as fosfatases ácidas e alcalinas atuam hidrolisando moléculas menores como açúcares, pirofosfato, nucleotídeos, etc. (Granjeiro, 1994).

1.2. Importância das proteínas fosfatases

A fosforilação e desfosforilação de proteínas é a base para o controle de diversos eventos biológicos, disparados por efetores extracelulares como hormônios, mitógenos, citocinas e neurotransmissores (Harrison, *et al.*, 1999; Ostman and Bohmer, 2001). Serina, treonina e tirosina são os resíduos de aminoácidos predominantemente fosforilados, apesar da histidina também ser alvo para a fosforilação (Swanson *et al.*, 1994). A fosforilação reversível de proteínas catalisada pela ação oposta de proteínas quinases e fosfatases representa o mecanismo regulatório mais comum em células eucarióticas (Zolnierowicz, 2000; Chinkers, 2001), envolvendo vias de sinalização que regulam o metabolismo,

expressão gênica, divisão celular, diferenciação, desenvolvimento, apoptose, contração, transporte, locomoção celular, aprendizado e memória (Johnson and Barford, 1993; Denu *et al.*, 1996; Ramponi *et al.*, 1997; Harrison *et al.*, 1999; Krebs and Graves, 2000). Estima-se que 30% das proteínas intracelulares são fosfoproteínas e aproximadamente 4% do genoma eucariótico codifique proteínas quinases e fosfatases, o que sugere a importância dessas duas classes de enzimas (Hunter, 1995).

As atividades das proteínas quinases e fosfatases são cuidadosamente reguladas *in vivo*. Mudanças anormais nas atividades dessas enzimas podem trazer severas consequências, incluindo câncer e doenças resultantes de defeitos imunológicos (Harrison *et al.*, 1999; Alexander, 2000). Esses dados, ressaltam a importância de se ter um esclarecimento maior do papel das proteínas fosfatases em diversas vias de transdução, já que muito tem sido estudado sobre o papel das proteínas quinases.

1.3. Classificação das proteínas fosfatases

As proteínas fosfatases são classificadas com base na sua especificidade pelo substrato, dependência de cátions para a atividade e sensibilidade frente aos inibidores e ativadores (Ingebritsen and Cohen, 1983). Elas podem ser agrupadas em duas grandes famílias de acordo com a especificidade por substratos: proteínas tirosina fosfatases e proteínas serina/treonina fosfatases (Jia, 1997; Harrison *et al.*, 1999).

1.3.1. Proteínas Tirosina Fosfatases (PTPs)

As PTPs comumente apresentam uma cadeia polipeptídica onde o sítio ativo apresenta aproximadamente 250 resíduos de aminoácidos, no qual existe uma sequência assinatura de 11 resíduos altamente conservada [(Ile/Val)-His-Cys-X-Ala-Gly-Arg-(Ser/Thr)-Gly] - (X = qualquer aminoácido) - (Walton and Dixon, 1993). Nessa região conservada, os resíduos de Cys e Arg são essenciais para a catalise (Jia, 1997). A presença de cisteína no sítio ativo é responsável pela característica comum das proteínas tirosina fosfatases de serem inibidas pelo vanadato, pervanadato, p-cloromercuribenzoato e agentes oxidantes (Tonks and Neel, 1996; Tsiani and Fantus, 1997; Jin *et al.*, 2000). *In vivo*, a atividade da PTP pode ser regulada pelo estado redox celular (Thomas and Mallis, 2001). O peróxido de hidrogênio pode apresentar função como segundo mensageiro através de vários mecanismos, dentre os quais, inibindo a atividade da PTP por oxidar resíduos de cisteína essenciais para a catálise. Este efeito é transiente pois, antioxidantes como tiredoxina e GSH regeneram o grupamento SH (Denu and Tanner, 1998; Allen and Tresini, 2000; Thomas and Mallis, 2001).

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

Proteínas tirosina fosfatases específicas

As proteínas tirosina fosfatases específicas têm como alvo apenas proteínas contendo resíduos de tirosina fosforilados e podem ser subdivididas em dois grupos: tipo receptor e intracelular. As proteínas tirosina fosfatases tipo

receptor, exemplificadas pelas CD45 e PTP α , geralmente apresentam um segmento extracelular que é caracterizado pela presença de motivos presentes em domínios das moléculas de adesão, como fibronectina. Portanto, estas fosfatases estão envolvidas na comunicação célula-célula e transdução de sinal (Maehama e Dixon, 1998; Alexander, 2000). As proteínas intracelulares exemplificadas por PTP1B e SHP-2 participam de vários eventos celulares, tais como antagonistas da ação oncogênica das proteínas quinases Src e Neu (Brown-Shimer *et al.*, 1992). Uma potencial ligação da PTP1B no controle da ação da insulina também tem sido demonstrado (Kenner *et al.*, 1993).

Proteínas fosfatases com dupla especificidade (dual)

As proteínas fosfatases com dupla especificidade (tipo VH1; cdc25; MAP-1) utilizam como substratos proteínas que apresentam aminoácidos tirosina, como também serina e treonina fosforilados. Algumas ainda, hidrolisam outros substratos além de fosfoproteínas (Maehama and Dixon, 1998; Zhang, 2001). Estas fosfatases apresentam importante papel na regulação da transdução de sinal mitogênico e controlam o ciclo celular (Wu and Sun, 1999).

PTP de baixa massa molecular relativa

Estas fosfatases hidrolisam apenas proteínas contendo resíduos de tirosina fosforilados e parecem desempenhar importante papel na regulação da proliferação celular, uma vez que a alta expressão desta enzima inibe a proliferação de células normais e transformadas (Harrison *et al.*, 1999).

1.3.2. 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 proteínas fosfatases podem ser classificadas como tipo 1 (PP1) e tipo 2 (PP2), dependendo da sua especificidade pelo substrato e sensibilidade a inibidores (Jia, 1997). As do tipo 2 são subdivididas em outros tipos, incluindo PP2A, PP2B e PP2C (dependente de magnésio). Garcia e colaboradores (2000) relataram recentemente, outros tipos de proteínas serina/treonina fosfatases: PP4, PP5 e PP6 (Harrison *et al.*, 1999).

PP1 regula uma ampla variedade de processos celulares (Cohen, 1988), incluindo a progressão do ciclo celular, proliferação celular, transcrição, síntese de proteínas e neurotransmissão (Cohen, 1989; Shenolikar, 1994). Dados genéticos, farmacológicos e bioquímicos revelaram que a PP1 é a principal fosfatase envolvida na regulação do metabolismo do glicogênio em resposta a insulina e adrenalina (Denu *et al.*, 1996), mitose (Sakurada *et al.*, 1992), meiose (Huchon *et al.*, 1981), contração muscular (Shenolikar, 1994; Wera and Hemmings, 1985) e outros eventos do ciclo celular (Cyert and Thorner, 1989). Ao contrário das outras proteínas serina/treonina fosfatases, a PP1 e PP2A não têm necessidade absoluta de cátions divalentes (Jia, 1997), ambas estão relacionadas à regulação da proteína quinase dependente de Ca^{+2} /calmodulina (Harrison *et al.*, 1999) e são potencial e especificamente inibidas por ácido okadáico e microcistina (Mackintosh and Mackintosh, 1994). A PP2A representa a principal fração de proteínas serina/treonina fosfatases ativas em extratos celulares (Labib and Nurse,

1993), a qual está claramente envolvida na regulação da transcrição e do ciclo celular (Garcia *et al.*, 2000). Algumas evidências genéticas colocam a PP2A como um regulador da progressão do ciclo celular por atuar sobre proteínas que controlam diferentes fases do mesmo, como por exemplo, atuando sobre a proteína retinoblastoma (Rb), a qual é responsável pelo controle da progressão do ciclo celular da fase G1 para S (Zolnierowicz, 2000).

PP2B também conhecida como calcineurina é dependente de calmodulina e Ca^{+2} , insensível ao ácido okadáico, e é primordial para diversos processos celulares incluindo ativação dos linfócitos T (Shenolikar and Nairn, 1991). A óxido nítrico sintase é um substrato para a PP2B, esta enzima na forma desfosforilada apresenta alta atividade, resultando no aumento da produção de óxido nítrico e consequentemente ação neurotóxica (Dawsow *et al.*, 1993).

Em eucariotos, a PP2C participa na resposta celular ao estresse, sendo dependente de Mg^{+2} e insensível ao ácido okadaico (Moore *et al.*, 1991).

A PP4 pertence à mesma família da PP1 e PP2A por demonstrar aproximadamente 60% de homologia com este grupo. A distribuição celular desta enzima é ampla, sendo encontrada em centrômeros, núcleo e citoplasma sugerindo que PP4 tenha funções variadas (Da Cruze *et al.*, 1988; Brewis *et al.*, 1993). A PP4 pode estar envolvida na duplicação do centrômero e também em vários estágios da mitose (exceto telófase) - (Brewis *et al.*, 1993).

A PP5 tem sido encontrada em todos os tecidos humanos examinados sugerindo que esteja localizada no núcleo (Fischer *et al.*, 1989). Acredita-se estar envolvida na regulação da síntese de RNA, mitose, sinalização em resposta aos

hormônios esteróides e crescimento celular. (Harrison *et al.*, 1999; Chinkers, 2001).

A PP6 exibe uma homologia com PP2A (57%) e PP4 (59%), tendo um papel importante na regulação da transcrição (Harrison *et al.*, 1999, Chinkers, 2001).

1.4. LINFÓCITOS X PROTEÍNAS FOSFATASES

As fosfatases estão amplamente distribuídas no sangue e vários autores têm demonstrado a presença destas enzimas no plasma/soro, eritrócitos e em leucócitos (Schiele *et al.*, 1988; Villar *et al.*, 1997; Ben-Arie *et al.*, 1999).

Nos linfócitos, as proteínas fosfatases têm auxiliado na elucidação de vários eventos celulares dependentes de desfosforilação/fosforilação, como ativação destas células provocada por diversos efetores extracelulares, incluindo as lectinas: fitohemaglutinina (PHA), concanavalina A (Con A) ou "pokeweed" (Szamel *et al.*, 1997; Quade and Roth, 1999). Leucócitos expressam uma variedade de proteínas tirosina fosfatases citoplasmáticas e de membrana (Palou *et al.*, 1997).

Os linfócitos T apresentam pelo menos dois tipos de proteínas fosfatases características: uma PTP tipo receptor (CD45) e uma proteína Ser/Thr fosfatase citoplasmática (calcineurina ou PP2B), as quais apresentam importante papel em várias vias de transdução de sinal, como por exemplo, a ativação dos linfócitos via interleucina 2, como indicado no esquema que se segue.

esses complexos bloqueia a ativação dos linfócitos T estimulados por Ca^{+2} . Desta forma, inibe a desfosforilação da forma citoplasmática do NFAT (fator de transcrição nuclear de linfócitos T), responsável pela regulação do gene da interleucina-2 (citocina indutora da proliferação das células T), fundamental para a proliferação de linfócitos T e portanto, para a resposta imune (Harrison *et al.*, 1999; Baksh and Burakoff, 2000).

Além da via citada acima, a produção da IL2 também é ativada através da proteína Ras, a qual ativa a proteína Raf, responsável pela ativação da MEK. Esta quinase atua sobre a MAPK deixando-a ativa, e esta enzima ao fosforilar fatores de transcrição como o NFAT, ocorre a expressão do gene da IL2.

1.5. FOSFATASES COMO BIOMARCADOR

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

Na literatura há citações de diversas macromoléculas sendo utilizadas como biomarcadores: fosfatases como biomarcadores do tratamento e monitoramento de pacientes com câncer de ovário e osteoporose (Ben-Arie *et al.*, 1999) e succinato desidrogenase como biomarcador da viabilidade celular (funcionamento da mitocôndria)- (Repetto and Sanz, 1993).

Dessa forma, como as proteínas fosfatases desempenham diferentes papéis no metabolismo celular, as mesmas podem ser úteis como indicadores não só do funcionamento celular, mas também da via envolvida na resposta celular frente a agentes externos, como por exemplo, fármacos, fornecendo informações

sobre a fisiologia e vias metabólicas de um tipo celular específico (Aoyama *et al.*, 2000).

1.6. FÁRMACOS ANTIMALÁRICOS

A malária é uma das mais sérias doenças parasitárias de grande ocorrência nos países tropicais e subtropicais. Estima-se que cerca de 300 milhões de pessoas são infectadas anualmente, sendo que 2 milhões destas pessoas vão a óbito. Este problema de saúde pública se agrava devido à resistência das cepas às drogas antimaláricas (Egan and Marques, 1999).

A malária humana é causada por quatro espécies de protozoários intracelulares obrigatórios do gênero *Plasmodium*. O ciclo biológico é do tipo heteroxênio, onde o homem é o hospedeiro intermediário e o mosquito o definitivo. O ciclo evolutivo ocorre em duas fases: fase pré-eritrocítica, a qual se processa nos hepatócitos antes de se desenvolver nos eritrócitos (ciclo pré - eritrocítico) e fase eritrocítica, que se processa nos eritrócitos (Mabeza *et al.*, 1999). Apesar da malária poder ser transmitida por transfusão de sangue (sangue infectado), os seres humanos são mais comumente infectados pelos esporozoítos injetados pela picada dos mosquitos fêmeas infectados (gênero *Anopheles*) - (Goodman, 1996).

Os fármacos antimaláricos foram desenvolvidos primeiramente para o tratamento da malária, entretanto podem ser benéficos para outras doenças dermatológicas, imunológicas e reumatológicas, tendo ações imunomoduladoras, antiproliferativa (Wolf and Ruocco, 2000).

1.6.1 Cloroquina

A cloroquina (Figura 2) é considerada a melhor droga antimalárica, tanto no tratamento como na profilaxia, devido à sua alta atividade terapêutica, baixa toxicidade e custo (Egan *et al.*, 1999).

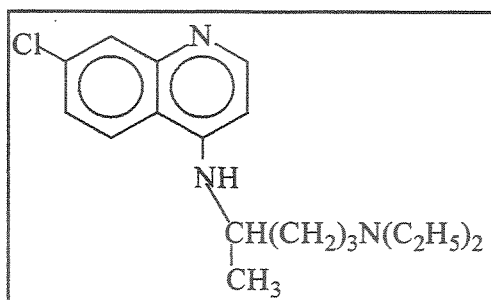


Figura 2 - Estrutura da cloroquina

É altamente eficaz contra as formas eritrocíticas de *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae* e cepas sensíveis à cloroquina do *P. falciparum*. Durante a parasitose ocorre a digestão da hemoglobina do hospedeiro dentro dos vacúolos alimentares ácidos dos plasmódios liberando o heme (ferriprotoporfirina IX), um composto tóxico que atua como receptor da cloroquina e de outros alcalóides antimaláricos (Chou *et al.*, 1980). A cloroquina é uma base fraca, desprotonada e hidrofílica em pH neutro (Olliaro, 2001). Essa interação droga-heme possui propriedades membranolíticas nos plasmódios e eritrócitos, todavia estudos efetuados a respeito das interações entre o heme e uma série de compostos antimaláricos não confirmam por completo esse conceito (Schlesinger *et al.*, 1988). O heme, por sua vez, é detoxificado no parasita pela sua conversão a pigmento malárico insolúvel

inofensivo (hemozoína). A atividade de polimerase do heme do plasmódio, inibida pela cloroquina foi observada catalisando esta reação, dando a idéia de que o heme poderia acumular-se a níveis tóxicos na presença da droga (Goodman, 1996).

Outras sugestões foram propostas como mecanismo de ação da droga como a intercalação do DNA do parasita, interferência com a biossíntese do DNA e RNA parasitário, inibição da protease da hemoglobina ou de outras enzimas pela ligação direta com a droga ou elevando o pH intravacuolar (Goodman, 1996; Olliaro, 2001). Em parte, por serem bases fracas, os esquizonticidas sangüíneos do grupo alcalóide concentram-se, de acordo com o ponto de vista atual, no interior de vesículas ácidas dos parasitas sensíveis, elevando o seu pH, inibindo portanto, a degradação da hemoglobina pela inativação de proteinases vacuolares (Olliaro, 2001).

Outro mecanismo de ação seria a inibição da degradação do heme dependente da glutathione. Tanto o heme livre quanto o complexado com a droga sai do vacúolo e é degradado pela GSH. Essa inibição da degradação do heme pela GSH é inibida competitivamente pela cloroquina, desse modo o heme se acumula nas membranas, alterando as concentrações de Na^+ e K^+ no citoplasma. Essa hipótese é suportada pelo fato das concentrações necessárias para matar o parasita serem inversamente relacionadas com os níveis de GSH (Ginsburg *et al.*, 1998)

A sensibilidade dos plasmódios intra-eritrocitários aos antimaláricos alcalóides pode estar relacionada a bloqueadores do canal de Ca^{+2} que reduzem o

efluxo da cloroquina. Alguns investigadores propuseram uma “permease” para a cloroquina ocorrendo o acúmulo dessa droga em parasitas sensíveis (Goodman, 1996). Mutações em genes que evitam o acúmulo de cloroquina, poderiam explicar um fenótipo de resistência à cloroquina (Goodman, 1996; Olliaro, 2001).

1.6.2 Quinina

A quinina é o principal alcalóide da casca da árvore da chinchona. (Figura 3), sendo são bases fracas e solúveis em lipídios em pH neutro (Olliaro, 2001). A quinina age principalmente como esquizontocida sanguíneo; tem pouco efeito nos esporozoítos ou nas formas pré eritrocitárias dos parasitas da malária.

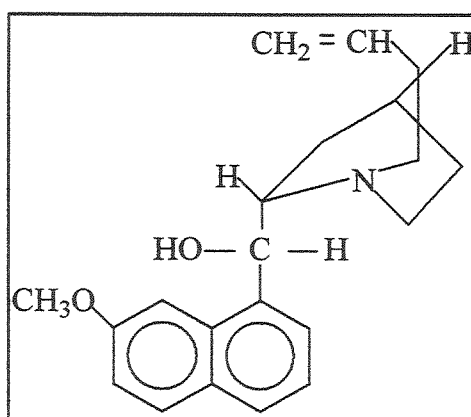


Figura 3 - Estrutura da quinina

O alcalóide também é gametocida para o *P. vivax* e o *P. malariae*, mas não para o *P. falciparum*. Devido a este aspecto da atividade antimalárica, a quinina não é usada para profilaxia. Como agente supressor terapêutico, a quinina é mais tóxica, e é menos eficaz do que a cloroquina contra os parasitas da malária

sensíveis às duas substâncias. Entretanto, a quinina é essencialmente valiosa para o tratamento da doença grave, devido a cepas de *P. falciparum* resistentes à cloroquina e a múltiplos fármacos (Goodman, 1996).

Em parte, devido ao fato de ser uma base fraca, a quinina é altamente concentrada nos vacúolos alimentares ácidos do *P. falciparum*. Propõe-se que a quinina atue nestas organelas, inibindo a atividade da heme polimerase, dessa forma permitindo o acúmulo do seu substrato tóxico, o heme (Goodman, 1996). Ainda não foi estabelecido se o heme induz citotoxicidade por si só ou em complexo com a quinina.

1.6.3. Desferoxamina

A desferoxamina (mesilato de deferoxamina)- (Figura 4) é isolada, do *Streptomyces pilosus* e é tratada quimicamente para se obter o ligante livre de metal. A desferoxamina tem grande afinidade por ferro e baixa afinidade por cálcio (Goodman, 1996).

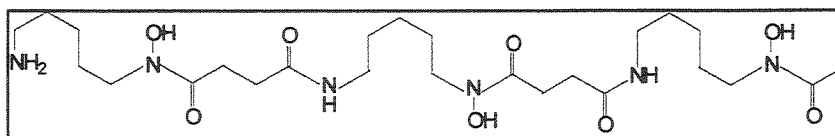


Figura 4 – Estrutura da desferoxamina

Alguns autores têm reportado que a desferoxamina (quelante de ferro) pode agir como antagonista da inibição da polimerização do heme causada pela

cloroquina, uma vez que, este quelante pode interagir com o heme e impedir a lise eritrocitária (Vippagunta *et al.*, 1999).

No entanto, Vippagunta e colaboradores (1997) relataram aumento da ação contra o *Plasmodium* da combinação cloroquina-desferoxamina, *in vitro*.

Quelantes de ferro podem exercer seus efeitos antimaláricos através de dois mecanismos: detendo o crescimento e replicação celular, pela falta de ferro para enzimas importantes e/ou dano celular causado pelo complexo quelante-metal. Esses parasitas parecem ter uma capacidade limitada para se recuperar após privação temporária de ferro causada pelo quelante, ao contrário das células de mamíferos. Essa diferença parece prover a base bioquímica para a seletividade de quelantes contra o *Plasmodium* (Loyevsky *et al.*, 1997).

A capacidade limitada que o parasita tem de se recuperar diante da privação de ferro, se deve a muitos processos metabólicos do eritrócito do parasita serem dependentes de ferro, ocorrendo assim, interferência no metabolismo de carboidratos, inibição da síntese de DNA e síntese de *novο* do heme, perturbação na proteólise da hemoglobina do hospedeiro e da função normal da mitocôndria (Mabeza *et al.*, 1999).

1.7. ESTUDOS DE CITOTOXICIDADE

O estudo toxicológico *in vivo* consome um grande número de animais, o qual acarreta alto custo financeiro, além de aspectos éticos questionados por entidades protetoras de animais. Devido a esses fatores, existem pressões, de

ordem econômica e humana, para que parte dos testes de toxicidade seja realizado *in vitro* (citotoxicidade).

Apesar das limitações da cultura de células, os resultados dos testes são muito reprodutíveis (Freshney, 1994). A cultura de células pode ser usada ainda para a avaliação basal da citotoxicidade e da toxicidade em órgãos alvos quando se utilizam culturas primárias (Balls and Fentem, 1992). A maioria dos compostos químicos exerce o seu efeito tóxicos através da modificação do metabolismo celular e/ou por danos nas estruturas celulares. Por isso, um fator importante na citotoxicidade de compostos químicos é a relação entre o tipo celular estudado e o órgão alvo *in vivo*.

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). A possibilidade de identificação dos riscos na utilização de substâncias químicas levou ao uso maciço de animais experimentais, que atualmente tem sido preterido, devido a questões éticas e de conscientização. Desta forma, ensaios de citotoxicidade têm sido incentivados pela comunidade científica. No entanto, torna-se evidente que um experimento de citotoxicidade apropriado permite uma interpretação limitada em relação ao mecanismo de toxicidade do composto testado, porém, isso serve como base para a avaliação das características toxicológicas de novos compostos, bem como auxilia na escolha dos experimentos *in vivo* a serem realizados e quais são os órgãos ou organelas mais afetados (Stark *et al.*, 1986).

Muitos ensaios têm sido utilizados para se avaliar a citotoxicidade de diversos compostos. Para esta análise, é indicado o uso de vários parâmetros a fim de se obter dados mais conclusivos, uma vez que alguns compostos podem interferir no método utilizado, levando a uma falsa interpretação.

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

Estudos de citotoxicidade são realizados para avaliar a viabilidade celular, os quais podem avaliar a função celular através da integridade da membrana e de organelas, conteúdo celular (metabólito ou macromolécula) e atividade enzimática (Loveland *et al.*, 1992; Repetto and Sanz, 1993).

Alguns testes, como por exemplo a análise do conteúdo de ácido desoxirribonucleico (DNA), o conteúdo de proteína, a incorporação do corante Vermelho neutro (cloridrato de 2-amino-3-metil-7-dimetil-amino fenanzina), a exclusão do azul de tripan e a redução do MTT [brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio], têm adquirido atenção considerável no contexto de citotoxicidade. O vermelho neutro e o MTT fornecem informações sobre as funções metabólicas celulares, mais especificamente, integridade lisossomal e funcionamento mitocondrial, respectivamente (Mosmann, 1983; Denizot and Lang, 1986; Repetto and Sanz, 1993).

A integridade da célula também pode ser analisada por observações morfológicas e pela exclusão do corante Azul de Tripan, o qual dá indicação sobre

a integridade da membrana celular (Loveland *et al.*, 1992). No caso específico da cultura de leucócitos, a viabilidade é analisada utilizando como parâmetros a redução do MTT, quantificação de proteínas e/ou incorporação de timidina, uma vez que estas células são cultivadas em suspensão (Mosmann, 1983).

2. OBJETIVOS

Na literatura há poucos relatos sobre o efeito citotóxico de antimaláricos em diferentes tipos celulares, bem como na atividade de enzimas . Portanto, a fim de correlacionarmos a citotoxicidade de antimaláricos sobre linfócitos e seus efeitos na atividade da fosfatase destas células, para este trabalho foram propostos os seguintes objetivos:

- Verificar o efeito da cloroquina, quinina e desferoxamina na atividade da proteína tirosina fosfatase na fração total, de membrana e citosólica de linfócitos;
- Determinar o efeito destes antimaláricos na atividade da fosfatase em presença de antioxidantes (glutathione reduzida e ácido ascórbico);
- Verificar o efeito da desferoxamina na ação dos antimaláricos sobre a fosfatase;
- Avaliar a citotoxicidade da cloroquina e quinina sobre a cultura primária de linfócitos humano;
- Utilizar a proteína tirosina fosfatase como biomarcador da viabilidade de linfócitos;
- Propor a relação entre o efeito citotóxico da quinina e cloroquina e a atividade da fosfatase de linfócitos.

3. METODOLOGIA

3.1. Materiais

Cloroquina, quinina, desferoxamina, coquetel inibidor de PTP e histopaque foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

3.2. Métodos

3.2.1. Obtenção dos linfócitos

Os linfócitos foram obtidos do sangue de voluntários saudáveis que não estavam fazendo uso de medicamentos (comitê de ética UNICAMP/ Processo Nº 310/2000).

3.2.2. Separação dos linfócitos do sangue total

O sangue foi coletado em vacuette heparinizado e em seguida diluído em solução fisiológica (NaCl 0,9%) ou RPMI na proporção de 1:1. O sangue diluído foi adicionado em tubos de centrifuga de 15 mL contendo 3 mL de histopaque (reagente responsável pela formação de gradiente e separação dos linfócitos de outras células sanguíneas). Esta mistura foi centrifugada por 30 minutos à 1000 x g. Após este período a nuvem linfocitária foi cuidadosamente retirada, lavada 3 vezes com solução fisiológica e utilizada para a extração da fosfatase e realização da cultura.

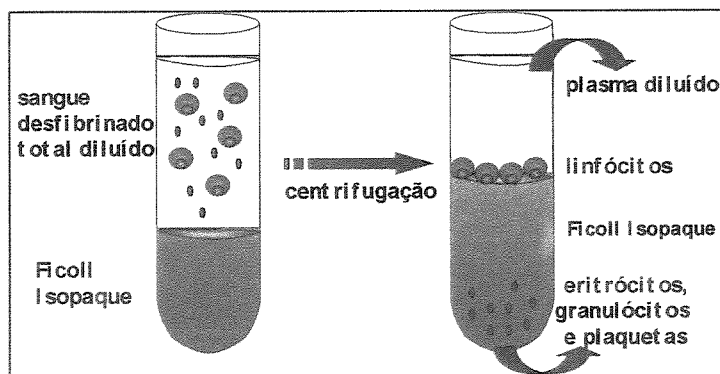


Figura 5. Separação de linfócitos do sangue total

3.2.3. Obtenção das fosfatases de membrana e citoplasmática

Os linfócitos obtidos como descrito no item anterior, foram lavados com solução fisiológica e em seguida lisados com tampão Hepes 0,001 M pH 7.0. O lisado foi centrifugado por 10 minutos a 1000 x g, o precipitado foi descartado e o sobrenadante centrifugado à 20.000 x g por 20 minutos. O sobrenadante foi ultracentrifugado a 100.000 x g (4°C). O precipitado (fração membrana) obtido foi ressuspenso no mesmo tampão Hepes contendo 0,2% de Triton X 100 e no sobrenadante obtivemos a fração citosólica, ambas frações foram utilizadas para a dosagem da fosfatase.

3.2.4. Estudo cinético

a) Obtenção da fosfatase total de linfócitos

A fosfatase total foi extraída com tampão Hepes 0,001 M, pH 7,0, após os linfócitos serem lavados com solução fisiológica.

b) Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada a 37°C utilizando p-nitrofenilfosfato (5 mM) - (pNPP), tampão Hepes 100mM (pH 7,0), perfazendo um volume final de 1 mL. A reação foi paralisada após 40 minutos a adição de 1 mL de hidróxido de sódio 1M ao extrato e a absorbância do p-nitrofenol determinada a 405 nm. Nos experimentos realizados com pré-incubação de 20 minutos a reação teve início com a adição do pNPP (Aoyama et al., 2000).

c) Efeito de antimaláricos, antioxidantes e desferoxamina na atividade da fosfatase de linfócitos

A atividade da enzima foi determinada na presença dos fármacos (cloroquina, quinina e desferoxamina) e antioxidantes (GSH e ácido ascórbico). Os experimentos foram realizados sem e com pré incubação de 20 minutos.

3.2.5. Cultura de linfócitos

Aos linfócitos obtidos como descrito anteriormente foi adicionado meio de cultura RPMI suplementado com soro fetal bovino (10%), antibióticos (1% de estreptomicina e penicilina) e fitohemaglutinina 5µg/mL (mitógeno). Foram plaqueadas 1×10^6 células/mL em placas de Petri, após 48 horas os linfócitos foram contados na presença de azul de tripan (1:1) e a viabilidade determinada pela capacidade das células viáveis em excluírem o corante.

Após 48 horas, o meio de cultura foi trocado por outro contendo os antimaláricos. Os linfócitos foram mantidos por 24 horas em cultura na estufa a 37°C com 5% de CO₂. Logo em seguida foram realizados os ensaios de viabilidade celular como descrito em seguida.

3.2.6. Avaliação da viabilidade celular

a) Função mitocondrial

O meio foi removido e trocado por outro sem soro contendo o corante (1mg/mL), e as células foram incubadas durante 5 h, tempo necessário para a redução do MTT [3- (4,5-dimethylthiazole-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] a formazan. O meio foi retirado cuidadosamente e foi adicionado 1 mL de etanol

para solubilização do formazan. As placas foram agitadas por 10 minutos e a absorbância medida a 570 nm (Denizot and Lang, 1986).

b) Dosagem de proteína

A proteína foi quantificada pelo método de Lowry, como descrito por Hartree (1972), utilizando a albumina de soro bovino como padrão. A reação foi iniciada pela adição de 2mL do reagente C a 0,2mL da amostra. Após 10 minutos, adicionou-se 0,2mL do reagente Folin-Ciocalteu (fosfomolibdato/fosfotungstato diluído 1:1 em água). A leitura da absorbância foi realizada a 660nm após 30 min da adição do reagente Folin-Ciocalteu à temperatura ambiente.

- Reagente A - Carbonato sódio 2% em NaOH 0,1 N
- Reagente B -CuSO₄.5H₂O 0,5% em citrato de sódio 1%
- Reagente C -1mL do reagente B + 50mL reagente A
- Regente de Folin-Ciocalteu (diluído 1:1 em H₂O)

c) Dosagem da atividade fosfatásica

A dosagem da atividade fosfatásica foi determinada utilizando-se pNitrofenilfosfato (pNPP) - 5 mM, após a retirada do meio de cultura, lavagem das células com solução RPMI e lise celular com tampão Hepes 0,001 M pH 7.0. A reação foi paralisada com NaOH 1M, após 40 minutos e a absorbância (pNitrofenol) medida a 405 nm (Aoyama et al., 2000).

3.2.7. Análise Estatística

Todos os dados apresentados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão. Os níveis de significância entre as amostras foram analisados segundo Análise de Multivariância (ANOVA), através do software SAS utilizando como base o nível de significância $\alpha = 0,05$ (Teste de Dunnett's).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como já relatado, as fosfatases estão amplamente distribuídas no sangue as quais, principalmente a CD45 e PP2B apresentam papel fundamental nas vias de transdução de sinal em linfócitos. Correlacionar o efeito de fármacos na atividade das proteínas fosfatases pode contribuir para a elucidação da ação fisiológica destas enzimas, sua participação na toxicidade dessas drogas e também nos permitir analisar a via de sinalização celular que poderá ser afetada na presença de determinado fármaco.

Este trabalho foi dividido em duas partes:

- Estudo do efeito dos antimaláricos nas fosfatases isoladas dos linfócitos sem tratamento prévio com estes fármacos
- Estudo da viabilidade dos linfócitos humanos tratados com a cloroquina e quinina, através dos seguintes parâmetros: redução do MTT, conteúdo de proteína e dosagem da atividade fosfatásica.

Portanto, foi realizada uma análise do efeito dos antimaláricos cloroquina, quinina e desferoxamina na atividade das proteínas fosfatases isoladas das diferentes frações de linfócitos (extrato, membrana e citoplasma) bem como o estudo da viabilidade dessas células, após o tratamento com as drogas utilizando como um dos parâmetros a proteína fosfatase.

A metodologia utilizada para separar os linfócitos do sangue total foi adequada, uma vez que, a contagem das células a cada coleta com o corante azul de tripan mostrou menos de 3% de células inviáveis. Este resultado também foi obtido após cultura dos linfócitos por 48 horas.

4.1. EFEITO DO COQUETEL DE INIBIDOR NA ATIVIDADE DA FOSFATASE TOTAL DE LINFÓCITOS HUMANOS

Como um dos parâmetros utilizados para avaliar a citotoxicidade dos antimaláricos foi a dosagem da fosfatase total, nosso objetivo inicial foi determinar a fosfatase predominante no extrato celular, através do coquetel de inibidor de fosfatase.

Atividade fosfatásica total foi inibida 80% na presença do coquetel inibidor de proteínas tirosina fosfatases (Figura 7). Este resultado já era esperado, pois há relatos na literatura mostrando que na membrana dos linfócitos a CD45 é a principal proteína tirosina fosfatase (Thomas and Brown, 1999). Além disto, outros dois tipos de proteínas fosfatases são encontradas no citosol destas células, que são as proteínas tirosina fosfatases SHP-1 e SHP-2 e proteína ser/thr fosfatase PP2B. Portanto, de acordo com nossos resultados a inibição de 80% se refere à CD45 e outras PTPs.

Estudos em nosso laboratório com potenciais inibidores mostraram que há uma predominância da PTP no extrato celular, reafirmando nossos resultados. A maior parte da PTP se encontra na fração membrana de linfócitos (Silva, 2002). Esses dados reafirmam a importância da PTP de membrana mais expressa de

linfócitos, a CD45, a qual apresenta importante papel na ativação de linfócitos via produção de interleucina 2.

Visto isso, analisamos o efeito da cloroquina, quinina e desferoxamina nas fosfatases do extrato total, citoplasmática e de membrana dos linfócitos. Esses ensaios forneceram resultados interessantes, que nos permitiram correlacionar a participação da PTP com a ação tóxica dessas drogas e a possível via que poderia estar sendo afetada em linfócitos humanos.

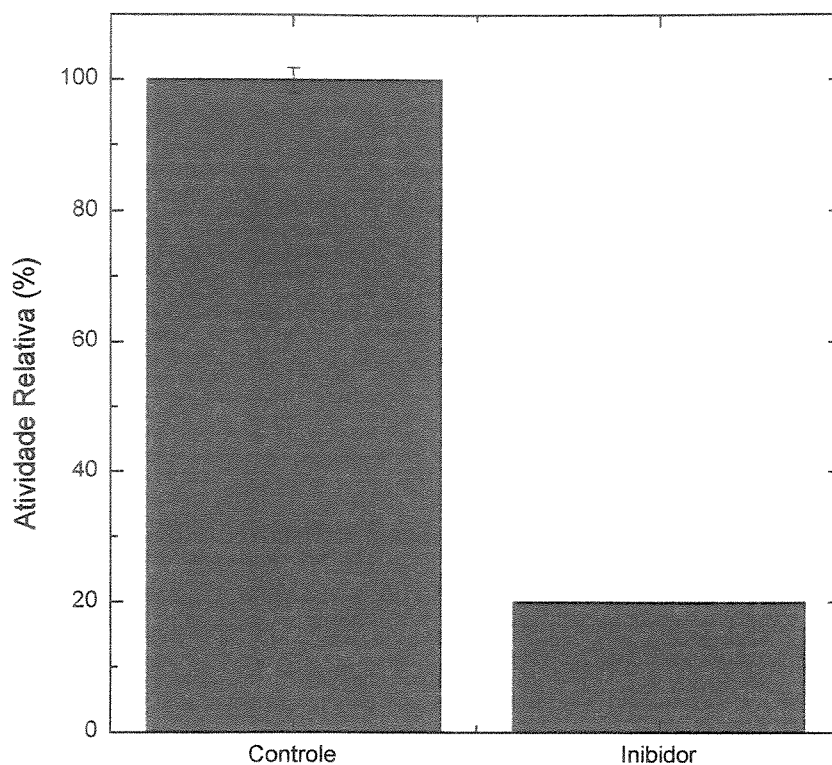


Figura 7. Efeito do coquetel de inibidores de PTP na atividade da fosfatase total de linfócitos humanos. O coquetel inibidor de PTP foi adicionado ao meio de reação e diluído 100 vezes. A dosagem da atividade foi realizada como descrito em métodos 3.2.4 b. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata e os resultados nos gráficos representam as suas médias e os desvios padrões ($p < 0,05$).

4.2. EFEITO DA CLOROQUINA NA ATIVIDADE DAS FOSFATASES DE LINFÓCITOS HUMANOS

Drogas antimaláricas são conhecidas por apresentarem vários efeitos biológicos, os quais interferem com proteínas ligadas à membrana, incluindo enzimas (Madesh *et al.*, 1997). Tentando correlacionar a participação da fração predominante isolada dos linfócitos, uma PTP (altamente sensível a agentes oxidantes), à toxicidade dessas drogas, analisamos o efeito destas na atividade fosfatásica total, associada à membrana e citoplasmática de linfócitos.

Analisando os resultados da Figura 8, observamos que a cloroquina não apresentou efeito significativo sobre a atividade fosfatásica de nenhuma fração dos linfócitos humanos. Fração total: sem e com pré-incubação $p = 0,227$; fração citosólica: sem pré-incubação $p = 0,427$; com pré-incubação $p = 0,251$; fração da membrana: sem e com pré-incubação $p = 0,180$.

Na literatura há relatos que a cloroquina diminui a atividade de enzimas antioxidantes, glutathione peroxidase, catalase e oxidoreductases dependentes de NADPH, alterando o estado redox celular (Magwere, *et al.*, 1997). No entanto, a atividade da PTP isolada de linfócitos não foi alterada.

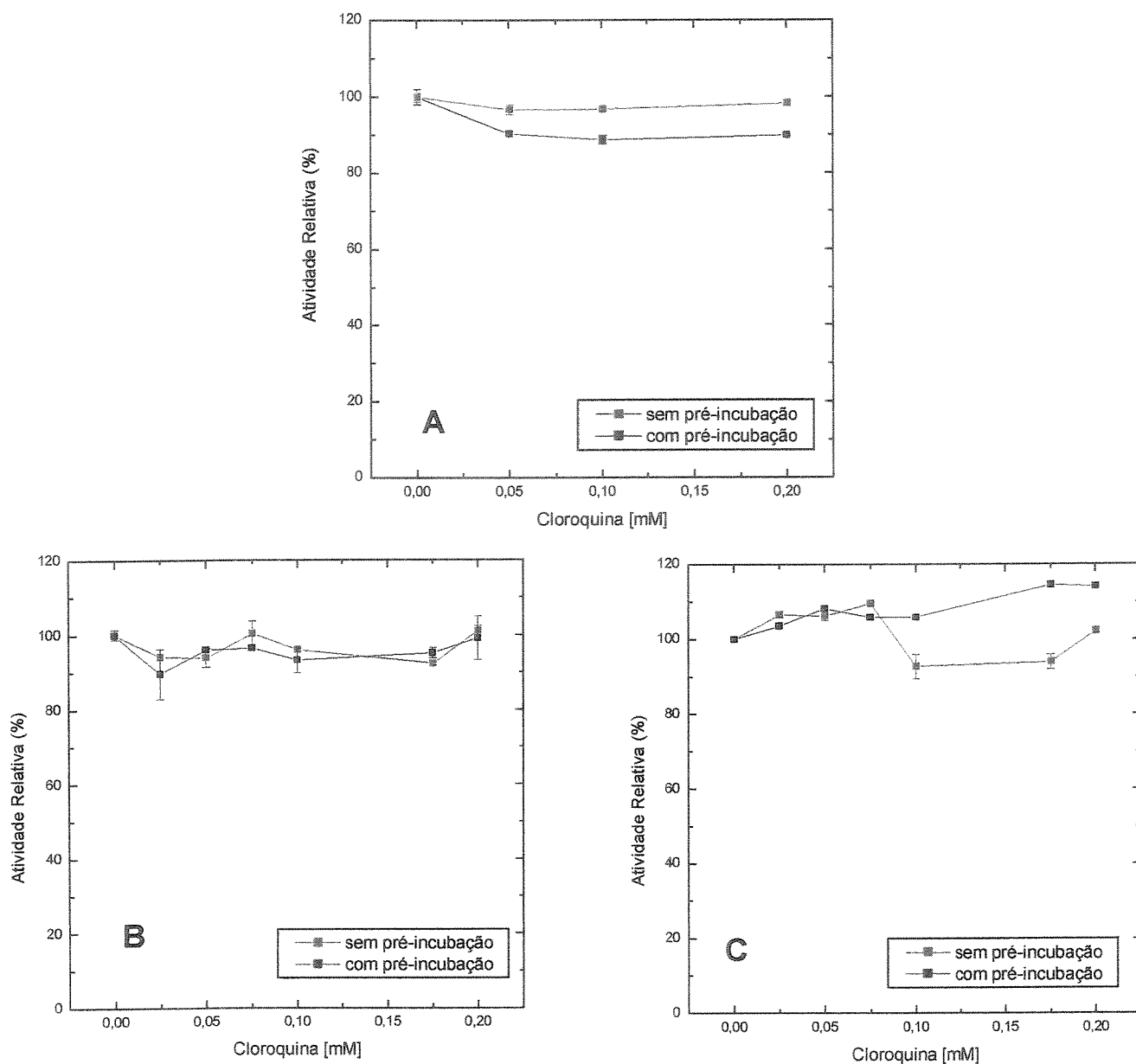


Figura 8. Efeito da cloroquina na atividade da fosfatase da fração total (A), citosólica (B) e da membrana (C) de linfócitos humanos. A atividade da enzima foi determinada como descrito em métodos (3.2.4.b) sem e com pré-incubação de 20 minutos. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata e os resultados nos gráficos representam as suas médias e os desvios padrões dos valores obtidos para a atividade fosfatásica do extrato, membrana e citosólica ($p > 0,05$).

4.3. EFEITO DA QUININA NA ATIVIDADE DAS FOSFATASES DE LINFÓCITOS HUMANOS

A quinina, numa concentração de 0,5 mM, em contato com a enzima demonstrou uma inibição de 30% na fração total $p = 0,003$ (Figura 9A). Analisando a fração citosólica houve uma inibição de 25% na mesma concentração com pré-incubação ($p < 0,0001$) e na fração da membrana não foi observado efeito significativo ($p = 0,1010$). Isso demonstra que provavelmente a quinina esteja atuando em proteínas ser/thr fosfatases do citosol, já que não foi observado efeito sobre a PTP de membrana, sendo que, a maior parte da atividade da PTP se encontra na membrana.

A atividade da enzima não foi significativamente alterada em presença dos antimaláricos, sem pré incubação ($p = 0,155$). Este dado nos mostra que o efeito desta droga é dependente do tempo de contato com a enzima livre. O fato da atividade enzimática ter sido afetada somente após um contato prévio com a enzima livre, sugere que o substrato protege deste efeito inibitório. Isto mostra que a quinina pode interagir com alguma região do sítio ativo ou com outra região da enzima alterando a sua conformação, mecanismos os quais, são impedidos na presença do substrato.

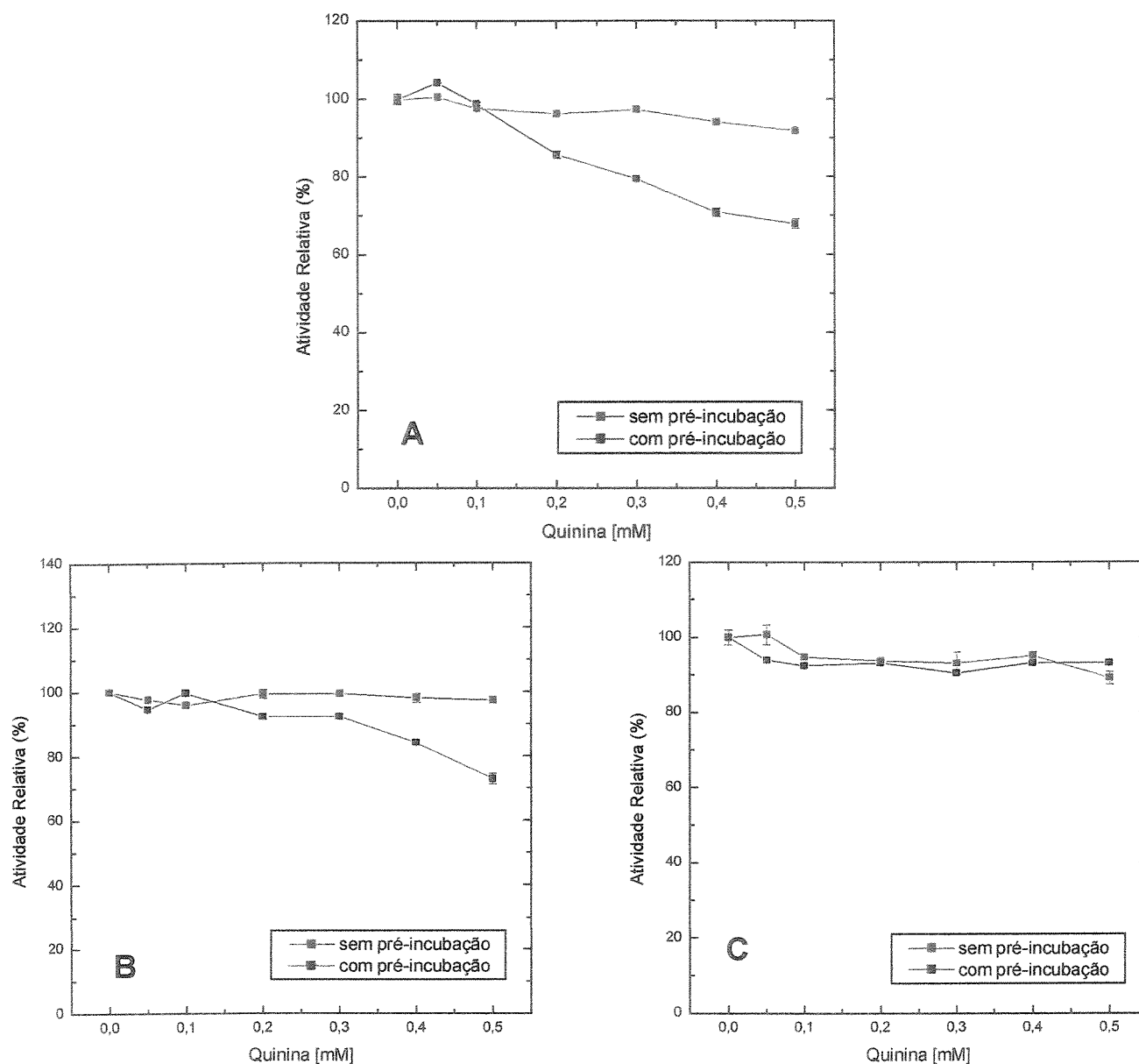


Figura 9. Efeito da quinina na atividade da fosfatase da fração total (A), citosólica (B) e da membrana (C) de linfócitos humanos. A atividade da enzima foi determinada como descrito em métodos (3.2.4 b) sem e com pré-incubação de 20 minutos. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata e os resultados nos gráficos representam as suas médias e os desvios padrões do extrato e citosólica ($p < 0,05$) enquanto na fração membranar ($p > 0,05$).

4.4. EFEITO DA DESFEROXAMINA NA ATIVIDADE DAS FOSFATASES DE LINFÓCITOS HUMANOS

A desferoxamina numa concentração de 50 mM, causou ativação da PTP de 20% ($p < 0,0001$) e 40% ($p < 0,0001$) com e sem pré-incubação, respectivamente. Na fração da membrana, numa concentração de 50 mM também foi observada uma ativação de 70% e 40% ($p < 0,0001$) sem e com pré-incubação, respectivamente. Vimos que a atividade da proteína fosfatase da fração citosólica não foi alterada em presença da desferoxamina, enquanto que a atividade fosfatásica do extrato total e de membrana sofreram ativação em presença do fármaco.

De acordo com esses resultados podemos dizer que a ação da desferoxamina ocorre sobre as PTPs de membrana. Sendo a CD45 uma PTP tipo-receptor importante na sinalização mediada pelo TCR em linfócitos, e altamente expressa na superfície de todas as células hematopoiéticas (Thomas and Brown, 1999), esta poderia ser alvo direto da ação desse quelante, visto que sua ação ocorre somente em proteínas fosfatases de membrana. Este resultado sugere que a desferoxamina pode alterar a função dos linfócitos possivelmente via CD45, já que esta enzima é importante na ativação e desenvolvimento de linfócitos. Não foi observado efeito na fração citoplasmática. Sugerimos que a ação ativadora observada pode ser decorrente de uma interação desferoxamina-enzima capaz de alterar a conformação da mesma. O mecanismo proposto para a ativação da enzima pela desferoxamina ter sido devido pela alteração da conformação da enzima é de grande relevância, visto que a possível propriedade antioxidante

proveniente da quelação de ferro pode ocorrer somente no sistema celular (Niihara *et al.*, 2000) (Figura 10).

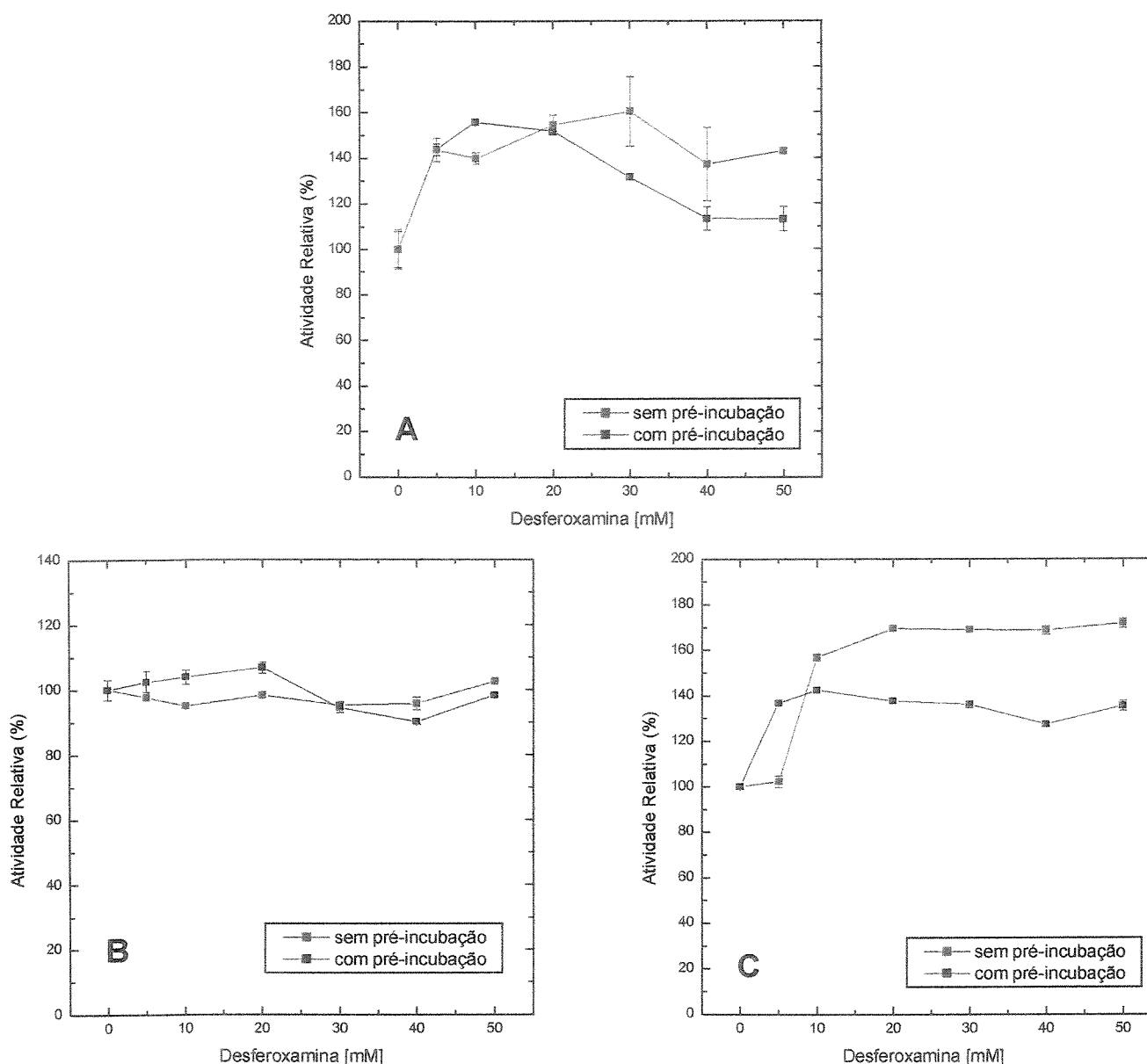


Figura 10. Efeito da desferrioxamina na atividade da fosfatase da fração total (A), citosólica (B) e de membrana (C) dos linfócitos humanos. A atividade da enzima foi determinada como descrito em métodos (3.2.4 b) sem e com pré-incubação de 20 minutos. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata e os resultados nos gráficos representam as suas médias e os desvios padrões do extrato e membrana ($p < 0,05$) e citosólica ($p > 0,05$).

4.5. EFEITO DE ANTIOXIDANTES NA ATIVIDADE DAS FOSFATASES DE LINFÓCITOS HUMANOS

Estudos prévios têm demonstrado que a PTP pode ser regulada pelo estado redox intracelular (Xu *et al.*, 2002). O estado redox é de fundamental importância para a função dos linfócitos e também para a atividade da PTP regulando assim, a sua função, já que a oxidação de um resíduo de cisteína no sítio catalítico da enzima, permite a sua inativação. O resíduo de cisteína das proteínas tirosina fosfatases é extremamente reativo, porém essa reatividade da cisteína é de fato, essencial para o mecanismo catalítico enzimático, uma vez que essas enzimas necessitam do intermediário fosfo-cys a catálise. No entanto, essa alta reatividade necessária para a atividade catalítica torna a cisteína vulnerável a oxidação (Xu *et al.*, 2002). Desta forma, verificamos o efeito de dois antioxidantes (ácido ascórbico e GSH) na atividade da fosfatase de linfócitos (Figura 11).

Foi observado um aumento na atividade da enzima de 40% e 30% ($p < 0.0001$) quando a mesma foi mantida em contato prévio com ácido ascórbico numa concentração de 40 mM e 30 mM, respectivamente. Entretanto, nessas mesmas concentrações sem pré-incubação não houve efeito significativo ($p = 0,306$) e em concentrações menores de 5 mM a 20 mM a atividade da enzima foi mantida. Esse efeito ativador pode ser explicado pela manutenção da integridade do sítio catalítico, a qual é essencial para a catálise, como observado para outras proteínas tirosina fosfatases (Granjeiro, 1994). A atividade da enzima foi mantida em concentrações fisiológicas de GSH. Na literatura há relatos que o ácido ascórbico e o GSH mantêm o grupamento SH da cisteína na forma reduzida.

A ativação e manutenção da enzima em presença desses antioxidantes, reafirmam a importância da manutenção da integridade desses aminoácidos cisteína presentes no sítio ativo e portanto, essenciais para a catálise.

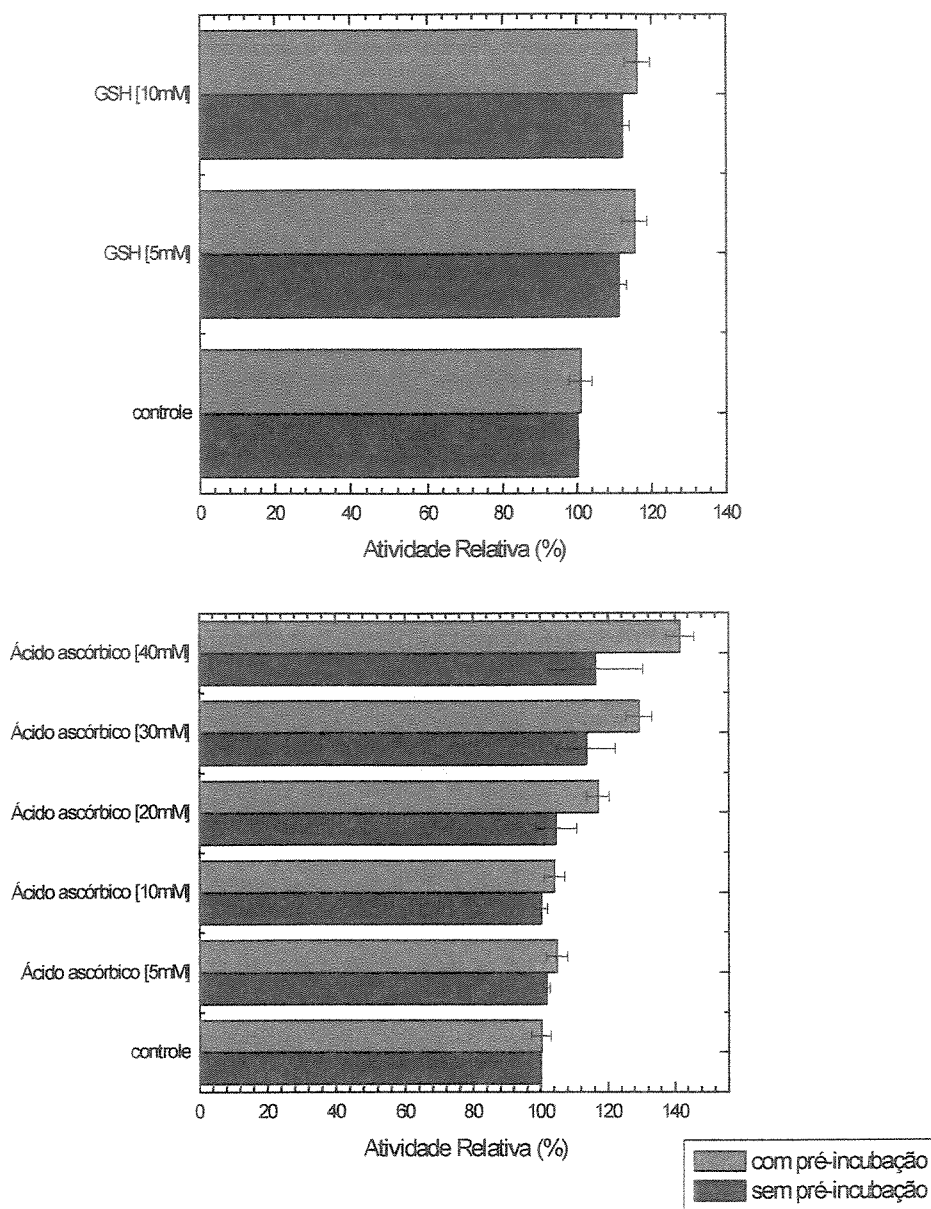


Figura 11. Efeito de antioxidantes (ácido ascórbico e GSH) na atividade das PTP de linfócitos humanos. A atividade da enzima foi determinada como descrito em métodos (3.2.4. b) sem e com pré-incubação de 20 minutos. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata e os resultados nos gráficos representam as suas médias e os desvios padrão. O nível de significância (p) para GSH e ácido ascórbico foi $< 0,0001$.

4.6. EFEITO DA CLOROQUINA, QUININA E DESFEROXAMINA NA ATIVIDADE DA FOSFATASE DE LINFÓCITOS HUMANOS EM PRESENÇA DE ANTIOXIDANTES

Relatos na literatura mostram que a cloroquina causa um aumento da peroxidação lipídica e decréscimo na atividade de enzimas antioxidantes na retina de camundongos. É possível que a cloroquina aja diretamente ou indiretamente alterando o estado redox (Magwere *et al.*, 1996). De acordo com essas informações e visto que o estado redox é de fundamental importância para a função dos linfócitos e para a atividade das PTPs, verificamos o efeito da cloroquina, quinina e desferoxamina em presença dos antioxidantes, GSH e ácido ascórbico.

Nossos dados mostraram que a quinina em presença de antioxidantes apresentou um efeito ativador sobre a PTP de 60% a 75% ($p < 0,0001$) para a combinação quinina-ácido ascórbico e quinina-GSH, respectivamente (Figura 12).

Efeito ativador de 60% foi observado para a combinação cloroquina-ácido ascórbico e GSH (Figura 13).

Na combinação desferoxamina-ácido ascórbico e GSH foi observado, uma ativação de 60% e 70% respectivamente. A combinação cloroquina-antioxidantes demonstrou um efeito ativador maior em relação às concentrações das drogas utilizadas para a desferoxamina e quinina.

Esses resultados indicam que os antimaláricos e a desferoxamina em combinação com os antioxidantes (GSH e ácido ascórbico) apresentaram um

efeito ativador maior na atividade da enzima, quando comparado somente com o efeito dos antioxidantes (Figura 11) na atividade da fosfatase.

A interação cloroquina, quinina e desferoxamina com antioxidantes resultou em um aumento significativo na atividade das fosfatases ($p < 0,0001$). Provavelmente a combinação antimaláricos-antioxidantes poderia estar interagindo com a enzima alterando a sua conformação de modo a aumentar a sua atividade. Não foi observado qualquer ativação das PTPs na presença dos antimaláricos, com exceção da desferoxamina. A ação sinérgica desses compostos precisa ser melhor investigada. Entretanto, esses resultados nos mostram um possível uso farmacológico da combinação antimaláricos-antioxidantes, visto que o aumento da atividade das proteínas fosfatases (CD45 e PP2B) tem grandes implicações na função dessas células, já que ambas tem importante papel na ativação dos linfócitos e consequentemente na resposta imune.

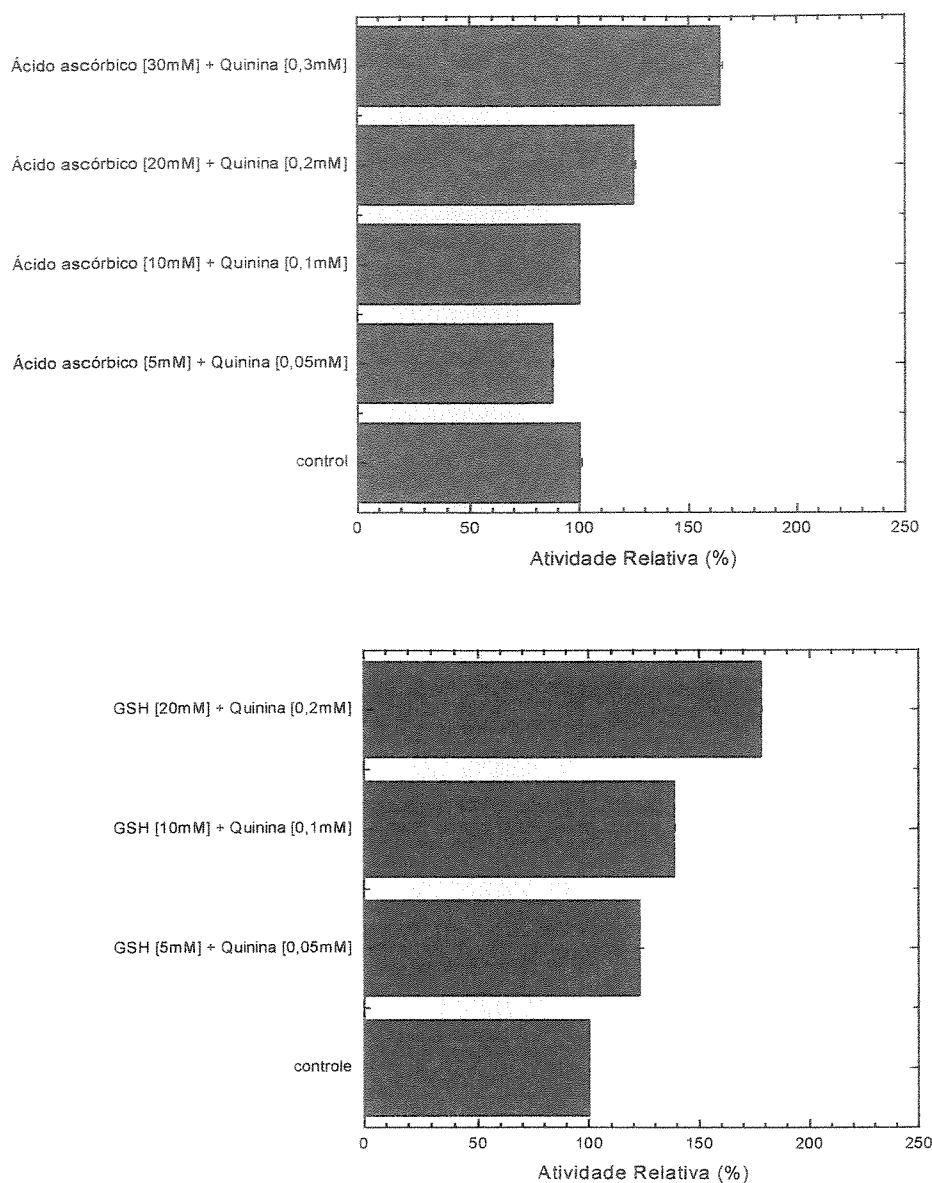


Figura 12. Efeito da quinina em presença do ácido ascórbico e GSH na atividade da PTP de linfócitos. A atividade da enzima foi determinada como descritos em métodos 3.2.4b, sem pré-incubação. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata e os resultados nos gráficos representam as suas médias e os desvios padrões. O nível de significância (p) para as combinações quinina-ác. ascórbico/GSH foi $< 0,05$).

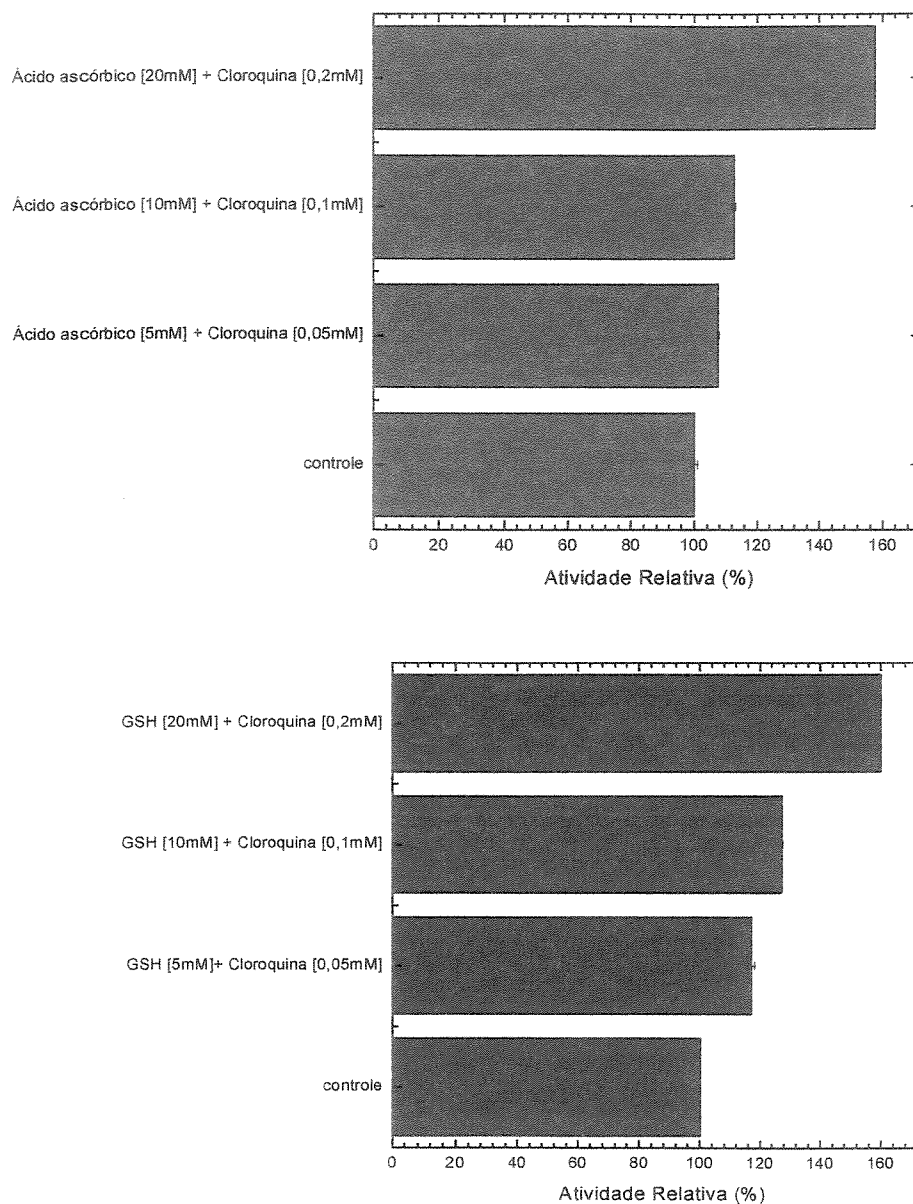


Figura 13. Efeito da cloroquina em presença do ácido ascórbico e GSH na atividade da PTP de linfócitos. A atividade da enzima foi determinada como descritos em métodos 3.2.4b, sem pré-incubação. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata e os resultados nos gráficos representam as suas médias e os desvios padrões. O nível de significância (p) para as combinações cloroquina-ác. ascórbico/GSH foi $< 0,05$).

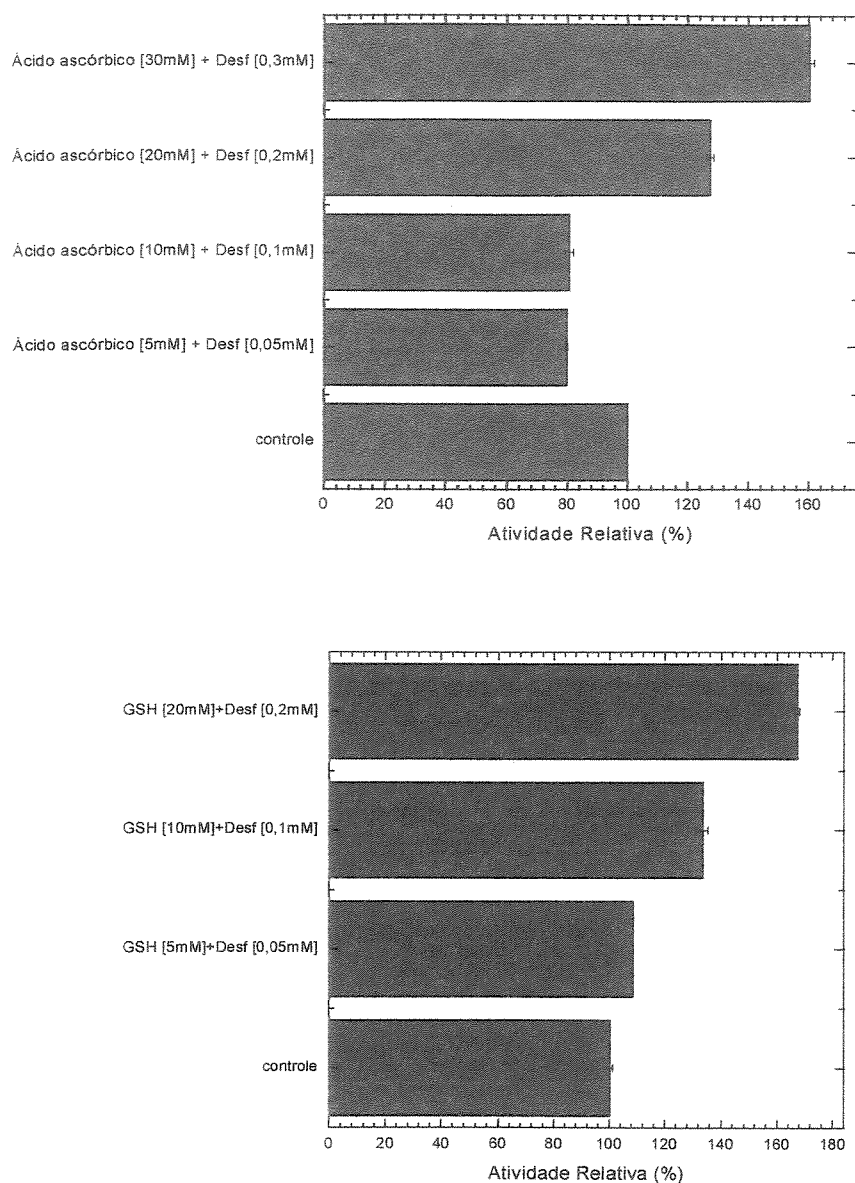


Figura 14. Efeito da desferoxamina em presença do ácido ascórbico e GSH na atividade da PTP de linfócitos. A atividade da enzima foi determinada como descritos em métodos 3.2.4b, sem pré-incubação. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata e os resultados nos gráficos representam as suas médias e os desvios padrões. O nível de significância (p) para as combinações desferoxamina-ác. ascórbico/GSH foi $< 0,05$.

A Tabela 1 nos mostra um resumo do efeito da ação dos antioxidantes, antimaláricos e das combinações antimaláricos-antioxidantes sobre a atividade da PTP, revelando que as interações entre antioxidantes e fármacos podem afetar significativamente a atividade da enzima. Essa alteração é de relevante importância visto que, essas proteínas desempenham um papel fundamental na ativação e proliferação dos linfócitos.

Tabela 1
Efeito dos antimaláricos na atividade da fosfatase total de linfócitos
humanos

Fármacos	Ensaio	Atividade Relativa
Cloroquina	cloroquina (0,05-0,2mM)	100 (± 2)
	ácido ascórbico (20mM)	100 (± 4)
	cloroquina (0,2mM) + ácido ascórbico (20mM)	160 (± 1)
	GSH (5mM-10mM)	100 (± 4)
	cloroquina (0,2mM)+ GSH (20mM)	160 (± 2)
Quinina	quinina (0,1mM-0,5mM)	100 (± 5)
	ácido ascórbico (30mM)	130 (± 2)
	quinina [0,3mM] + ácido ascórbico [30mM]	160 (± 5)
	GSH [5mM-10mM]	100 (± 4)
	Quinina [0,2mM] + GSH [20mM]	175 (± 2)
Desferoxamina	Desferoxamina [0,2mM-0,3mM]	100 (± 6)
	Ácido ascórbico [30mM]	130 (± 2)
	Desferoxamina [0,3mM]+ácido ascórbico [30mM]	160 (± 3)
	GSH [5mM-10mM]	100 (± 4)
	Desferoxamina [0,2mM]+GSH [20mM]	170 (± 2)

Na ausência dos antimaláricos a atividade da fosfatase total de linfócitos humanos foi considerada como 100%. Os experimentos foram realizados em triplicata e os pontos mostrados na tabela representam as suas médias e os desvios padrões.

4.7. EFEITO DA DESFEROXAMINA EM PRESENÇA DOS ANTIMALÁRICOS NA ATIVIDADE DA FOSFATASE DE LINFÓCITOS HUMANOS

Na literatura tem sido relatado que a combinação da desferoxamina com a cloroquina aumenta a ação terapêutica no tratamento da malária (Vippagunta *et al.*, 1997).

No caso específico da PTP de linfócitos, não foi observado efeito significativo na atividade da enzima pela combinação desferoxamina- cloroquina ($p = 0,344$); desferoxamina-quinina ($p = 0,354$). (Figura 15).

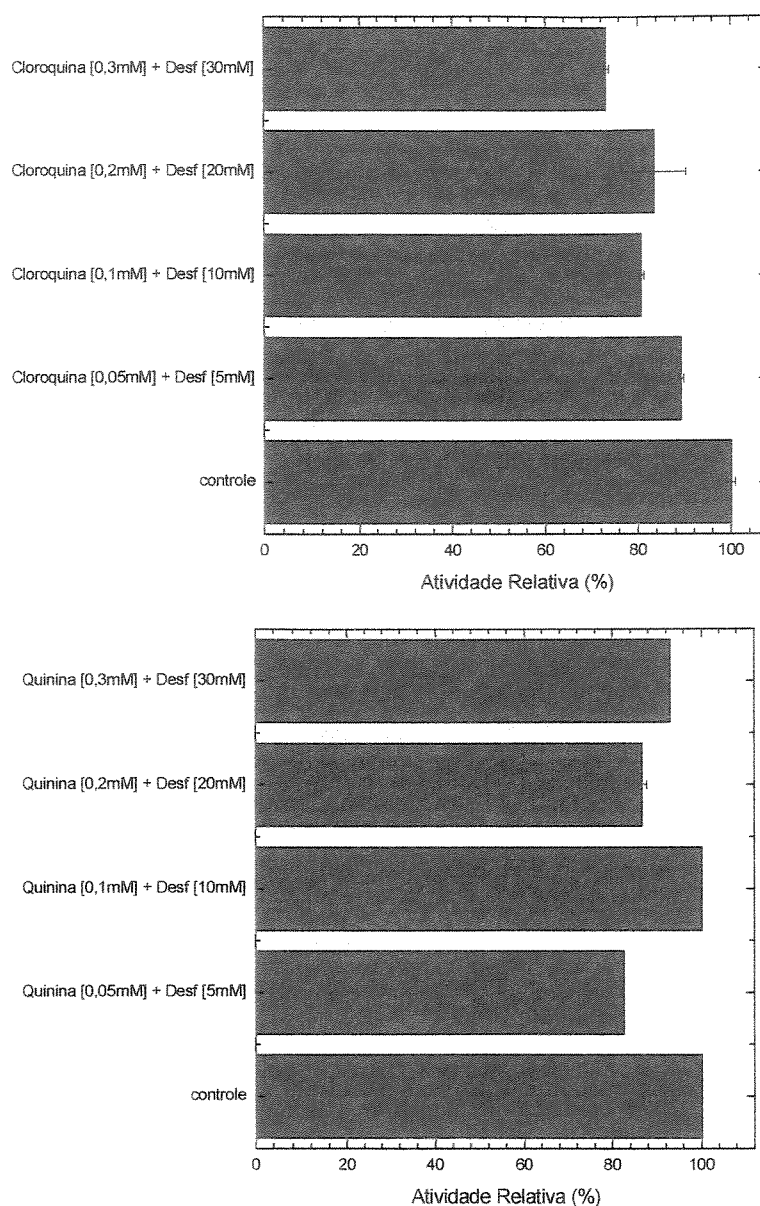


Figura 15. Efeito da desferroamina na ação dos antimaláricos (cloroquina e quinina) na atividade da PTP de linfócitos. A atividade da enzima foi determinada como descrito em métodos (3.2.4 b), sem pré-incubação. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata. O nível de significância (p) para as combinações desferroamina –antimaláricos foi $> 0,05$.

4.8. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE ANTIMALÁRICOS SOBRE LINFÓCITOS HUMANOS EM CULTURA

Como mencionado anteriormente, a citotoxicidade de um xenobiótico deve ser avaliada através de vários parâmetros, uma vez que, a fidelidade de um ensaio específico dificilmente se equivale a 100%. Portanto, a utilização de diferentes testes de viabilidade celular assegura a confiabilidade da interpretação dos resultados minimizando os efeitos de artefatos resultantes de respostas biológicas diversas (Renzi *et al.*, 1993).

É importante ressaltar que a análise dos dados obtidos deve ser realizada de forma comparativa com o controle, sendo de fundamental importância o conhecimento das características químicas do composto testado.

Desferoxamina

Apesar do efeito da desferoxamina ter sido avaliado na fosfatase total extraída dos linfócitos, a ação da mesma na viabilidade dos linfócitos não foi verificada, pois na literatura já há relatos de sua toxicidade.

Bierer e colaboradores (1990) demonstraram que a desferoxamina inibiu a proliferação de linfócitos induzida por mitógenos através da sua ação quelante de ferro, pois este efeito foi revertido pela adição do ferro ao meio de cultura.

Lederman e colaboradores (1984) mostraram que a desferoxamina inibe a fase S do ciclo celular dos linfócitos por inibir a ribonucleotídeo redutase. Recentemente, outros autores têm demonstrado que quelantes de ferro podem

alterar o funcionamento da mitocôndria e induzir apoptose (Abeyasinghe *et al.*, 2001; Walter *et al.*, 2002).

É evidente que seria interessante a análise da citotoxicidade da desferoxamina sobre linfócitos utilizando como parâmetro a proteína tirosina fosfatase, entretanto nosso objetivo inicial era o estudo dos antimaláricos tradicionais (cloroquina e quinina). Esse trabalho forneceu perspectivas em relação ao estudo de citotoxicidade da desferoxamina, uma vez que alguns resultados serviram de base para um novo estudo comparativo entre fármaco e PTP.

Cloroquina

O estudo de citotoxicidade da cloroquina em cultura de linfócitos humanos, demonstrou um decréscimo dose dependente na viabilidade destas células (Figura 16). Existem relatos na literatura mostrando que a cloroquina inibe a proliferação dos linfócitos (Landewe *et al.*, 1995).

Analisando os parâmetros redução do MTT, atividade fosfatásica e quantificação de proteína, foi observado um efeito tóxico com valores de IC_{50} entre 75 μ M até 360 μ M. A cloroquina mostrou baixa citotoxicidade analisando a atividade da PTP (IC_{50} =360 μ M) e quantificação de proteína (IC_{50} =346 μ M), quando comparada com a maior toxicidade observada para o teste do MTT (IC_{50} =75 μ M).

Esse resultado mostra que a atividade fosfatásica pode ser utilizada como parâmetro da viabilidade celular uma vez que o seu perfil foi similar ao obtido para o conteúdo de proteína. Isso pode ser reforçado pela ausência de efeito na atividade da fosfatase quando a cloroquina foi adicionada ao meio de reação,

mostrando que a diminuição da atividade da enzima no gráfico de viabilidade foi devido à diminuição do número de células e não ao efeito da droga diretamente na enzima.

Em relação à diminuição da redução do MTT, este resultado pode ser interpretado de duas maneiras: inibição da função mitocondrial ou alteração da permeabilidade da membrana permitindo a saída do formazan. Ichiro e colaboradores (1997) demonstraram que a cloroquina apresentou efeito citotóxico sobre astrócitos. No entanto, estes autores revelaram que o resultado obtido a partir da redução do MTT foi “falso positivo”, uma vez que o método em questão pode ter interferentes, como:

- Aumento da exocitose do formazan (produto da redução do MTT) causado pela cloroquina.
- Ação oxidante da droga, alterando a capacidade celular de reduzir o MTT via NADH.

A partir dos resultados obtidos neste trabalho deve-se considerar as condições e características da droga em estudo. Outra característica importante da cloroquina é o fato da mesma ser uma base fraca e estar protonada no pH fisiológico (Wolf and Ruocco, 2000). Portanto, a inibição da função mitocondrial pode ter sido intensificada pela diminuição da produção de ATP, pois a cloroquina

ao captar prótons, pode interferir na formação do gradiente eletroquímico que é essencial para a produção de ATP.

Quanto à quantificação de proteína total, houve um decréscimo de aproximadamente 51%, isso pode ser explicado através do mecanismo de ação antiproliferativo da cloroquina, a qual pode interferir na síntese de proteína *in vivo* e *in vitro*. Os antimaláricos bloqueiam a síntese de DNA e RNA por se intercalarem no DNA (Wolf and Ruocco, 2000).

Os resultados cinéticos e de citotoxicidade sugerem que o efeito citotóxico da cloroquina sobre os linfócitos pode estar relacionado com alteração do estado redox destas células. Magwere e colaboradores (1996) relataram que este fármaco pode alterar o estado redox celular (células hepáticas e renais), através de mudanças na atividade de enzimas envolvidas na resposta antioxidante (superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione reductase). Estes relatos reforçam que a citotoxicidade apresentada pela cloroquina pode estar relacionada com alteração indireta da atividade de proteínas tirosina fosfatases, uma vez que estas enzimas dependem do grupamento-SH para catalisar a reação.

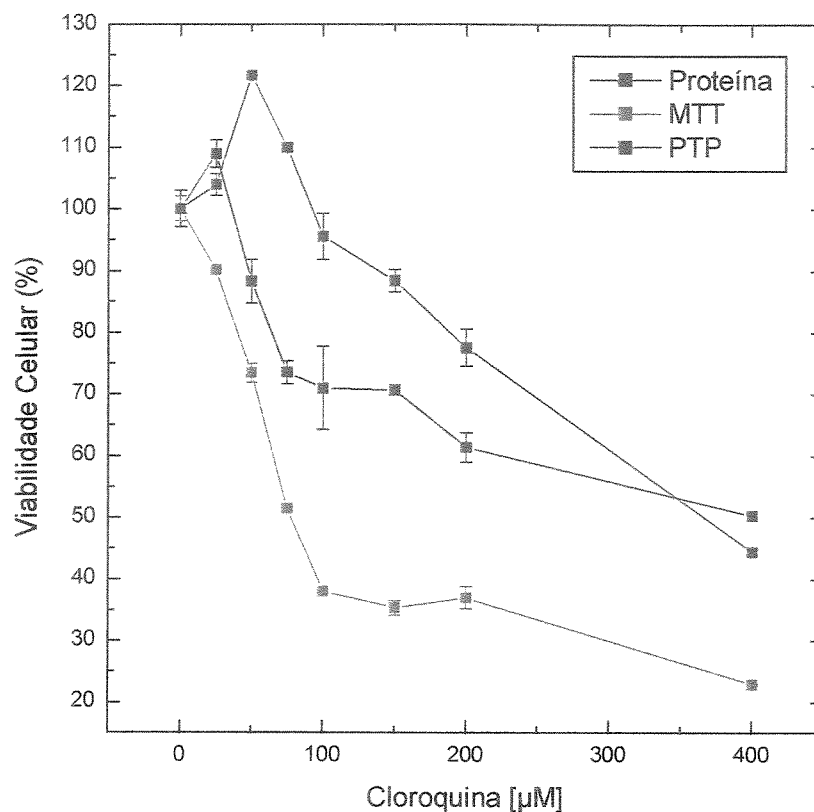


Figura 16. Avaliação da citotoxicidade da cloroquina em linfócitos humanos. A viabilidade dos linfócitos foi avaliada de acordo com o método 3.2.7 através dos seguintes parâmetros: Dosagem da atividade fosfatásica (405nm), quantificação de proteína (660nm) e redução do MTT (570nm). Os linfócitos foram tratados com a droga por 48h de acordo com o método 3.2.6. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Quinina

Analisando o efeito da quinina em linfócitos, foi observado um decréscimo na viabilidade destas células, e este efeito foi dose dependente (Figura 17). Os parâmetros atividade fosfatásica e quantificação de proteína total revelaram uma inibição e um decréscimo de 40%, respectivamente.

De acordo com as características da droga o decréscimo na quantificação da proteína pode estar relacionado a mecanismos antiproliferativos exercidos pelos antimaláricos, os quais bloqueiam a síntese de DNA e RNA por se intercalarem no DNA (Wolf and Ruocco, 2000).

Através dos estudos cinéticos e de citotoxicidade da quinina podemos observar que, provavelmente, sua ação seria sobre as proteínas serina/treonina fosfatases predominantes no citosol de linfócitos humanos. Resultados similares foram encontrados em cultura de células e na enzima livre do sangue periférico apresentou inibição de 25% (fração citoplasmática) e aproximadamente 30% no extrato celular, não sendo observado efeito nas proteínas de membrana. Sendo a quinina um bloqueador dos canais de Ca^{+2} (Matkó *et al.*, 1997), e de acordo com as informações obtidas, sugerimos que a PP2B teria sua função diretamente alterada, já que é a principal proteína serina treonina fosfatase envolvida na ativação dos linfócitos e dependente de Ca^{+2} /calmodulina para a sua catálise.

A quinina também revelou alta toxicidade para a mitocôndria, tendo um aumento na redução do MTT de 130%. Vale salientar que a análise dos resultados de citotoxicidade sempre se dá em relação ao controle, portanto, aumento ou diminuição dos parâmetros utilizados, reflete alteração do funcionamento celular.

No caso específico da redução do MTT, sugerimos que o aumento da redução observada poderia ser devido a dois fatores:

- Ativação da expressão da succinato desidrogenase em resposta ao estresse oxidativo causado pela quinina;
- Aumento da resposta antioxidante celular frente à quinina, o que resultaria num aumento da capacidade redutora, possibilitando um aumento significativo da redução do MTT resultando portanto, numa alta citotoxicidade;

Alguns autores têm estudado a bioquímica da redução do MTT por células viáveis, pois esta metodologia está sujeita à controvérsias (Berridge et al., 1996). Vistica e colaboradores (1991) demonstraram que a linhagem HepG2 quando tratada com fenobarbital induziu a expressão de enzimas envolvidas na redução do MTT, porém, a produção do formazan não foi afetada.

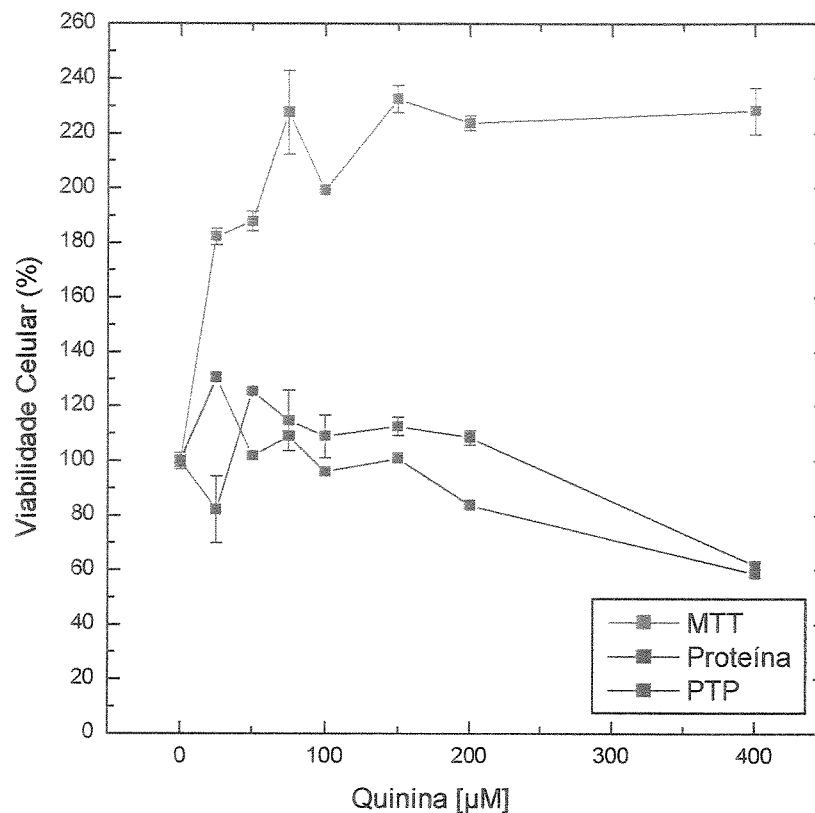


Figura 17. Avaliação da citotoxicidade da quinina em linfócitos humanos. A viabilidade dos linfócitos foi avaliada de acordo com o método 3.2.7 através dos seguintes parâmetros: dosagem da atividade fosfatásica (405nm), quantificação de proteína (660nm) e redução do MTT (570nm). Os linfócitos foram tratados com a droga por 48h de acordo com o método 3.2.6. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Os resultados mostrados evidenciaram que qualquer mudança no perfil dos parâmetros de viabilidade celular, pela ação de uma droga, é considerada uma alteração no metabolismo da célula conferindo um efeito citotóxico.

A correlação dos estudos cinéticos com os de citotoxicidade foram de fundamental importância para analisar quais fosfatases seriam afetadas e a possível via de sinalização que estariam envolvidas na toxicidade desses fármacos, amplamente utilizados na malária como também em outras doenças.

5. CONCLUSÃO

A utilização da PTP como biomarcador serviu como parâmetro para o estudo de citotoxicidade dos antimaláricos sobre linfócitos humanos, pois o perfil da fosfatase foi similar ao apresentado pelo parâmetro proteína total. Além disto, estes resultados juntamente com os dados cinéticos forneceram informações importantes sobre o mecanismo de ação citotóxica desses fármacos no sistema celular.

Sugerimos a importância de antioxidantes para a integridade da PTP e consequentemente, a função e proliferação dos linfócitos, uma vez que a combinação antimalárico-antioxidante provocou ativação da enzima. Desta forma, a diminuição da proliferação dos linfócitos devido ao estresse oxidativo causado por antimaláricos pode ter relação com a alteração da PTP tipo receptor.

A possível inibição da PP2B pela quinina pode levar a uma alteração na função dos linfócitos, visto que a quinina tanto pode inibir diretamente a ação da enzima, como indiretamente, provavelmente pelo decréscimo na concentração de Ca^{+2} .

As fosfatases de membrana e citosol tiveram suas atividades alteradas pelos antimaláricos. A inibição das proteínas fosfatases pela cloroquina e quinina e a ativação provocada pela desferoxamina tem grande implicação para o sistema imune, devido às mesmas apresentarem grande importância na ativação e proliferação dos linfócitos.

6. PERSPECTIVAS

A análise desses fármacos em linfócitos utilizando como principal parâmetro as proteínas fosfatases, nos conduziu a novas perspectivas em relação as vias metabólicas afetadas nessa toxicidade. Para isto propomos as seguintes perspectivas:

- Quantificar as proteínas fosfatases CD45 e PP2B dos linfócitos tratados com os antimaláricos
- Avaliar o estado redox celular após o tratamento com antimaláricos;
- Determinar o tipo de morte celular induzida pelos antimaláricos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abeyasinghe, R.D., Greene, B.T., Haynes, R., Willingham, M.C., Turner, J., Planalp, R.P., Brechbiel, M.W. and Torti, S.V. (2001). **p53-independent apoptosis mediated by tachpyridine, na anti-cancer iron chelator.** *Carcinogenesis*. 22: 1607-1614.
- Alexander, A. (2000). **The CD45 tyrosine phosphatase: a positive e negative regulator of immune cell function.** *Sem. Immunol.* 12: 349-359.
- Allen, R.G. e Tresini, M. (2000) **Oxidative stress e gene regulation.** *Free Radic. Biol. Med.* 28: 463-499.
- Aoyama, H., Melo, P. S., Granjeiro, P.A., Haun, M. and Ferreira, C. V. (2000). **Cytotoxicity of okadaic acid e kinetic characterization of protein tyrosine phosphatase activity in V79 fibroblasts.** *Pharm. Pharmacol. Comm.* 6: 331-334.
- Baksh, S. and Burakoff, S.J. (2000). **The role of calcineurin in lymphocyte activation.** *Sem. Immunol.* 12: 405-415.
- Balls, M. and Fentem, J.H. (1992) **The use of basal cytotoxicity e target organ toxicity tests in hazard identification e risk assessment.** *ATLA*. 20: 368-388.
- Bernier, L. and Wang, E. (1996). **A prospective view on phosphatase e replicative senescence.** *Experimen. Gerontol.* 31: 13-19.
- Ben-Arie, A., Hagay, Z., Bem-Hurt, H., Open, M. and Dgani, R. (1999). **Elevated serum alkaline phosphatase may enable early diagnosis of ovarian cancer.** *Eur. J. Obst. Gyn Rep. Biol.*, 86: 69-71.

- Berridge, M.V., Tam,A.S., McCoy, K.D. and Wang, R. (1996). **The Biochemical and cellular Basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts.** *Biochimica.* 4: 14-19.
- Bierer, B.E. and Nathan, D.G. (1990). **The effect of desferrithiocin, na oral iron chelator, on T-cell function.** *The American Society of Hematology.* 76: 2052-2059.
- 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.
- Brown-Shimer, S., Johnson, K. A., Hill, D. E. and Bruskin, A. M. (1992). **Effect of protein tyrosine phosphatase 1B expression on transformation by the human neu oncogene.** *Cancer Res.* 52: 478-482.
- Chinkers, M. (2001). **Protein phosphatase 5 in signal transduction.** *Trends Endocrinol. Met.* 12: 28-32.
- Chou, A.C., Chevli, R. and Fitch C.D. (1980). **Ferriprotoporphyrin IX Fulfills the Criteria for Identification as the Chloroquine Receptor of Malaria Parasites.** *Biochemistry.* 19: 1543-1549.
- Cohen, P. (1988). **Protein phosphorylation e hormone action.** *Proc. Roy. Soc. Lond. (Biol).* 234: 115-144.
- Cohen, P. (1989). **The structure e regulation of protein phosphatase.** *Annu Rev. Biochem.* 58: 453-508.
- Cyert, M.S. and Thorner, J. (1989). **Putting it on e taking it off: phosphoprotein phosphatase involvement in cell cycle regulation.** *Cell.* 57: 891-893.

- 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 e protects against glutamate neurotoxicity.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 9808-9812.
- 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: 106-110.
- Denizot, F. and Lang, R. (1986). **Rapid colorimetric assay for cell growth e survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity e reliability.** *J. Immunol. Meth.* 89: 271-277.
- Denu, J.M., Stuckey, J.A. and Dixon, J.E. (1996). **Form e function in protein dephosphorylation.** *Cell.* 87: 361-364.
- 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.
- Egan, T.J. and Marques, H.M. (1999). **The role haem in the activity of chloroquine e related antimalarial drugs.** *Coordination Chemistry Reviews.* 190-192: 493-517.
- Fischer, G., Witman Liebold, B., Lang, K., Kieffhaber, T. and Schmid, F.X. (1989). **Cyclophilin e peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins.** *Nature.* 337: 476-478.
- Freason, J.A. and Alexeer, R.D. (1996). **Protein tyrosine phosphatases in T-cell development, apoptosis e signalling.** *Immunology Today.* 17: 385-391.

- Freshney, R.I. (1994). **In culture of animal cells. A manual of Basic Techniques.** 3rd. Ed. Wiley-Liss.
- Garcia, A, Cayala, X. and Sontag, E. (2000). **Protein phosphatase 2A: a definitive player in viral e parasitic regulation.** *Microbes e Infection.* 2: 401-407.
- Ginsburg, H., Famin, O., Zhang, J. and Krugliak. (1998). **Inhibition of Glutathione –dependent Degradation of Heme by Chloroquine e Amodiaquine as a Possible Basis for Their Antimalarial Mode of Action.** *Biochemical Pharmacology.* 56: 1305-1313.
- Goodman, L.S. and Gilman, A. (1996). **As Bases Farmacológicas da Terapêutica.** 40: 710-724.
- Granjeiro, J. M. (1994). **Purificação e caracterização da fosfatase ácida do rim bovino.** *Tese de Mestrado, Instituto de Biologia/UNICAMP.*
- Harrison, S., Page, C. P. and Spina, D. (1999). **Airway nerves e 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.
- Huchon, D, Ozon, R. and Demaille, J.G. (1981). **Protein phosphatase-1 is involved in Xenopus oocyte maturation.** *Nature.* 294: 358-359.
- Hunter, T. (1995). **Protein kinases e phosphatases: The yin e yang of protein phosphorylation e signaling.** *Cell.* 80: 225-236.

- Ichiro, I., Michikawa, M. and Yanagisawa, K. (1999). **Enhancement of MTT, a tetrazolium salt, exocytosis by amyloid β - protein and chloroquine in cultured rat astrocytes.** *Neuroscience Letters*. 266: 129-132.
- Ingebritsen, T. S. and Cohen, P. (1983). **Protein phosphatases: properties e role in cellular regulation.** *Science*. 221: 331-338.
- Jia, Z. (1997). **Protein phosphatase: structure e implications.** *Biochem. Cell Biol.* 75: 17-26.
- Jin, N.; Hatton, N.D.; Harrington, M.A.; Xia, X.; Larsen, S.H. e Rhoades, R.A. (2000). **H₂O₂-induced EGR-1, Fra-1, e C-Jun gene expression is mediated by tyrosine kinase in aortic smooth muscle cells.** *Free Rad. Biol. Med.* 29: 736-746.
- Johnson, L. N. and Barford, D. (1993). **The effect of phosphorylation on the structure e function of proteins.** *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 22: 199-232.
- Kenner, K. A., Hill, D. E., Olefsky, J. M. and Kuasri, J. (1993). **Regulation of protein tyrosine phosphatases by insulin e insulin-like growth factor I.** *J. Biol. Chem.* 268: 25455-25462.
- Krebs, E.G. and Graves, J.D. (2000). **Interactions between protein kinases e proteases in cellular signaling e regulation.** *Advances in Enzymology e Regulation or Advan. Enz. Regul.* 40: 441-470.
- Labib, K. and Nurse, P. (1993). **Bring on the phosphatases.** *Curr. Biol.* 3: 164-166.

- Landewe, RBM., Miltenburg, AMM., Verdonk, MJA., Verweij, C.L., Breedveld, FC e Daha MR, Dijkmans BAC. (1995). **Chloroquine inhibits T-cell proliferation by interfering with IL-2 production e responsiveness.** *Clinical e Experimental Immunology*. 102: 144-151.
- Lee, R.B. (1988). **Phosphate influx e extracellular phosphatase activity in barley roots e rose cells.** *New Phytol*. 109: 141-148.
- Lederman, H.M., Cohen A., Lee ,J.W., M.H Freedman e E.W Gelfe. (1984). **Deferoxamine: a reversible S- phase inhibitor of human lymphocyte proliferation.** *The American Society of Hematology*. 64: 748-753.
- Liu, Y., Schubert, D., (1997). **Citotoxic amyloid peptides inhibit cellular 3-(4,5-dimethylthiazol -2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction by enhancing MTT reduction by enhacing MTT formazan exocytosis.** *J Neurochem*. 69, 2285-293.
- Loveland, B.E., Johns, T.G., Mackay, I.R., Vaillant, F., Wang. Z.X. e Hertzog, P. J. (1992). **Validation of the MTT dye assay for enumeration of cells in proliferative e antiproliferative assays.** *Biochem. Int*. 27: 501-510.
- Madesh, M. and Balasubramanian, K.A. (1998). **Effect of antimalarial drugs on rat enterocyte mitochondrial phospholipase D activity.** *Life Sciences*. 62: 177-184.
- Loyevsky, M., John, C., Dickens,Zaloujnyi, I. and Gordeuk. (1997). **Aminothiols Multidentate Chelators as Antimalarial.** *Biochemical Pharmacology* .54: 451-458.

- Mabeza, G.F., Loyevsky, M., Gordeuk, V.R. Weiss G. (1999). **Iron Chelation Therapy for Malaria. *Pharmacol Ther.*, 81: 53-75.**
- MacKintosh, C. and MacKintosh, R. W. (1994). **Inhibition of protein kinases e phosphatases. *Trends Biochem. Sci.* 17: 444-447.**
- Maehama, T. and Dixon, J.E. (1998). **The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate. *J. Biol. Chem.* 273: 13375-13378.**
- Magwere, T., Naik, Y.S. and Hasler, J.A. (1997). **Effects of chloroquine treatment on antioxidant enzymes in rat liver e kidney. *Free Radical Biology & Medicine.* 232: 321-327.**
- Matkó, J. and Nagy, P. (1997). **Fluorescent lipid probes 12- AS e TMA-DPH report on selective, purinergically induced fluidity changes in plasma membranes of lymphoid cells. *Journal of Photochemistry e Photobiology B: Biology.* 40: 120-125.**
- Moore, F., Weekes, J. and Hardie, D.G. (1991). **Evidence that AMP triggers phosphorylation as well as direct allosteric activation of rat liver AMP-activated protein kinase. *Eur. J. Biochem.* 199:691-697.**
- Mosmann, T. (1983). **Rapid colorimetric assay for cellular growth e survival: application to proliferation e cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* 65: 55-63.**
- Niihara, Y., Shalev, O., Hebbel.R.P., Wu, H., Tu, A., Akiyama D.S. and Tanaka, R.K. (2000). **Desferoxamine (DFO) Conjugated With Starch Decreased NAD redox Potential of Intact Red Blood Cells (RBC): Evidence for DFO as an**

- Extracellular Inducer of Oxidant Stress in RBC.** *American Journal of Hematology.* 65: 281-284.
- Olliaro, P. (2001). **Mode of action e mechanisms of resistance for antimalarial drugs.** *Pharmacology & Therapeutics.* 89: 207-219.
- Östman, A and Böhmer, D.F. (2001) **Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatases.** *Trends Cell Biol.* 11: 258-266.
- Palou, E., Fuente – Garcia, A.M., Nicolás, M.J., Vilardell, C., Vives, J. e Gayá, A. (1997). **CD148, a membrane protein tyrosine phosphatase, is able to induce tyrosine phosphorylation on human lymphocytes.** *Immunology Letters.* 57: 101-103.
- Quade, M.J., Roth, J.A.(1999). **Dual-color flow cytometric analysis of phenotype, activation marker expression, e proliferation of mitogen-stimulated bovine lymphocyte subsets.** *Veterinary Immunology e Immunopathology.* 67: 33-45.
- Ramponi, G. and Stefani, M. (1997). **Strutural, Catalytic, e Functional Properties of Low Mr Phosphotyrosine protein phosphatases.** Evidence of a Long Evolutionary History. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 29: 279-292.
- 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 e lysosomal function: in vitro effect of 24 metals.** *ATLA.* 21: 501-507.
- Sakurada, K., Zheng, B. and Kuo, J.F. (1992). **Comparative effects of protein phosphatase inhibitors (okadaic acid e calyculin A) on human leukemia**

- HL60, HL60/ADR e K562 cells.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187: 488-492.
- Sasaki, T., Sasaki-Irie, J. and Penninger J.M. (2001). **New insights into the transmembrane protein tyrosine phosphatase CD45.** *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 33: 1041-1046.
- Swanson, R.V., Alex, L.A and Simon, M.I. (1994). **Histidine e aspartate phosphorylation: two – component systems e the limits of homology.** *TIBS.* 19: 485-490.
- Schiele, F., Artur, Y., Floc'h, A.Y. and Sieste, G. (1988). **Total Tartrate-Resistant, e Tatrare-Inhibited Acid Phosphatases in Serum: Biological Variations e References Limits.** *Clinical Chemistry.* 344: 685-690.
- Schlesinger, P.H., Krogstad, D.J. and Herwaldt, B.L. (1988). **Antimalarial Agents: Mechanisms of Action.** *Antimicrobial Agents e Chemoterapy.* 32: 793-798.
- Shenolikar, S., and Nairn, A.C. (1991). **Protein phosphatases: recent progress.** *AdvSecond Messenger Phosphoprotein Res.* 23: 1-121.
- Shenolikar, S. (1994). **Protein serine/threonine phosphatases – New avenues for cell regulation.** *Annu. Ver. Cell Biol.* 10: 55-86.
- Silva, T.M.A. (2002). **Relação entre o efeito citotóxico de biocompostos sobre linfócitos T e a atividade de fosfatases.** *Tese em andamento. Instituto de Biologia/UNICAMP.*
- Stark, D.M., Shopsis, C., Borenfreud, E. and Babich, H. (1986) **Progress and problems in evaluating and validating alternative assay in toxicology.** *Fd. Chem. Toxic.* 24(6-7): 449-455.

- Szamel, M., Ebel, U., Uciechowski, P., Kaefer, V. and Resch, K. (1997). **T cell antigen receptor dependent signalling in human lymphocytes: cholera toxin inhibits interleukin-2 receptor expression but not interleukin-2 synthesis by preventing activation of a protein kinase C isotype, PKC- α** . *Biochim. Biophys. Acta.* 1356: 237-248.
- Thomas, M.L. and Brown, E.J. (1999). **Positive e negative regulation of Src-family membrane kinases by CD45**. *Immunology Today*. 20: 406-411.
- Thomas, J.A and Mallis, R.J. (2001). **Aging e oxidation of reactive protein sulfhydryls**. *Experimental. Gerontology*. 36: 1519-1526.
- Tonks, N. K. and Neel, B. G. (1996). **From form to function: signaling by protein tyrosine phosphatases**. *Cell*. 87: 365-368.
- Tsiani, E. and Fantus, G.I. (1997). **Vanadium Compounds: Biological Actions e Potential as Pharmacological Agents**. *TEM*. 8: 51-58.
- Villar, R., Alvariño, M.T. and Flores, R. (1997). **Inhibition by ajoene of protein tyrosine phosphatase activity in human platelets**. *Biochemica et Biophysica Acta*. 1337: 233-240.
- Vippagunta, S.R., Dorn, A., Bubendorf, A., Ridley, R.G. and Vennerstrom. (1999). **Deferoxamine: Stimulation of Hematin Polymerization e Antagonism of Its Inhibition by Chloroquine**. *Biochem Pharm.* 58: 817-824.
- Vistica, D.T., Skehan, P., Skudiero, D., Monks, A., Rittmann, A. and Boyd, N.R. (1991). **Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical**

- examination of selected parameters affecting formazan reduction.** *Cancer Res.* 51: 2515-2520.
- Walter, P.B., Knutson, M.D., Paler-Martinez, A., Lee, S., Xu, Y., Viteri, F.E. and Ames, B.N. (2002). **Iron deficiency e iron excess damage mitochondria e mitochondrial DNA in rats.** *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99: 2264-2269.
- Walton, K. M. and Dixon, J. E. (1993) **Protein tyrosine phosphatases.** *Annu Rev. Biochem.* 62: 101-120.
- Wera, S. and Hemmings, B. A. (1995). **Serine/Threonine protein phosphatases.** *Biochem. J.* 311: 17-29.
- Wolf, R., Wolf, D. and Ruocco, V. (2000). **Antimalarials: Unapproved Uses or Indications.** *Clinics in Dermatology.* 18: 17-35.
- Wu, F. Y. –H. and Sun, T. –P. (1999). **Vitamin K3 induces cell cycle arrest e cell death by inhibiting cdc25 phosphatase.** *European Journal of Cancer* 35 (9): 1388-1393.
- Zhang, Zhong-Yin. (2001). **Protein tyrosine phosphatases: prospects for therapeutics.** *Current Opinion in Chemical Biology.*, 5: 416-423.
- Zolnierowicz, S. (2000). **Type 2A Protein phosphatase, the Complex regulator of Numerous Signaling Pathways.** *Biochemical. Pharmacology.*, 60: 1225-1235.
- Yamaga, A.; Taga, M.; Hashimoto, S. and Ota, C. (1999) Comparison of bone metabolic markers between maternal e cord blood. *Hormone Res.* 51: 277-279.
- Xu, D., Rovira, L.L. e Finkel. T. (2002). Oxidants Painting the Cysteine Chapel: Redox Regulation of PTPs. *Developmental Cell.* 2: 251-259.

Anexo

- **Cytotoxicity of antimalarial drug in the human lymphocytes.** sob a forma de painel, durante a XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, realizada no período de 19 a 22 de maio, em Caxambu-MG.
- **Cytotoxicity of chloroquine in human lymphocytes.** sob a forma de painel, durante a XVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE, realizada no período de 29 de agosto a 1º de setembro, em Caxambu-MG.
- **Effect of antimalarial drugs in the protein tyrosine phosphatase from human lymphocytes** sob a forma de painel, durante a XXXI Reunião Anual Da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBQ, realizada no período de 18 a 21 de maio, em Caxambu-MG.
- **Efeito da quinina nas proteínas fosfatases de linfócitos humanos.** sob a forma de painel, durante a XVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE, a ser realizada no período de 28 a 31 de agosto, em Salvador-BA.

Artigo submetido a publicação

Title: Evaluation of cytotoxicity of chloroquine on human primary lymphocytes culture

Authors: Picardi, K.P, Melo, P. S., Haun, M., Aoyama, H. and Ferreira, C. V.

Journal: *Toxicology Letters*