

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Biologia



Roberta Regina Ruela de Sousa

**Compostos naturais como
moduladores de vias de transdução
de sinal em células tumorais**

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

ROBERTA REGINA RUELA DE SOUZA

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Hiroshi Aoyama

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

Orientador: Prof. Dr. Hiroshi Aoyama

Co-Orientador: Profa. Dra. Carmen Veríssima Ferreira

Campinas, 2008.

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

So85c

Sousa, Roberta Regina Ruela de
Compostos naturais como moduladores de vias de
transdução de sinal em células tumorais / Roberta Regina
Ruela de Sousa. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Hiroshi Aoyama.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Flavonóides. 2. Compostos naturais. 3.
Sinalização Celular. 4. Apoptose. 5. Ferruginol. I.
Aoyama, Hiroshi, 1943-. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

(pbg/ib)

Título em inglês: Natural Compounds as modulators of transduction pathways in tumor cells.

Palavras-chave em inglês: Flavonoids; Natural compounds; Cell-signalling; Apoptosis; Terpenes.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Doutora em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: José Mauro Granjeiro, Alexandre Donizeti Martins Cavagis, Pietro Ciancaglini, Cláudio Chrysostomo Werneck.

Data da defesa: 15/12/2008.

Programa de Pós-Graduação: Bioquímica.

Campinas, 15 de dezembro de 2008

Banca examinadora

Prof. Dr. Hiroshi Aoyama (Orientador)

Assinatura

Prof. Dr. José Mauro Granjeiro

Assinatura

Prof. Dr. Alexandre Donizeti Martins Cavagis

Assinatura

Prof. Dr. Pietro Ciancaglini

Assinatura

Prof. Dr. Cláudio Chrysostomo Werneck

Assinatura

Prof. Dr. Francesco Langone

Assinatura

Prof. Dr. Mário Tyago Murakami

Assinatura

Prof. Dr. Jörg Kobarg

Assinatura

Agradecimentos

A todas as pessoas do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da Unicamp, pela convivência, alegria, festinhas, conversas pelo corredor.

À Capes pela bolsa de doutorado, à Fapesp pelos materiais de laboratório, ao Faepex/Unicamp pelos auxílios a congressos e estágios no exterior.

Aos professores do Departamento de Bioquímica: Profa. Eneida de Paula, Prof. Eduardo Galembeck, Prof. Cláudio Werneck, Prof. Carlos Bonafé e Profa. Ione Salgado pelo incentivo à minha formação docente, pela oportunidade de participar das aulas de Bioquímica, como monitora para os cursos de Biologia e Enfermagem. Essas aulas foram às que eu gostaria de ter tido na faculdade: dinâmicas e ricas em conteúdos aplicados.

À Secretaria de Educação do Estado pela criação do programa de Educação Continuada Teia do Saber e aos professores coordenadores dos módulos que me convidaram a participar da Teia, onde tive a oportunidade de trabalhar com os professores da rede pública de ensino, criar aulas de ciências inovadoras, o que contribuiu enormemente para minha formação, uma experiência fascinante. E obrigada aos professores da rede pública pelas lições de vida.

Às minhas amigas Luli e Anamaria. Luli, grande amiga, sorridente, faladeira, companheira de uma cervejinha! Super amiga que me ajudou a sair da tristeza em que estive por algum tempo, até me levou para praia para me animar! Obrigada pelos momentos de alegria, bebedeira e choradeira, obrigada por estar do meu lado em todos os momentos em que precisei! Obrigada por ter me ajudado a resolver toda a burocracia de marcar a defesa e ter me dado apoio nas minhas loucuras! Anamaria, animação em pessoa, que me ajudou na elaboração de posters para congressos, na formatação da tese, em todas essas coisas de design, arte, etc, mesmo à distância! Obrigada pela amizade, pelos momentos de descontração, pelos jantares e festinhas!

Aos meus amigos de Groningen: Ana, Maria, Karla, Kaushal e Mateusz pelos momentos divertidos em terras distantes. Obrigada a todos do Departamento de Biologia Celular UMCG por toda ajuda. Em especial, gostaria de agradecer a Gwenny pela ajuda na discussão dos resultados, pelas opiniões, sugestões de experimentos, por ter me apresentado o Facs, o microscópio eletrônico, por ter conseguido os mais diversos reagentes. Ah, eu não poderia deixar também de agradecer por ter me ajudado nas traduções de cartas em Dutch! E à Karla, uma pessoa sincera, simples, correta e amiga. Obrigada por me ensinar muitas metodologias e por ajudar nos experimentos.

Ao pessoal do Laboratório de Bioensaios e Transdução de Sinal e Enzimologia, Erika, Marilena, Cacá, Luli, Giselle, William, Antônio, Ana, Paula, Daisy, Rodrigo, Mika, Cláudia e Denise, pela amizade, ajuda nos experimentos, discussão, descontração na hora do café, nos

churrascos na República, nos happy hours. Em especial, agradeço à Cacá, forte, decidida e confiante. Uma coisa que aprendi com você foi nunca desistir! Isso eu levo comigo em todas as situações da minha vida!

À secretária do Departamento de Bioquímica, Marina e à secretária do curso de pós graduação BFM, Andréia, pela amizade e por solucionar todos os problemas burocráticos durante meu período na Unicamp.

A todos os meus amigos, da faculdade, do colégio, dos cursos de inglês, da pós, são vocês que fazem a minha vida mais alegre, animada e feliz.

Ao Prof. Hiroshi, por ter me aceitado na iniciação científica, mestrado e doutorado. Obrigada pelas oportunidades, pela paciência nos momentos de crise do projeto, pelas conversas, conselhos sábios, pelo suporte em meus estágios, pela confiança em meu trabalho. Um exemplo de pessoa simples, inteligente, paciente, alegre, de bem com a vida, dedicado ao ensino, aos alunos sempre priorizando o lado humano. Muito obrigada por tudo!

À Profa Carmen, co-orientadora, um exemplo de mulher, trabalhadora, persistente, inteligente, dedicada e, acima de tudo, animadíssima. Tendo a metade da disposição dela, eu estaria feliz! Obrigada pela injeção de ânimo em todas as vezes em que eu não encontrava uma luz no final do túnel. Você não só me mostrou o “final do túnel” como me mostrou os muitos lugares a que ele levava! E muito obrigada por ter confiado em mim.

Ao Prof. Maikel P. Peppelenbosch, pessoa extremamente inteligente, dinâmica e entusiasta, agradeço extremamente por ter me recebido em seu laboratório e pela experiência em um grupo internacional.

Ao Prof. Peter Swaan, por ter me recebido em seu laboratório na University of Maryland. Obrigada pela oportunidade de trabalhar em um laboratório onde os pedidos feitos pela manhã chegavam no final da tarde! Uma experiência fascinante. Agradeço também a toda sua equipe, que me auxiliou em tudo que precisei e, em especial, à Tatiana, brasileira geminiana, que me ajudou em tudo que precisei durante meu período no laboratório, desde me buscar no aeroporto, emprestar coisas para casa, me ensinar experimentos e resolver os assuntos burocráticos, muito obrigada!

Ao meu pai Pedro e à minha mãe Lucelia, devo-lhes a minha vida, literalmente! Estou onde cheguei graças à obra de vocês, que cuidaram de mim com o todo amor e dedicação e, em todos os momentos difíceis, prezaram pela minha saúde e educação. Obrigada por me apoiarem em minhas escolhas profissionais e por financiarem os estudos de línguas estrangeiras, pois foi meu cartão de embarque para o mundo, o mundo que desde sempre eu quis conhecer! Muito obrigada por tudo. Amo vocês!

Aos meus irmãos, Renan e Adriano, pelo carinho e amizade. Sei que não estive muito presente ultimamente, espero que isso logo se reverta, mas saibam que vocês sempre estarão no meu coração.

Às minhas tias Augusta, Cecília e Denise por sempre me apoiarem e incentivarem.

Ao meu querido amado Bispo, namorado e companheiro para todos os momentos! Simples, de um coração enorme, sincero, alegre e bem humorado. Obrigada pela ajuda na aula de qualificação e em todas as minhas aulas, pelas dicas na tese, pelo suporte nos momentos depressivos do meu doutorado. Mesmo com a distância que nos separou nos últimos meses, esteve ao meu lado, me apoiando e me esperando. Esse tempo longe de você só me deu mais certeza de que quero estar ao seu lado sempre.

E obrigada meu Deus pelas pessoas boas que aparecem no meu caminho, pelas oportunidades que a mim são apresentadas e continuo orando para que eu sempre faça a melhor escolha.

*D*edico essa tese a todos as pessoas que foram acometidas pelo câncer e àquelas que possuem familiares e amigos que sofrem com essa enfermidade. Que esse trabalho seja mais um passo em busca de um tratamento efetivo contra a doença.

Resumo

A busca por compostos que atuem especificamente no tumor e causem menos efeitos colaterais é o grande desafio da pesquisa no tratamento contra o câncer. Muitos compostos naturais extraídos de plantas têm apresentado resultados promissores como agentes moduladores de vias de transdução de sinais em diversos tipos de tumores. Os flavonóides, compostos polifenólicos encontrados em diversos alimentos como frutas, chás e vinhos, têm recebido bastante atenção em função dos seus efeitos quimiopreventivos e quimioterapêuticos. Nos últimos anos, muitos estudos relacionados à ação dos terpenos em doenças foram desenvolvidos, decorrentes das suas propriedades anti-inflamatórias, antimicrobiana, gastroprotetora e antitumoral. Entretanto, poucos estudos com enfoque molecular foram desenvolvidos para entender o mecanismo de indução de morte de células tumorais por tais compostos.

O objetivo deste trabalho foi estudar a ação dos flavonóides apigenina e fisetina e do diterpeno ferruginol, sobre as vias de transdução de sinal envolvidas na proliferação e morte em células de leucemia e câncer de próstata.

Todos os três compostos estudados levaram à morte das células tumorais por apoptose. As células leucêmicas tratadas com fisetina apresentaram aumento da expressão de NF κ B, ativação da MAPK p38 e aumento dos níveis de fosforilação de proteínas. A apigenina, por sua vez, mostrou-se um forte inibidor de quinases, especificamente as envolvidas com a proliferação celular, como PI3K, AKT, Src e MAPK, além de induzir apoptose através da via intrínseca. O ferruginol foi capaz de inibir e/ou regular negativamente PI3K, STAT3 e STAT5, proteínas tirosinas fosfatases e proteínas quinases envolvidas com a regulação do ciclo celular. Em ambiente redutor, o efeito citotóxico do ferruginol foi drasticamente impedido, indicando que sua atividade antitumoral pode estar relacionada com a modulação do status redox.

O presente trabalho mostrou que os compostos naturais fisetina, apigenina e ferruginol apresentaram um grande potencial como agentes quimioterápicos.

Palavras-chave: Flavonóides, Compostos Naturais, Sinalização Celular, Apoptose, Ferruginol.

Abstract

The search for compounds that specifically act on tumors, with low side effects, is a great aim in the studies related to cancer treatment. Many natural compounds isolated from plants have presented promising results as modulating agents of the signal transduction pathways in several types of tumors.

Flavonoids, polyphenolic compounds largely distributed in foods such as fruits, teas and wines, have been greatly focused due to their chemopreventive and chemotherapeutic effects. In the last years, many studies about the action of terpenes in diseases have been done, due to their antiinflammatory, antimicrobial, gastroprotective and antitumoral properties. However, few molecular studies have been developed to understand the mechanism of cell death induction by these compounds.

The aim of this work was to define the molecular action of apigenin, fisetin and ferruginol on the signal transduction pathways involved in the leukemic and prostate cancer cells proliferation and death.

All the three compounds studied provoked the cell death by apoptosis. Leukemic cells treated with fisetin presented an increase of NF κ B expression and protein phosphorylation levels and activation of p38 MAPK. Apigenin showed to be a strong inhibitor of kinases involved with cellular proliferation, such as, PI3K, AKT, Src, MAPK and additionally to induce apoptosis via the intrinsic pathway. Ferruginol was able to inhibit and/or to negatively regulate PI3K, STAT3 and 5, protein tyrosine phosphatases and protein kinases involved in the regulation of the cell cycle. In reducing environment, the cytotoxic effect of ferruginol was drastically impeded, which indicates that the anti-tumoral activity of ferruginol might be related to redox status modulation.

The present work showed that the natural compounds fisetin, apigenin and ferruginol presented great potential as chemotherapeutic agents.

Keywords: Flavonoid, Natural Compounds, Cell Signaling, Apoptosis, Ferruginol.

Este trabalho foi viabilizado com recursos das seguintes instituições:

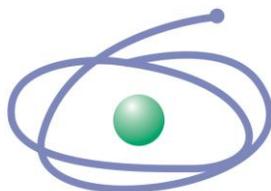


UNICAMP

Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP



Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FAPESP



C A P E S

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES



umcg

University Medical Center Groningen - UMCG, Groningen, The Netherlands



Hubrecht Institute, Utrecht, The Netherlands

Lista de Abreviaturas

7-AAD: 7-amino-actinomicina D

AIF (*apoptosis-inducing factor*): fator de indução de apoptose

AML: leucemia mielóide aguda

APAF-1 (*apoptotic protease-activating factor-1*): fator 1 de ativação de apoptose

Bad (*Bcl-2 antagonist of cell death*): antagonista de Bcl-2 associado à morte celular

Bak (*Bcl-2 antagonist killer 1*): antagonista de Bcl-2 associado à morte celular

Bax (*Bcl-2 associated x protein*): proteína x associada à Bcl-2

Bcl-2 (*B-cell lymphoma protein 2*): proteína inibidora de apoptose detectada primeiramente em linfomas de células B

BH: domínio de homologia à Bcl-2

Bid (*BH3 interacting domain death agonist*): agonista de domínio de morte associado à BH3

Cdc(s) (*cell division cycle*): proteína(s) reguladora(s) da divisão celular

CDK (*cyclin dependent kinase*): quinase dependente de ciclinas

CK (*Casein Kinase*): caseína quinase

CLL: leucemia linfocítica crônica

c-Myc: proteína oncogênica

COX-2: Cyclooxygenase -2

CuZnSOD: isoforma de superóxido dismutase dependente de cobre e zinco

DISC (*death-inducing signaling complex kinases*): quinases reguladas por sinal extracelular

EDTA (*ethylenediaminetetraacetic acid*): ácido etilenodiaminotetraacético

FADD (*Fas-associated death domain protein*): proteína com domínio de morte associada à Fas

Fas / Apo1 / CD95: membro da superfamília de receptores TNF

FasL (*Fas-ligand*): proteína ligante de receptor Fas

GMCSF (*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*): Fator de estimulação de colônia de macrófago-granulócito

GSH: glutationa reduzida

GSSH: glutationa oxidada

GTP: guanosina tri-fosfato

HL60: células de leucemia promielocítica aguda

HEPES (*N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid*): ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfônico

Hsp27 (*heat shock protein 27kDa*): proteína de choque térmico de massa molecular 27kDa

IAP (*inhibitory apoptosis protein type 1*): proteína inibidora de apoptose

IKK α (*I Kappa B kinase alpha*): quinase α de I κ B

IL: interleucina

I κ B: proteína inibidora de NF κ B

JAK (*Janus kinase*): quinase Janus

JNKs (*c-Jun NH2 terminal protein kinases*): proteínas quinases NH₂ - terminal de c-Jun

LMWPTP (*Low Molecular Weight Protein Tyrosine Phosphatase*): proteína tirosina fosfatase de baixa massa molecular

MAPKK: MAPK quinase

MAPKPs / MKPs: fosfatases de MAPKs

MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*): proteínas quinases ativadas por mitógenos

Mcl-1 (*Myeloid cell leukemia sequence 1*): proteína antiapoptótica da família Bcl-2

MDR (*multidrug resistance*): fenótipo celular caracterizado pela resistência a múltiplas drogas

MEK (*MAPK ERK kinase*): proteína quinase de ERK

MMP-9 (*matrix metalloprotease 9*): metaloproteinase de matriz tipo 9

MnSOD: isoforma de superóxido dismutase dependente de manganês

MRP1 (*multidrug resistance-associated protein*): proteína de resistência a múltiplas drogas

NF κ B: fator nuclear kappa B

NK: células *natural killer*

Omi/HtrA2 (*Omi stress-regulated endoprotease/high temperature requirement protein A2*): serina protease inibidora de IAPs

p21: proteína inibidora de quinases dependentes de ciclinas

p38: proteína MAPK p38

p53: proteína supressora de tumor p53

PARP (*poli ADP-ribose polymerase*): poli (ADP-ribose) polimerase

PC3: células de câncer de próstata

PDK: (*phosphoinositide-dependent kinase-1*): quinase dependente de fosfatidilinositol

PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*): fosfatidilinositol-3 quinase

PKA (*protein kinase A*): proteína quinase dependente de AMP cíclico

PKB / AKT (*protein kinase B*): proteína quinase B

PKC (*protein kinase C*): proteína quinase C

PMSF (*phenylmethanesulfonyl fluoride*): fluoreto de fenilmetilsulfonila

PP2A: proteína fosfatase 2A

PtdInos: (*phosphatidil inositol*): fosfatidil inositol

PTEN (*phosphatase and tensin homolog*): proteína tirosina fosfatase supressora de tumor

PTK: proteína tirosina quinase

PTPs: proteínas tirosina fosfatases

PVDF (*Polyvinylidene Fluoride*): membrana de fluoreto de polivinilideno

Raf: serina-treonina quinase implicada na sinalização de crescimento e sobrevivência celular.

Ras (*rat sarcoma viral oncogene*): família de proteínas GTPásicas reguladoras de diversas vias de transdução de sinais associadas ao crescimento, diferenciação e apoptose celular.

Rb: proteína retinoblastoma

RIP (*receptor interacting protein kinase*): proteína quinase de interação com receptor

ROS (*reactive oxygen species*): espécies reativas de oxigênio

SHP2 (*SH2 containing protein tyrosine phosphatase 2*): proteína tirosina fosfatase com domínio SH2

Smac/DIABLO (*second mitochondria-derived activator of caspase / direct IAP binding protein with low PI*): proteína mitocondrial inibidora de IAPs

SDS: detergente dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE (SDS-Poliacrilamida Gel): gel de poliacrilamida com SDS

SOD: superóxido dismutase

STATs (*signal transducers and activators of transcription*): moléculas transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição

tBid: forma truncada de Bid

TBS (*Tris Buffered Saline*): tampão tris salino

TBST: tampão tris salino com tween-20

TNF (*tumor necrosis factor*): fator de necrose tumoral

TNFR (*tumor necrosis factor receptor*): receptor do fator de necrose tumoral

TRADD (*TNF receptor associated death domain*): domínio de morte associado à TNFR

TRAF (*TNF receptor-associated factor*): fator associado ao receptor TNF

TRAIL/Apo 2L (TNF receptor apoptosis-inducing ligand): membro da superfamília de receptores TNF

VDAC (*voltage-dependent anion channel protein 2*): proteína de canal de anion dependente de voltagem

VEGF (*Vascular endothelial growth factor*): fator de crescimento endotelial vascular

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Produtos naturais.....	1
1.1.1. Flavonóides	2
1.1.2. Terpenos	7
1.2. Câncer	9
1.2.1. Leucemia	10
1.2.2. Câncer de próstata.....	11
1.3. Morte celular	13
1.3.1. Apoptose.....	13
1.4. Proteínas fosfatases.....	18
1.5. Proteínas quinases	19
2. OBJETIVOS	21
3. METODOLOGIA	22
3.1. Cultura de células	22
3.2. Viabilidade celular	23
3.3. Western Blotting.....	24
3.4. Atividades de Enzimas Antioxidantes	24
3.5. Determinação do estresse oxidativo por meio da dosagem da atividade de enzimas marcadoras.....	25
3.6. Determinação da concentração de proteína.....	26
3.7. Arranjo Quinômico (Pepchip).....	26
3.8. Imunoprecipitação e atividade da LMWPTP	27
3.9. Atividade de Caspases 3, 8 e 9	28
3.10. Translocação nuclear de NFkB p65 e AIF	28
3.11. Quantificação de glutathiona reduzida e oxidada	29
3.12. Avaliação de apoptose por citometria de fluxo.....	29
3.13. Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo.....	31
RESULTADOS.....	33
DISCUSSÃO GERAL	81
CONCLUSÃO	90
REFERÊNCIAS	92

I.

INTRODUÇÃO

1.1. Produtos naturais

Todos os organismos vivos, em especial os vegetais, produzem milhares de compostos orgânicos de baixa massa molecular, que mesmo não apresentando função aparente em processos básicos como crescimento e desenvolvimento celular, não deixam de ser essenciais para a sobrevivência da espécie, e por essa razão, têm sido referidos como produtos naturais ou metabólitos secundários (Gershenzon and Dudareva, 2007). Além disso, tais compostos têm recebido grande destaque na medicina, agricultura e indústria, o que tem levado a inúmeros estudos sobre suas sínteses e atividades biológicas.

Na história da humanidade, o uso de extratos vegetais para prevenção, cura, ou simplesmente alívio de várias enfermidades é uma prática muito antiga. Em nossa história mais recente, o uso de produtos naturais como medicamento evoluiu da administração de simples extratos, chás, tinturas ou emplastos para o isolamento e caracterização de compostos farmacologicamente ativos (Balunas and Kinghorn, 2005).

Compostos bioativos extraídos das plantas destacam-se como potenciais fármacos, além de constituírem modelos moleculares de referência para síntese de

I. INTRODUÇÃO

novos compostos medicinais. Compostos bioativos têm sido também utilizados conjuntamente com quimioterápicos comerciais com a finalidade de potencializar as suas ações ou diminuir seus efeitos colaterais (Boik, 2001).

Muitos compostos bioativos de origem vegetal têm se destacado na prevenção e tratamento contra o câncer. A importância de compostos naturais no tratamento do câncer pode ser observada pela porcentagem relativa dessa classe de compostos que é utilizada diretamente como fármacos ou como precursores dos mesmos. Dados da literatura revelam que de todos os fármacos antitumorais disponíveis no mercado entre 1940 e 2002, cerca de 40% eram originados de produtos naturais (Newman *et al.*, 2003), como, por exemplo, a vincristina, que foi isolada de *Catharanthus roseus* (L.) e tem sido usada na clínica por mais de 40 anos (van Der Heijden *et al.*, 2004).

Uma classe de compostos naturais que vem ganhando bastante destaque nos últimos anos são os flavonóides, em razão da capacidade de prevenir doenças, principalmente câncer. A baixa incidência de câncer de próstata, por exemplo, em pessoas de países asiáticos, tem sido atribuída à alta ingestão de chá verde, rica fonte de flavonóides (Haddad *et al.*, 2006). Além disso, os flavonóides são excelentes candidatos como agentes quimiopreventivos em virtude da relativa baixa toxicidade.

1.1.1. Flavonóides

Flavonóides são compostos polifenólicos (Figura 1A) encontrados em vegetais como frutas, grãos, raízes e em bebidas, como vinho, suco, café, chá e cerveja. O interesse no estudo das atividades biológicas dos flavonóides teve início em 1936, com Rusznyák e Szent Györgyi, que foram os pioneiros no reconhecimento dos benefícios terapêuticos apresentados por esses compostos. Desde então, o estudo sobre flavonóides tem despertado cada vez mais interesse o que, atualmente, pode ser observado pelo grande aumento de pesquisas com flavonóides considerados terapeuticamente ativos. Aliando o efetivo poder antioxidante à capacidade de inibição de enzimas específicas, alta potência e baixa toxicidade sistêmica, os flavonóides são considerados compostos promissores no tratamento de uma grande variedade de doenças como câncer, alergia, aterosclerose, isquemia, degeneração neuronal e doenças cardíacas, entre outras (Sengupta *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2006).

1. INTRODUÇÃO

Por essas razões, os flavonóides podem ser considerados compostos promissores na modulação seletiva de vias de sinalização e no *design* de análogos mais potentes para uso em terapias.

Apigenina

A apigenina (4',5,7 - trihidroxiflavona) (Figura 1B) é um flavonóide comum na dieta humana, abundantemente presente em frutas e vegetais. Este flavonóide tem apresentado diversos efeitos biológicos, como na prevenção e terapia de câncer de próstata, supressão de tumorigênese e angiogênese de melanoma e carcinoma de mama, pele e cólon (Birt et al., 1997; Caltagirone et al., 2000; Wang et al., 1999; Way et al., 2004; Shukla et al., 2005). Tais efeitos estão principalmente relacionados à inibição da atividade de enzimas ou regulação da expressão de proteínas-chave responsáveis pelo desenvolvimento e progressão de patologias, como, por exemplo, supressão da expressão da COX-2, MMP-9, NOS-2, VEGF, lipoxigenases e MAP quinases (Liang et al., 1999; Kim, 2003; Fang et al., 2005).

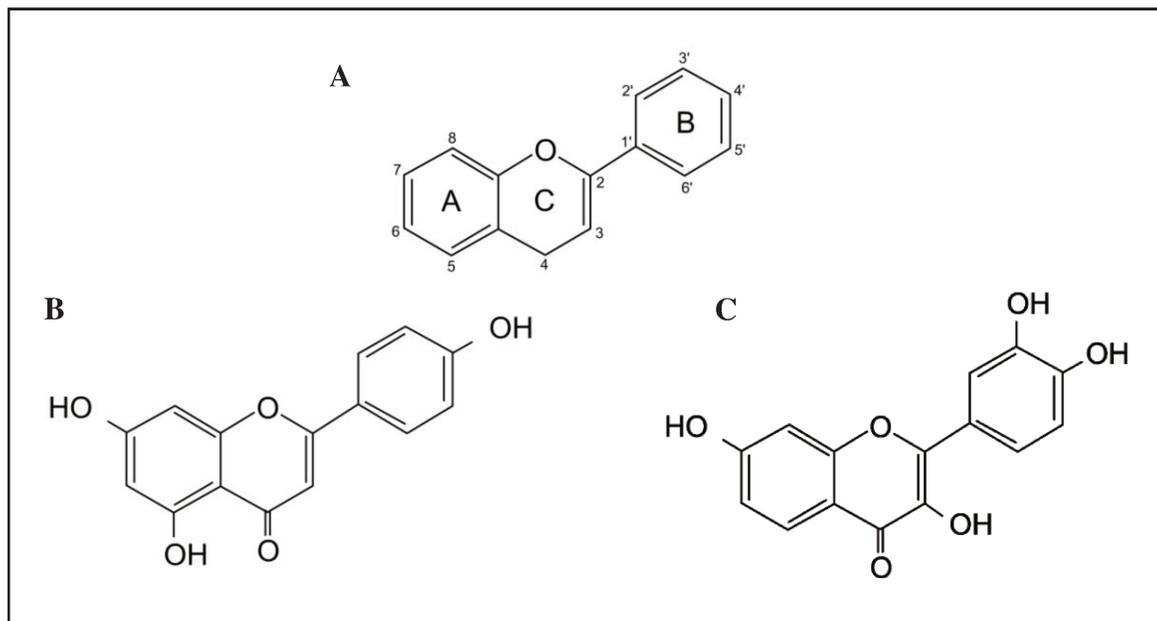


Figura 1. Estrutura dos flavonóides. (A) Estrutura geral dos flavonóides mostrando dois anéis aromáticos A e B interligados por um anel heterocíclico de oxigênio C. (B) Estrutura da apigenina. (C) Estrutura da fisetina.

I. INTRODUÇÃO

Dependendo do tecido e condições do microambiente celular, a apigenina apresenta diversos efeitos biológicos, como: proteção contra injúrias de artérias resistentes, característica que possibilita seu uso em terapias vasculares (Ma et al., 2008); atividade contra o vírus da influenza (Liu et al., 2008); inibição da diferenciação de queratinócitos por supressão de vias de sinalização da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (Balasubramanian and Eckert, 2007); estimulação da quantidade de mineral e da densidade óssea de ratos deficientes em estrógeno, com diminuição do peso corpóreo e redução do consumo de alimento, mostrando, portanto, um efeito positivo na regeneração óssea, sugerindo seu uso no tratamento da osteoporose (Park et al., 2008).

Recentemente, Nomura e colaboradores (2008) mostraram a capacidade da apigenina em inibir o consumo de glicose em células de adipócitos estimuladas por insulina, através da inibição da fosforilação do receptor de insulina beta, além de inibir a ativação da Akt e suprimir a translocação do transportador de glicose GLUT4 para membrana plasmática, sugerindo a utilização da apigenina em tratamentos contra obesidade e câncer, por agir no suprimento de energia às células tumorais.

Vários estudos sobre o efeito antitumoral da apigenina têm sido realizados em razão da sua capacidade de induzir apoptose em uma grande variedade de células tumorais humana. A estrutura química da apigenina revelou-se essencial para sua atividade antitumoral, fato observado recentemente por pesquisadores americanos, no qual a indução da apoptose era inibida quando se utilizava apigenina metilada nas três posições 4', 5 e 7, onde estão as hidroxilas (Landis-Piowar et al., 2008). A ação antitumoral da apigenina ocorre através da ativação de caspases, inibição de síntese lipídica, topoisomerase e modulação da expressão de Bcl-2 e Bax (Birt et al., 1997; Liang et al., 1999; Wang et al., 1999; Yin, 1999; Caltagirone et al., 2000; Wang et al., 1999; Kim, 2003; Way et al., 2004; Fang et al., 2005; Brusselmans et al., 2005), além de modular negativamente quinases como PI3K, Akt, MAPK ERK1/2, caseína quinase-2 (CK-2) e outras quinases envolvidas no desenvolvimento e progressão do câncer (Way et al., 2004). No entanto, vários relatos na literatura têm demonstrado que o mecanismo de ação da apigenina é dependente do tipo celular. Em células de câncer de mama, a apigenina leva à inibição do ciclo celular na fase G2/M a qual está associada à modulação de p21, cdc2 e ativação da apoptose dependente de p53 (Choi and Kim, 2008). Já em células de câncer de mama resistente ao estrogênio, a apigenina inibe o crescimento celular através da inibição

1. INTRODUÇÃO

de proteínas quinases, incluindo p38, proteína kinase A (PKA) e AKT (Long et al., 2008). Em células de leucemia HL60, a apigenina induz apoptose via ativação de caspases e inibição da atividade proteossômica (Landis-Piwowar et al., 2008).

Fisetina

A fisetina (3,7,3',4'- tetrahidroxiflavona) (Figura 1C) é um flavonóide bioativo comum da dieta, podendo ser encontrado em uma variedade de frutas e vegetais. Seus efeitos cardioprotetores e anticarcinogênicos podem ser atribuídos as suas propriedades antioxidante (Van Acker *et al.*, 2000; Pietta, 2000; Lee *et al.*, 2002), anti-inflamatória, antiproliferativa e antiangiogênica (Fotsis et al., 1997).

A fisetina apresenta ação promissora na prevenção e tratamento de doenças inflamatórias regulando, através de diferentes mecanismos, as vias de sinalização relacionadas à liberação de citocinas pró-inflamatórias em diferentes sistemas celulares. De fato, a fisetina causa inibição da expressão de TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-6 e IL-8 em mastócitos, cujos efeitos estão associados a sua capacidade de inibir enzimas da família das MAPKs e a transcrição de genes mediada por NF κ B (Park et al., 2006). Verificou-se, posteriormente, que a diminuição da produção de citocinas inflamatórias, principalmente IL-8, pela fisetina, em células epiteliais pulmonares, estava relacionada à inibição da enzima nuclear poli ADP-ribose polimerase-1 (PARP1), enzima envolvida na fisiopatologia de doenças inflamatórias (Geraets et al., 2007).

Outro aspecto biológico interessante da fisetina mostrado recentemente é a prevenção da oxidação de LDL e bloqueio da sua fagocitose pelos macrófagos, ações importantes para a prevenção da aterosclerose (Lian et al., 2008).

A fisetina tem mostrado grande eficiência na prevenção contra o câncer. Um dos mecanismos associados a esse efeito é a inibição não competitiva da enzima sulfotransferase 1A1 (ou P-PST), responsável pela carcinogênese induzida por sulfatação de hidrocarbonetos aromáticos e álcoois benzílicos, que podem se ligar covalentemente ao DNA (Moon et al., 2006).

Além dos efeitos citoprotetores já conhecidos, diversos estudos têm mostrado que a fisetina também pode atuar como potente indutor de morte de células tumorais. Em 2007, Chang e colaboradores verificaram que dentre 23 flavonóides avaliados, a fisetina foi o

1. INTRODUÇÃO

oitavo mais potente na indução de morte de células de leucemia HL60. Em células de leucemia mielocítica humana (HL60) ou células de carcinoma hepático (SK-HEP-1), a fisetina levou à ativação de caspase 3, fragmentação do DNA nuclear, formação de corpos apoptóticos e estabelecimento de uma população na fase sub G1 do ciclo celular. É importante citar que a fisetina também promoveu a diminuição dos níveis intracelulares de H₂O₂ nas células HL60, demonstrando uma intrigante correlação entre atividade antioxidante e apoptose induzida por flavonóides (Chen et al., 2002; Lee et al., 2002). Haddad et al. (2006) demonstraram que o tratamento da linhagem humana de câncer prostático (PC3) com fisetina induziu inibição do ciclo celular na fase G2/M. Posteriormente, Khan e colaboradores (2008) observaram que a indução de apoptose e inibição do ciclo celular pela fisetina em células de câncer de próstata LNCap ocorriam em função da diminuição da expressão de ciclinas D1, D2 e E, com conseqüente diminuição da atividade do complexo ciclinas/CDKs, aumento da expressão de p21 e ativação de caspases 3, 8 e 9. Efeito semelhante também foi observado em células de câncer de cólon por Lu e colaboradores (2005). Além disso, a fisetina possui a capacidade de inibir competitivamente a captação de glicose na linhagem tumoral mielóide U937, indicando a potencialidade do uso deste flavonóide como bloqueador da captação de glicose *in vitro* (Park, 1999).

Como consequência das suas propriedades cardioprotetoras e anticarcinogênicas, altas doses de fisetina e outros flavonóides são frequentemente adicionadas a suplementos nutricionais, uma medida que visa a aumentar seus benefícios biológicos. Porém, os efeitos biológicos da ingestão desses compostos em altas concentrações ainda não são conhecidos e evidências indicam que, nessas condições, fisetina e outros flavonóides podem interferir em processos celulares vitais. Estudos sugerem que a fisetina pode ser genotóxica mesmo em concentrações relativamente baixas (Guharay *et al.*, 2001; Sengupta *et al.*, 2005) e que a administração de doses progressivamente maiores tendem a aumentar a geração de radicais livres durante a sua oxidação, podendo causar lesões oxidativas, quebras e mutações nas cadeias de DNA ou inibição da enzima topoisomerase II (Olaharski et al., 2005). Compostos que inibem a DNA topoisomerase II, enzima nuclear essencial para a replicação do DNA, possuem uma clara tendência de induzir a fragmentação do DNA dupla fita podendo, desta forma, ser usados no tratamento de doenças neoplásicas.

1.1.2. Terpenos

Os terpenos, também conhecidos como terpenóides ou isoprenos, têm sido bastante estudados em virtude das suas diversas funções no organismo e vasta aplicação comercial. Os terpenos são encontrados em sementes, flores, folhas, raízes e caules de plantas superiores, assim como em musgos, algas e líquens. A estrutura básica para síntese dos inúmeros terpenos existentes é o isopreno C_5H_8 (Figura 2A); os monoterpenos (Figura 2B) são compostos por dois isoprenos. Os terpenos podem ser cíclicos ou acíclicos, com uma vasta variação de estruturas (Gershenzon and Dudareva, 2007). Os diterpenos (Figura 2C) são a base para compostos biologicamente ativos como retinol, retinal e fitol e muitos são conhecidos por sua ação antimicrobiana e anti-inflamatória (Areche et al., 2007).

Os terpenos se enquadram na principal classe de produtos naturais conhecida, com aproximadamente 25.000 estruturas resolvidas. No entanto, poucos destes compostos têm sido estudados do ponto de vista funcional, em razão de que, por muitos séculos, os terpenos foram considerados produtos de detoxificação ou excreção do metabolismo. Entretanto, a partir da década de 70, um grande número de terpenos mostrou-se como toxinas, repelentes ou atrativos de outros organismos, sugerindo, portanto, um papel ecológico relacionado a interações antagonísticas ou mutualísticas entre organismos. Os terpenos defendem muitas espécies de plantas, animais e microorganismos contra predadores, patógenos e competidores e estão envolvidos na comunicação entre organismos da mesma espécie e organismos mutualistas no que diz respeito à presença de comida, parceiros e inimigos (Gershenzon and Dudareva, 2007). Os terpenos também são precursores de certas vitaminas, como A, K e E e de hormônios esteróides, além de serem componentes da clorofila e dos carotenóides. Muitos terpenos que compõem os óleos essenciais de plantas e flores são largamente utilizados em perfumes, aditivos alimentares e aromaterapia.

1. INTRODUÇÃO

Ferruginol

Ferruginol (Figura 2C) é um diterpeno presente em plantas das famílias *Podocarpaceae* (Cambie et al., 1984), *Cupressaceae* (Sharp et al., 2001), *Lamiaceae* (Ulubelen & Topcu, 1992) e *Verbenaceae* (Ono et al., 1999), entre outras. Recentemente, muitos trabalhos têm mostrado diversos efeitos biológicos do ferruginol, tais como atividades gastroprotetora, antimicrobiana, citotóxica e indutora de apoptose (Rózalski et al., 2006; de Jesus et al., 2008).

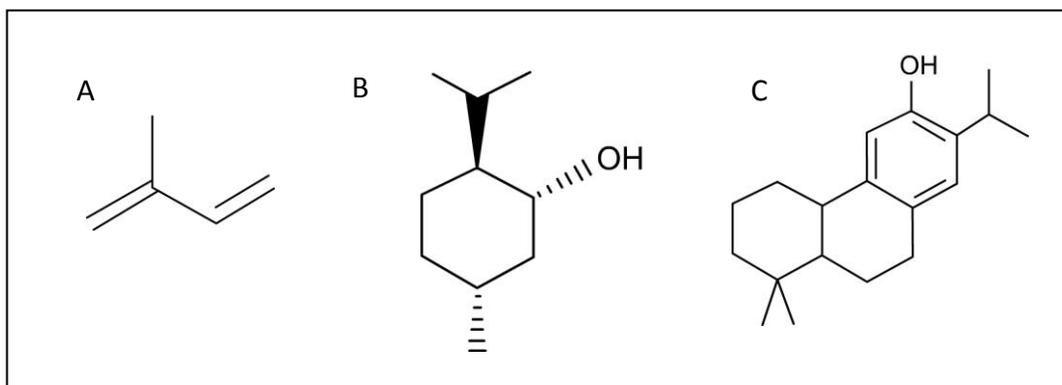


Figura 2. Terpenos. (A) Isopreno, estrutura básica dos terpenos. (B) Monoterpeno, mentol. (C) Diterpeno, ferruginol.

Inúmeras espécies do gênero *Salvia* (*Lamiaceae*), rica fonte de ferruginol, têm sido usadas como medicamento natural para dores de estômago (Areche et al., 2008). Um grupo chileno da Universidade de Talca tem estudado o efeito do ferruginol como agente gastroprotetor contra lesão gástrica induzida por HCl e etanol (Rodríguez et al., 2006, Espinoza et al., 2008). Este grupo verificou que tal efeito se devia à estimulação da síntese de prostaglandinas gástricas (PGE₂), redução da secreção de ácidos gástricos e melhoramento da capacidade antioxidante da mucosa gástrica pela manutenção de níveis de GSH (Areche et al., 2008).

Em relação à atividade antitumoral, o ferruginol inibiu o crescimento de células de câncer de cólon, pulmão e mama (Son et al., 2005). Este composto mostrou-se efetivo na indução de apoptose por ativação de caspase 3 em células leucêmicas (HL60) e também de células leucêmicas com fenótipo de resistência a quimioterápicos. A ação do ferruginol contra células resistentes, que expressam a bomba de efluxo MRP1 (*multidrug resistance-associated protein*), sugere que o mesmo não é substrato da bomba de efluxo (Rózalski et al.,

I. INTRODUÇÃO

2006). Além da ativação de caspase, recentemente foram isolados oito diterpenos da *Cryptomeria japonica* (*Taxodiaceae*), entre eles o ferruginol, os quais inibiram a atividade do receptor de andrógenos em células de câncer de próstata (Tu et al., 2007).

1.2. Câncer

As células somáticas de um organismo estão sob um rígido controle de proliferação e divisão e, raramente, uma célula se divide mais que as outras vizinhas. Entretanto, se a proliferação foge ao rígido controle exercido por mecanismos celulares no sentido de evitar a divisão descontrolada, origina-se o tumor ou neoplasma. Até o momento em que as células permanecem juntas em uma massa única, o tumor é chamado de benigno. Nesta fase a cura, geralmente, pode ser alcançada removendo-se a massa de células cirurgicamente. Um tumor é considerado câncer somente quando for maligno, ou seja, se as células adquirirem capacidade de invadir o tecido circundante. Invasão implica a habilidade de degradar a matriz extracelular, entrar na corrente sanguínea e linfática e formar tumores secundários em outros locais do organismo, processo chamado de metástase (Lowe *et al.*, 2004).

O câncer é classificado de acordo com o tecido e o tipo celular de onde ele se origina. O câncer surgido a partir de células epiteliais é denominado carcinoma e aquele formado a partir de tecido conjuntivo ou células musculares é chamado de sarcoma. O câncer que não se encaixa em nenhuma dessas categorias inclui a leucemia, câncer originado a partir de células hematopoéticas e câncer de células do sistema nervoso central.

A gênese do câncer tem sido exaustivamente estudada e muitos fatores já estão, atualmente, bem definidos como promotores da doença, tais como predisposição genética, estilo de vida e fatores ambientais (exposição à radiação ou carcinógenos).

Apesar dos avanços no desenvolvimento de fármacos no tratamento contra o câncer, a quimioterapia tradicional ainda se mantém como opção preferencial de escolha nos protocolos terapêuticos. Os quimioterápicos, além de não serem, muitas vezes, alvo específicos, possuem uma eficácia abaixo do esperado e causam efeitos colaterais adversos, como náuseas, dores, queda de pêlos, entre outros. Assim, mais do que a definição de

I. INTRODUÇÃO

inibidores para alvos específicos, é preciso levar em consideração que em uma célula tumoral vários mediadores biológicos podem estar alterados. Portanto, a busca por compostos que inibam a progressão do câncer de forma específica e eficaz com baixo ou nenhum efeito colateral é objetivo de muitos centros de pesquisa.

A ação preventiva contra câncer tem sido atribuída a diversos mecanismos, incluindo modulação de atividades como citocromo P450, enzima envolvida detoxicação de carcinógenos (Moon et al., 2006).

1.2.1. Leucemia

Leucemia é o nome geral dado aos diferentes tipos de câncer hematológicos que se caracteriza pela proliferação desordenada de células sanguíneas imaturas na medula óssea e no sangue. Como consequência da baixa capacidade de diferenciação celular, a medula óssea sofre alteração em seu funcionamento o que leva à complicações associadas, tais como, cegueira, anemia e infecções (Alison *et al.*, 2004). A leucemia é denominada mielóide quando há aumento na proliferação dos precursores da linhagem mielóide (eritrócitos, granulócitos e plaquetas). Quando atinge as células da linhagem linfóide (linfócitos B, T, NK), a doença denomina-se leucemia linfóide. Ambas podem ser agudas ou crônicas. Na leucemia aguda, há um aumento de células imaturas, blastos, na corrente sanguínea. Já a leucemia crônica caracteriza-se pelo aumento de células maduras anormais. Portanto, em ambos os casos, as células sanguíneas deixam de exercer suas funções corretamente.

Leucemias agudas representam uma pequena fração (<3%) de todos os cânceres humanos, mas são líderes de mortes relacionadas a câncer em crianças e jovens adultos (Doepfner et al., 2007).

A leucemia mielóide aguda (AML) corresponde a 25% de todas as leucemias em adultos no mundo ocidental e é o segundo tipo mais frequente de leucemia, seguido pela leucemia linfocítica crônica (CLL). A incidência da AML é de 3,8 casos em 100.000, chegando a 17,9 casos em 100.000 adultos com mais de 65 anos (Bloomfield et al., 2008). Atualmente, sabe-se que, mesmo não havendo alterações na sequência de DNA, há alterações na expressão gênica causadas por mecanismos moleculares com *imprinting*, silenciamento gênico, inativação cromossômica que são capazes de levar à AML (Plass et al., 2008). Quarenta por cento dos pacientes com AML possuem anormalidades genéticas

I. INTRODUÇÃO

como inversões e translocações cromossômicas que levam à fusão de genes e síntese de proteínas com funções alteradas, acarretando, assim, a proliferação anormal de células precursoras mielóides, diminuição na taxa de morte apoptótica, interrupção do ciclo celular e processo de diferenciação (Alison *et al.*, 2004; Bernasconi *et al.*, 2004; McKenzie, 2005). O tratamento da AML representa um desafio árduo em razão das complicações associadas ao tratamento. Nos últimos 20 anos as terapias básicas usadas no tratamento da AML mudaram muito pouco. Foram feitos grandes avanços na compreensão da fisiopatologia da doença, no entanto, estamos longe de uma melhora significativa na sobrevivência de adultos e somente um terço destes pacientes acaba conseguindo a cura. A sobrevivência livre da doença é rara e os efeitos adversos do tratamento acabam sendo pouco tolerados por pessoas mais velhas (Stone *et al.*, 2004).

1.2.2. Câncer de próstata

O câncer de próstata é uma das principais causas de doença e morte nos Estados Unidos e Europa Ocidental. O risco de desenvolver a doença é de 1 em cada 6 homens e o risco de óbito por câncer metastático é de 1 para cada 30 homens (Nelson *et al.*, 2003). No Brasil, o câncer de próstata representa, atualmente, a segunda causa de óbitos por câncer em homens, superado apenas pelo câncer de pulmão. Como o câncer de próstata raramente é sintomático, cerca de 38 a 51% dos pacientes apresenta metástase quando diagnosticados (Papatsoris and Papavassilou, 2001). A metástase mais frequente do câncer de próstata é para linfonodos (pélvico e abdominal) e osso (60-70% dos pacientes que sofrem de metástase tem envolvimento do osso). Atualmente, 22% dos novos casos de câncer prostático são detectados em fases avançadas contribuindo para o alto índice de mortalidade em decorrência da doença. Embora novos fármacos mais efetivos e menos tóxicos tenham sido desenvolvidos, tumores prostáticos ainda mostram-se de difícil erradicação, tornando-se, frequentemente, independentes ao androgênio e de difícil tratamento nos casos de recidiva da doença (Navarro *et al.*, 2002; Evans and Moller, 2003; Diaz and Patterson, 2004; Nelson, 2004). Atualmente, muitos estudos têm se voltado para a determinação de novos alvos moleculares e moléculas biossensoras para a detecção precoce, tratamento e prognóstico da doença. Nesse contexto, a linhagem celular PC3 tem sido usada como modelo de câncer prostático hormônio refratário para o estudo *in vitro*

1. INTRODUÇÃO

dos mecanismos moleculares envolvidos no controle da migração celular e apoptose em resposta a potenciais agentes farmacológicos.

Apesar do progresso na área de diagnóstico do câncer de próstata em estágios iniciais, este tipo de câncer continua a ser a principal causa de morte entre os homens. Uma característica importante do câncer de próstata, em termos terapêuticos, é que após o tumor se tornar independente de hormônio a eficiência terapêutica também se torna extremamente baixa. O câncer de próstata pode ser decorrente de mutações e desregulação de vários genes envolvidos no controle de vias de transdução de sinal e do ciclo celular. A Figura 3 resume alguns produtos gênicos que contribuem para a progressão e diminuição da eficiência terapêutica do câncer de próstata (Lee et al., 2008).

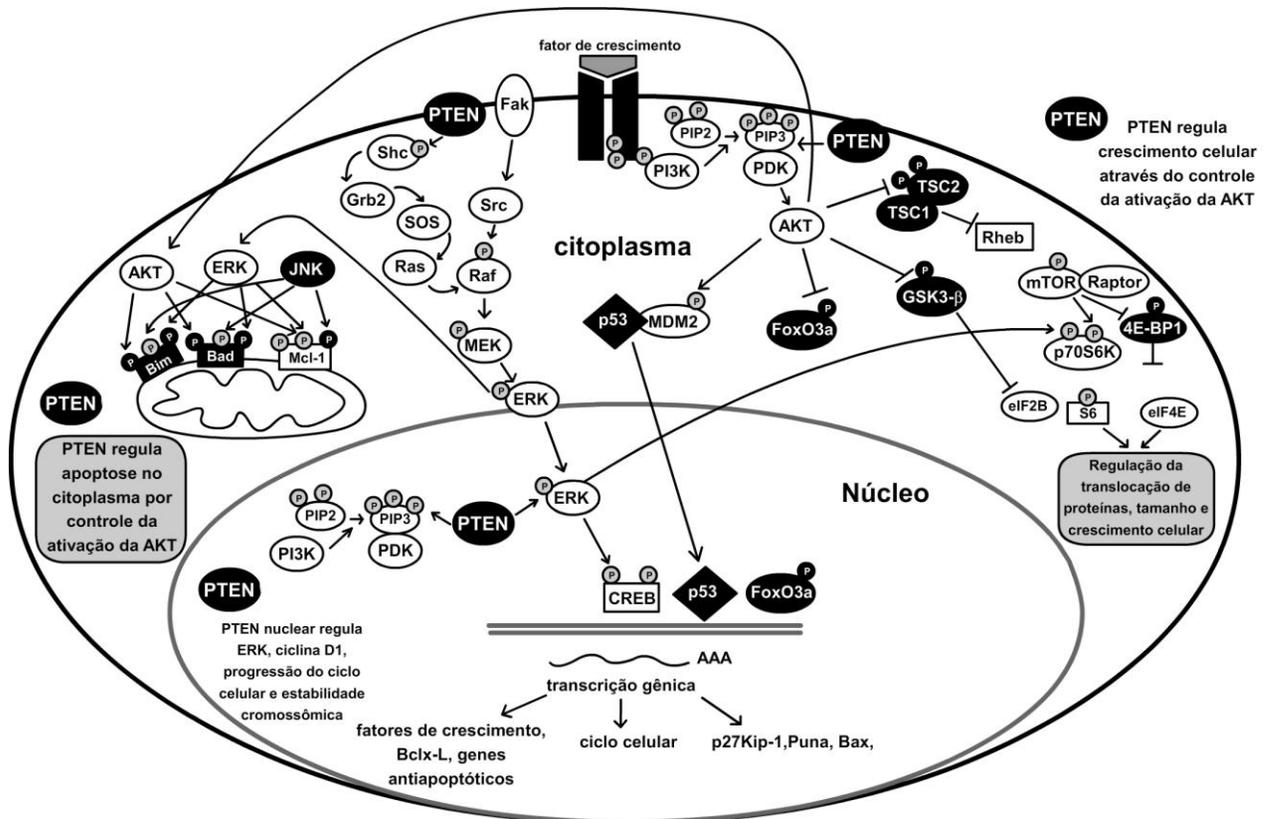


Figura 3. Produtos gênicos que contribuem para a progressão e baixa eficiência terapêutica do câncer de próstata (adaptada de Lee et al., 2008).

1.3 Morte celular

A avaliação da morte celular em diferentes sistemas suporta a hipótese de que a variedade de morte celular programada é disparada em situações distintas. A definição molecular destes eventos e o conhecimento detalhado dos participantes dos mesmos permitem a modulação terapêutica das vias de morte celular em condições patológicas.

Cinco categorias de atividade celular dinâmica que leva à morte celular foram descritas (Ricci and Zong, 2006): apoptose, autofagia, necrose, catástrofe mitótica e senescência (Tabela 1). Estas cinco classificações de morte celular são baseadas nas características bioquímicas e morfológicas distintas presentes nas células em morte. Morte celular programada resulta na desintegração dos componentes celulares e seu englobamento pelas células circundantes (Ricci and Zong, 2006). O remodelamento de tecido durante o desenvolvimento normal de um organismo eucarioto multicelular depende da morte celular programada para ajudar a formar o indivíduo adulto. Também opera nos indivíduos adultos para manter o tecido celular normal. Necrose e catástrofe mitótica são, geralmente, consideradas respostas passivas ao insulto celular. Entretanto, novas descobertas sugerem que essas duas formas de morte podem ser geneticamente controladas (Yuan et al., 2003; Castedo et al., 2004; Zong and Thomson, 2006). Senescência é um processo essencial de envelhecimento e refere-se ao interrompimento do ciclo celular na fase G1, em resposta a estresses que levam as células a transformações malignas (Smogorzewska and de Lange, 2002). Desregulação das vias de sinalização que controlam cada uma dessas mortes tem implicações na tumorigênese.

Neste trabalho será dada ênfase ao tipo de morte apoptótica.

1.2.3. Apoptose

Embora o fenômeno tenha sido descrito há mais de um século, somente em 1972 Kerr e colaboradores denominaram apoptose como morte celular que ocorre durante o desenvolvimento embrionário natural diferente da morte celular por necrose resultante de injúria aguda do tecido. Eles também notaram que a apoptose era responsável pela

1. INTRODUÇÃO

manutenção da homeostase do tecido, mediando o equilíbrio entre proliferação celular e morte (Ricci and Zong, 2006).

Tabela 1. Características gerais dos principais tipos de mortes celulares (Ricci et al., 2006)

Alterações morfológicas	Apoptose	Autofagia	Necrose	Senescência	Catástrofe mitótica
<i>Membrana celular</i>	Integridade da membrana mantida; formação de vesículas (blebbing)	Formação de vesículas (blebbing)	Perda da integridade da membrana	Aumento do volume celular	?
<i>Núcleo</i>	Condensação da cromatina, fragmentação nuclear; DNA <i>laddering</i>	Condensação parcial da cromatina, sem DNA <i>laddering</i>	Degradação randômica do DNA	Acúmulo de heterocromatina-foci	Segregação errada de cromossomo durante citocinese; micronúcleis
<i>Citoplasma</i>	Despolarização do citoesqueleto	Aumento de vesículas autofágicas; degradação do Golgi, polirribossomos e RE	Inchaço das organelas celulares	Granulossidades	?
<i>Métodos de detecção</i>	Coloração para Anexina V; ensaios de fragmentação de DNA e atividade de caspases	Localização da proteína LC3	Permeabilidade inicial a corantes vitais; liberação do conteúdo citoplasmático	Senescência associada à atividade de β -galactosidase	Visualização de células multinucleadas
<i>Resposta imunológica</i>	Supressivo; fagocitose dos corpos apoptóticos pelos macrófagos	?	Estimulatório, iniciação do crescimento celular e reparação do tecido	?	?

Abreviaturas: RE, retículo endoplasmático, LC3, proteína associada ao microtúbulo (*light chain 3*).

I. INTRODUÇÃO

A apoptose envolve a ativação controlada de proteases e hidrolases que, rapidamente, degradam todas as estruturas celulares e, diferentemente da morte celular por necrose, em que a membrana é rompida produzindo resposta inflamatória, a apoptose acontece dentro da membrana plasmática intacta, sem afetar as células vizinhas. As características morfológicas marcantes nas células em apoptose são condensação da cromatina, fragmentação nuclear, encolhimento das células e formação de vesículas com o conteúdo citoplasmático (*blebbing*) (Galluzzi et al., 2007). A apoptose tem sido considerada o principal mecanismo de morte induzida por quimioterapia. Assim, as vias que controlam a apoptose são alvos principais de muitos estudos pré-clínicos para descoberta de novos medicamentos.

Duas vias principais iniciam a apoptose, a via intrínscica (ou via mitocondrial) e a via extrínscica (ou via extracelular) (Figura 4). A via intrínscica é, geralmente, ativada em resposta a diversas condições de estresse intracelular, como danos ao DNA e altos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), assim como infecção viral e ativação de oncogenes. A via extrínscica é iniciada pela interação de ligantes extracelulares a receptores na membrana plasmática. Ambas as vias levam à ativação de enzimas proteolíticas, denominadas caspases que medeiam o rápido desmantelamento das organelas celulares. Caspases são uma família de proteínas que contêm um resíduo de cisteína nucleofílico que participa da clivagem de motivos contendo ácido aspártico (Thornberry and Lazebnik, 1998). São expressas como precursores inativos que se tornam ativos após oligomerização. Há dois grupos de caspases, as iniciadoras (caspases 8, 9 e 10) e as efetoras/executoras (caspases 3, 6 e 7).

A via intrínscica resulta na ativação da cascata de sinalização que conduz à permeabilização da membrana mitocondrial, processo altamente controlado por proteínas da família Bcl-2 que agem regulando o efluxo de proteínas apoptogênicas da mitocôndria. As proteínas Bcl-2 contêm de 1 a 4 domínios homólogos Bcl-2 (domínios BH). Os números de combinações dos domínios BH determinam se a proteína é pró- ou antiapoptótica. As proteínas antiapoptóticas possuem todos os quatros domínios BH e incluem Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1 e Bfl-1/A1. As proteínas pró-apoptóticas não possuem o domínio BH4, e são divididas em 2 grupos, as BH3 e as multidomínios BH1-3 (como Bax e Bak). Bax e Bak, normalmente, estão na forma de monômeros inativos. Bax é encontrado no citosol ou fracamente ligado a membranas intracelulares e Bak está ligado a Mcl-1, Bcl-xL ou a

1. INTRODUÇÃO

proteína VDAC-2 (*voltage-dependent anion channel protein-2*) na membrana mitocondrial externa.

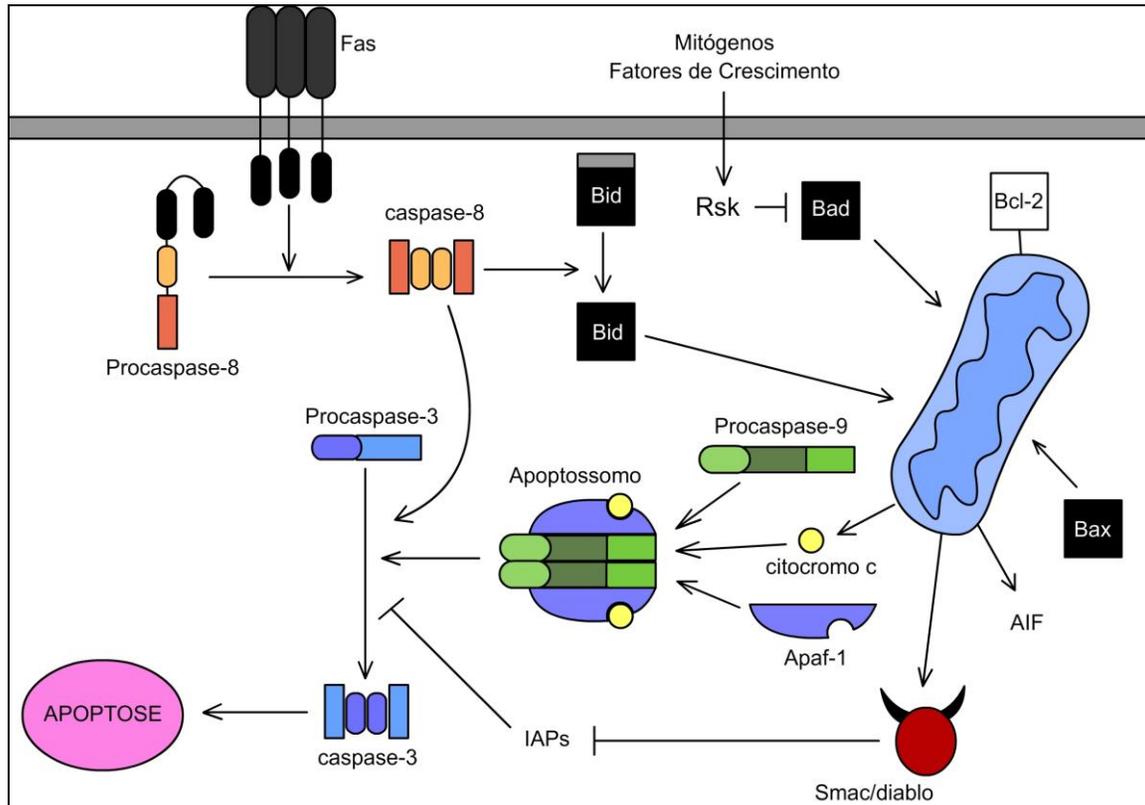


Figura 4. Apoptose induzida pelas vias intrínseca (ou mitocondrial) e extrínseca. A via intrínseca leva à formação do apoptossomo, que consiste de caspase 9, proteína Apaf-1 e citocromo c, que é liberado do espaço entre membranas da mitocôndria. A via extrínseca é ativada por receptores de morte, como o Fas, que leva à ativação da caspase 8. Esta por sua vez, assim como o apoptossomo, leva à ativação da caspase efetora, a caspase 3.

Resumidamente, a via intrínseca leva à oligomerização de Bax e Bak causando a permeabilização da membrana mitocondrial, permitindo assim a saída de fatores apoptogênicos como citocromo c, fator de indução de apoptose (AIF), Omi/HtrA2, Smac/DIABLO e endo G, entre outros (Kaufmann and Hengartner, 2001; Wang and El-Deiry, 2003; Youle and Karbowski, 2005). Uma vez liberado, em presença de dATP, o citocromo c induz a formação dos apoptossomos, que consistem de um heptâmero de moléculas adaptadoras APAF-1, cada uma ligada a um dímero de caspase 9. O dímero de

1. INTRODUÇÃO

caspase 9 é, então, ativado através de mudança conformacional induzida pelo apoptossomo, atuando, sequencialmente, no processamento e ativação das caspases efetoras 3 e 7 e iniciando a execução da apoptose similarmente à caspase 8. O complexo apoptossômico, provavelmente, serve como um regulador alostérico da caspase 9 que, em situações em que não haja estímulo apoptótico, encontra-se livre no citossol na forma de monômeros inativos. A integração da caspase 9 ao apoptossomo induz sua dimerização e ativação, o que faz do apoptossomo uma verdadeira holoenzima na qual a atividade da caspase chega a ser mil vezes maior que a atividade residual do monômero (Degterev *et al.*, 2003). É importante notar que a ativação da caspase 9 é um evento controlado alostericamente, em que a ativação é alcançada por mudança conformacional através de dimerização induzida pelo apoptossomo (Donepudi and Grütter, 2002). Juntamente à ativação de caspases, a liberação do citocromo c causa vagarosa e irreversível perda da função mitocondrial e decréscimo da respiração, levando à morte celular. Portanto, a via apoptótica mitocondrial parece resultar em um evento que compromete irreversivelmente a célula à morte (*point-of-no-return*) levando à rápida ativação de caspases, acompanhada de morte celular lenta, através de disfunção mitocondrial (Liston *et al.*, 2003).

A via extrínica é iniciada na membrana plasmática pela ativação de receptores de morte da família TNF-R (*tumor necrosis factor receptor*) que incluem receptores Fas/CD95 e TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*) (Choi and Benveniste, 2004). Os ligantes que podem induzir apoptose são TNF- α , FasL (também conhecido como CD95L) e TRAIL (também chamado de Apo2L). Após o ligante interagir com a região extracelular do receptor, a porção citoplásmica do TNF-R recruta caspases iniciadoras. TRAIL, assim como FasL, após se ligarem ao seus respectivos receptores, ativam o recrutamento da proteína adaptadora FADD (*Fas associating death domain containing protein*) que, por sua vez, recruta as caspases iniciadoras 8 e 10. Esse conjunto de proteínas, formado por receptor, FADD e caspases, é denominado DISC (*Death-inducing signaling complex*) (Ricci and Zong, 2006). O complexo de sinalização ativado pelos receptores de morte pode se propagar por pelo menos três diferentes caminhos: (1) através da proteólise direta e ativação de caspase efetora, (2) através da proteólise da proteína Bid, clivada pela caspase 8, formando a tBid que transloca para a mitocôndria e, conseqüentemente, leva à permeabilização da membrana mitocondrial e (3) pela ativação de quinases RIP1 (*receptor-*

1. INTRODUÇÃO

interacting protein 1) e JNK (*c-jun N terminal kinase*) que medeia a translocação da tBid para o lisossomo e permeabilização da membrana lisossomal dependente de Bax, resultando na proteólise mediada por catepsina e permeabilização da membrana mitocondrial (Vicencio et al., 2008)

Recentemente, indutores de apoptose têm sido usados em terapias contra câncer. Muitos estudos têm como objetivo induzir apoptose pela ativação de ligantes ao receptor de TNF e outros têm como alvos as caspases e proteínas inibidoras de apoptose. Muitas dessas terapias estão em fase pré-clínica devido à baixa eficácia e susceptibilidade à resistência (Hu and Kavanagh, 2003).

1.4 Proteínas fosfatases

Fosforilação reversível é uma modificação pós-traducional que regula a atividade de muitas proteínas em todas as células eucarióticas em processos normais e patológicos.

As proteínas tirosina fosfatases (PTPs) são uma grande família de enzimas que compreende mais de 100 enzimas responsáveis pela hidrólise do fosfato ligado a resíduos de tirosina em proteínas. São estruturalmente diversas, incluindo a PTP citoplasmática e PTP tipo receptor, com a capacidade de transmitir sinais diretamente às enzimas de membrana e citoplasma, capazes de controlar diversos processos celulares (Zhang, 2002). As PTPs são caracterizadas por aproximadamente 240 aminoácidos e possuem um domínio altamente conservado com uma sequência consenso característica no sítio catalítico desta família ($[I/V]HCXAGXXR[S/T]G$), onde I – isoleucina, V -valina, H - histidina, C - cisteína, A - alanina, G - glicina, R - arginina, S - serina, T - treonina e X - qualquer aminoácido, 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 tirosina fosfatases, que é a de serem inibidas pelo pervanadato, pCMB e outros agentes oxidantes (van Montfort et al., 2003, den Hertog et al., 2005). Estudos bioquímicos e genéticos indicam que as PTPs exercem efeitos positivos e negativos nas vias de sinalizações e participam de papéis fisiológicos cruciais em uma variedade de células e tecidos de mamíferos. Uma única PTP pode regular múltiplas vias de sinalização, ou uma via chave pode ser regulada por

I. INTRODUÇÃO

diversas PTPs (Tonks, 2006, Tabernero et al., 2008). Com base na função, estrutura e sequência, as proteínas tirosina fosfatases podem ser agrupadas em três famílias principais: proteínas tirosina fosfatases específicas; proteínas fosfatases com dupla especificidade e proteínas fosfatases de baixa massa molecular relativa (Raugei et al., 2002). A atividade da PTP é controlada em diferentes níveis, incluindo expressão, “*splicing*” alternativo e proteólise limitada, sub-localização celular, oxidação, fosforilação, dimerização e interação com ligantes (den Hertog et al., 2008).

Em contraste às proteínas tirosina quinases (PTKs) que apresentam potencial em promover o crescimento, as PTPs podem agir como supressoras de tumor e inibir o crescimento celular. PTPs também estão envolvidas na ativação de linfócitos B e T e na sinalização por insulina, o que faz destas enzimas alvos atrativos para o desenvolvimento de fármacos usados numa variedade de doenças como câncer, inflamação, diabetes e obesidade (Pils and Schultz, 2004; Haugh et al., 2004).

1.5 Proteínas quinases

Em eucariotos a atividade de pelo menos 30% das proteínas pode ser regulada por fosforilação, principal mecanismo que regula uma grande variedade de processos celulares como sobrevivência, diferenciação e morte celular (Garcia et al., 2003).

As proteínas quinases, enzimas que catalisam a fosforilação de proteínas, são também classificadas de acordo com o tipo de resíduo que fosforilam. Assim, as proteínas tirosina quinases (PTK) fosforilam resíduos de tirosina, enquanto que as proteínas serina/treonina quinases fosforilam resíduos de serina e treonina de proteínas.

Dentro da grande família de proteínas serina/treonina quinases fazem parte a proteína quinase dependente de AMP cíclico (PKA), proteína quinase B ou Akt (PKB/Akt), proteína quinase C (PKC) e a subfamília MAPK (Cano and Mahadevan, 1995; Cross et al., 2000).

Através de uma via de sinalização constituída por receptores com atividade tirosina quinase intrínseca e receptores acoplados à proteína G, proteínas adaptadoras e fosforilações sequenciais de proteínas quinases, as MAPKs respondem a uma variedade de estímulos ambientais, tais como, fatores de crescimento ou proliferação, citocinas e

I. INTRODUÇÃO

estresse químico ou físico, controlando, portanto, eventos tão distintos quanto sobrevivência, morte, transformação ou adaptações celulares (Haneda et al., 1999; Cross et al., 2000; Nebreda and Porras, 2000; Chang and Karin, 2001; Wada and Penninger, 2004). A ampla variedade de funções desempenhadas pelas MAPKs é mediada através da fosforilação de vários substratos, incluindo, fosfolipases, fatores de transcrição e tradução, moléculas do ciclo celular, proteínas adaptadoras e proteínas do citoesqueleto, entre outras.

Dentro da grande família das MAPKs três grupos foram caracterizados em mamíferos: a família das ERKs (“*extracellular signal-regulated kinases*”), a família das JNKs (“c- Jun NH₂ terminal kinases”) e a família das p38 (Johnson and Lapadat, 2002; Roux and Blenis, 2004; Wada and Penninger, 2004). Cada família de proteínas MAPKs opera através de cascatas de sinalização caracterizadas por alta especificidade e funcionamento paralelo (Schenk and Snaar-Jagalska, 1999). Na ausência de sinais, os constituintes das cascatas de MAPKs retornam ao estado desfosforilado e inativo, sugerindo um papel essencial de proteínas fosfatases na regulação de MAPKs (Haneda *et al.*, 1999; Tamura *et al.*, 2002).

A via das ERKs, geralmente, está relacionada ao crescimento celular, diferenciação e sinais de sobrevivência (Kolch *et al.*, 2005), enquanto as MAPKs das famílias JNK e p38 relacionam-se primariamente com sinais pró-apoptóticos e inibidores do crescimento, participando também de respostas pró-inflamatórias. As diversas funções das MAPKs regulam a trajetória do desenvolvimento celular e, como descrito, podem tanto controlar a sobrevivência, transformação ou morte celular. Quando o delicado balanço entre ciclo celular, proliferação, diferenciação e apoptose é desregulado por fatores ambientais e/ou genéticos, podem ocorrer transformações malignas, gênese de doenças neurodegenerativas e outras condições patológicas nas quais, geralmente, cascatas sinalizadoras de MAPKs encontram-se desreguladas (Johnson and Lapadat, 2002).

Desta maneira, as vias de sinalização de MAPKs são alvos potenciais para o desenvolvimento de novas estratégias de combate ao câncer.

2.

OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi procurar compostos naturais que tivessem êxito em controlar a proliferação e, ao mesmo tempo, em induzir a morte de células tumorais. O primeiro passo foi buscar na literatura aqueles compostos mais promissores. Assim, chegamos aos flavonóides, em especial a fisetina e a apigenina, pois até aquele momento, pouco havia sido descrito sobre suas relações com o câncer. Posteriormente, buscamos compostos novos, extraídos e purificados por grupos de pesquisa, com os quais temos colaboração. Dentre os muitos compostos testados, o ferruginol, extraído e purificado do caule da gimnosperma *Prumnopitys andina* e *Podocarpus nubigena*, ambas nativas do Chile, foi o que apresentou melhor efeito citotóxico.

Portanto, os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Estudar preferencialmente a modulação das vias de sinalização de morte por apoptose induzida pela fisetina e apigenina em células leucêmicas HL60 e pelo ferruginol em células de câncer de próstata;
- Analisar as vias de sobrevivência e proliferação celular de células HL60 e PC3 sob tratamento dos flavonóides (fisetina e apigenina) e ferruginol, respectivamente;
- Verificar o papel das proteínas fosfatases nos processos de indução de morte;
- Estudar o estado redox das células HL60 tratadas com fisetina e células PC3 tratadas com ferruginol.

3.

METODOLOGIA

3.1. Cultura de células

As células HL60, K562 e Lucena-1 foram rotineiramente mantidas em suspensão em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% penicilina-estreptomicina (10.000 U/mL penicilina e 10 mg/mL estreptomicina) e 1% glutamina, crescidas a 37°C, sob atmosfera umidificada, contendo 5% de CO₂. As células TF-1 foram mantidas sob as mesmas condições exceto pela adição de 5 ng/mL GMCSF. Em todos os experimentos, 7 x 10⁵ células HL60/mL, 1 x 10⁵ células K562- Lucena-1/mL e 2 x 10⁵ células TF1/mL foram plaqueadas e tratadas com fisetina ou apigenina por 24 horas. Fisetina e apigenina foram dissolvidos em dimetil sulfóxido (DMSO) e adicionado ao meio de cultura, cuja concentração final de DMSO foi 0,1%.

Os linfócitos humanos foram obtidos de sangue de doadores saudáveis. As células sanguíneas foram separadas por gradiente de densidade usando o reagente Ficoll Paque® (GE Healthcare). Dez mililitros de sangue diluído 1:1 em meio de cultura RPMI 1640 não suplementado foram adicionados vagarosamente a um tubo falcon contendo 3 mL de Ficoll Paque®. Após centrifugação a 1500 rpm em centrífuga de ângulo móvel por 30 min,

3. METODOLOGIA

formou-se um gradiente de células composto pelos eritrócitos na base do tubo, seguido pelo reagente Ficoll Paque, pela camada de células mononucleadas e pelo plasma sanguíneo. As células mononucleadas foram coletadas utilizando-se pipeta Pasteur e cultivadas em meio RPMI 1640, contendo 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina, 10% de soro fetal bovino e concanavalina A, por 48 h, quando o tratamento foi realizado. A concanavalina A é uma lectina de feijão, cuja função é estimular a divisão celular de linfócitos T e não de linfócitos B.

As células PC3 foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% penicilina–estreptomicina (10.000 U/mL penicilina e 10 mg/mL estreptomicina) e 1% glutamina, crescidas à 37°C, sob atmosfera úmida, contendo 5% de CO₂. Em todos os experimentos, as células na semi-confluência foram tratadas com ferruginol, em diferentes concentrações.

3.2. Viabilidade celular

O ensaio de viabilidade celular foi realizado através do método de redução de MTT [*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide*] previamente descrito por Mosmann (1983). O método baseia-se na redução do MTT em um composto azul-púrpura, o formazan, nas células viáveis pelas redutases mitocondriais. Após o tratamento, o meio contendo os compostos (fisetina, apigenina ou ferruginol) foi substituído pela solução de MTT (0,5 mg/mL) em meio RPMI 1649 sem soro. Após 4 h de incubação em condições normais de cultivo, a solução de MTT foi removida e o formazan foi dissolvido em DMSO. A absorbância foi medida a 570 nm.

O efeito dos compostos no crescimento celular foi determinado como porcentagem de inibição do crescimento celular, em que células não tratadas foram consideradas como 100% de viabilidade.

3. METODOLOGIA

3.3. Western Blotting

As células (3×10^7) foram lisadas com 200 μ l de tampão de lise [Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), Tween 20 1%, desoxicolato de sódio 0,25%, NaCl 150 mM, EGTA 1 mM, α -Vanadato 1 mM, NaF 1 mM e inibidores de proteases (aprotinina 1 μ g/mL, leupeptina 10 μ g/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 foi 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 (10 ou 12%, dependendo da proteína de interesse) contendo SDS (SDS-PAGE). Após a corrida, foi realizada a transferência para membranas de PDVF. As membranas foram bloqueadas com leite (1%) ou com BSA (2%) preparado em tampão Tris, contendo tween 20 (0,5%) (TBST) e incubadas, durante a noite, com os anticorpos primários para as MAPKs 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 quimioluminescência (ECL).

3.4. Atividades de Enzimas Antioxidantes

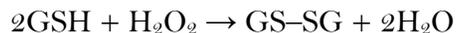
As enzimas superóxido dismutases (SODs) (EC 1.5.1.1) são a primeira linha de defesa contra o ânion superóxido. As SODs são metalo enzimas capazes de catalisar a dismutação do superóxido em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio. São classificadas de acordo com o metal presente no sítio ativo de sua estrutura: cobre e zinco (CuZnSOD), ferro ou manganês (Fe/MnSOD) e níquel (NiSODs). A atividade da superóxido dismutase foi determinada a partir da taxa de inibição da oxidação do ferrocitocromo c, a 550nm, em um meio de reação padrão (McCord and Fridovich, 1969). A atividade de MnSOD foi medida após a inibição da isoenzima Cu/Zn pela adição de 1mM de KCN (Beauchamp and Fridovich, 1973).

A atividade da catalase foi determinada pela medida da diminuição na absorção de H₂O₂, a 240 nm (Nelson and Kiesow, 1972).

3. METODOLOGIA



A enzima glutathione peroxidase (GPX) reduz peróxido de hidrogênio em água e hidroperóxidos, em álcoois estáveis, utilizando a glutathione como agente redutor. A reação catalisada pela glutathione peroxidase é esquematizada, a seguir:



onde GSH é a forma reduzida da glutathione e GS-SG representa a forma oxidada.

A glutathione reductase reduz a glutathione oxidada para completar o ciclo:



A atividade da GPX foi determinada pela medida da taxa de oxidação de NADPH em presença de GSH reductase, através de um sistema de reações acopladas (Lawrence and Burk, 1976).

3.5. Determinação do estresse oxidativo por meio da dosagem da atividade de enzimas marcadoras

As enzimas utilizadas como marcadoras de estresse oxidativo foram enzimas do ciclo de Krebs, aconitase e fumarase. A aconitase, responsável pela conversão do citrato em isocitrato, com formação do cis aconitato, é altamente sensível à oxidação, graças à presença de um *cluster* de ferro e enxofre no sítio ativo que reage diretamente com o substrato.

O lisado celular, em tampão Tris-MnCl₂-citrato (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 0,6 mM MnCl₂ e 5 mM citrato de sódio) foi clarificado por centrifugação (12.000 xg, 1 min). Em uma cubeta de quartzo foram adicionados 970 µL tampão Tris-MnCl₂-citrato, 10 µL de NADP⁺ 200 µM, 3 µL de isocitrato desidrogenase 0,5 U/µl e 20 µL de amostra. Atividade da aconitase foi medida a 25 °C, por 60 min, seguindo as mudanças na absorção a 340 nm em virtude da redução de NADP⁺ (Morton, 1998). O ensaio seguiu a redução do

3. METODOLOGIA

NADP⁺ em NADPH, que está ligado à conversão do citrato a isocitrato e de isocitrato a α -cetoglutarato. A atividade da aconitase foi calculada da seguinte forma:

Atividade da aconitase (mU) = absorvância ÷ coeficiente de extinção molar (0,0062) ÷ volume da amostra (0,02 ml).

Atividade de fumarase foi medida à 25 °C seguindo as mudanças no aumento da absorvância, a 240 nm, em um meio de reação padrão (Racker, 1950), que depende da formação ou desaparecimento da dupla ligação do ácido fumárico. Todas as medidas foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis (Hitachi, model U-2001).

3.6. Determinação da concentração de proteína

A concentração de proteína dos extratos celulares foi determinada pelo método de Lowry, modificado por Hartree (1972), usando albumina sérica bovina com o padrão. O princípio do método baseia-se na soma de duas reações: reação de complexação de Cu²⁺ com ligações peptídicas (método de biureto), acrescida da redução da mistura de fosfomolibdato e fosfotungstato (reagente Folin-Ciocalteu) em presença de aminoácidos redutores das proteínas. A coloração azul resultante das duas reações é medida em 750 nm.

3.7. Arranjo Quinômico (Pepchip)

A metodologia para o arranjo quinômico foi previamente descrita em detalhes por diversos autores (Diks and Peppelenbosch, 2004; Diks et al., 2004; Lowenberg et al., 2005, 2006; van Baal et al., 2006; de Borst et al., 2007). Os arranjos de peptídeos foram obtidos pela Pepscan, Lelystad, Holanda, os quais contem 1024 substratos para quinases.

O chip é composto por um arranjo de 1024 spots cada um contendo peptídeos com sequência consenso de 11 aminoácidos relativos aos substratos das proteínas quinases. Cada chip contém triplicata dos 1024 spots. As células foram tratadas, por 24 h, com apigenina na concentração de IC₅₀, coletadas, lavadas com PBS (*Phosphate Buffer Saline* 20 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl) e lisadas com 200 μ L de tampão de lise não desnaturante, para 10⁷ células. O tampão de lise é composto por 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 2,5 mM fosfato de sódio, 1 mM

3. METODOLOGIA

MgCl₂, 1 mM β-glicerofosfato, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF, 1 μg/mL leupeptina, 1 μg/mL aprotinina, 1 mM PMSF. O lisado de células foi subsequentemente clarificado usando filtro de 0.22 μm. A mistura de incubação para o arranjo de peptídeos foi preparada com 10 mL da mistura ativada e clarificada pela filtragem [50% glicerol, 50 μM ATP, 0,05% (vol/vol) Brij-35, 0,25 mg/mL albumina de soro bovino, e [γ-³³P]ATP (1 kBq)]. Em seguida, a solução de arranjo de peptídeos foi adicionada ao chip e mantido a 37°C em estufa, por 90 min. Após a incubação, a mistura foi lavada duas vezes com tampão PBS com 1% de Tween-20, duas vezes com 2 M de NaCl e duas vezes com água deionizada e depois seca. Os experimentos foram realizados três vezes em duplicata. Os chips foram expostos ao *phosphoimaging screen* por 72 h e escaneados no *phospho-imager* (Fuji, Stanford, USA). A intensidade dos spots foi analisada no software Scanlyse. A intensidade de radiação de cada spot foi quantificada sendo que, quanto maior a intensidade de radiação, maior a atividade da quinase. É importante salientar que no chip há vários substratos diferentes para a mesma quinase.

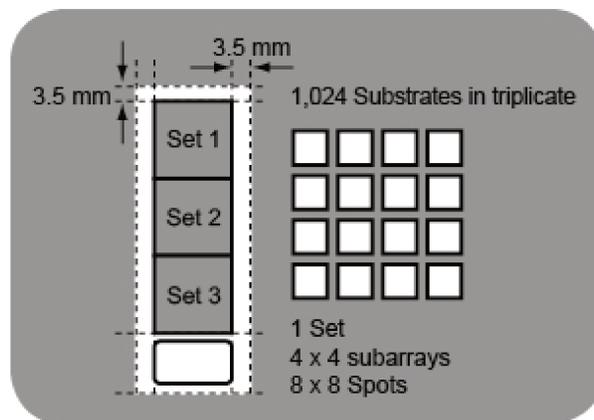


Figura 5. Esquema sobre a organização do chip.

3.8. Imunoprecipitação e atividade da LMWPTP

Após o tratamento das células PC3 com ferrugino, l por 24 h, o lisado celular foi preparado com tampão de lise (20 mM HEPES pH 7,7, 2,5 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 1% Nonidet-P40 (NP40), 1 mM cloridato de 4-(2-amino-etil)- benzenesulfonilfluoreto), 1 mM DTT, 10 mg/mL aprotinina, e 10 mg/mL leupeptina) e mantido no gelo por 2 h. Após centrifugação, foram adicionados ao lisado anticorpo anti-LMWPTP e Proteína A e

3. METODOLOGIA

Sepharose, mantidos sob rotação, a 4°C, por 2 h. As *beads* foram lavadas três vezes com tampão de lise e duas vezes com 0,5 M MES (pH 6,0). Em seguida, a atividade enzimática foi determinada através da formação do *p*-nitrofenol, utilizando-se *p*-nitrofenil fosfato (*p*-NPP) como substrato. Para um volume final de 1,0 mL, a mistura de incubação continha 5,0 mM de *p*-NPP, 100 mM de tampão acetato de sódio (pH 5,0) (para as fosfatases ácidas). Após adição da enzima, incubou-se por 40 min, a 37°C, e a reação foi paralisada pela adição de 1,0 mL de NaOH 1,0 M. A formação do *p*-nitrofenol foi determinada espectrofotometricamente pela leitura da absorbância em 405 nm, tomando-se o valor de 18.400 M⁻¹ cm⁻¹ como coeficiente de extinção molar do *p*-nitrofenóxido (Chaimovich and Nome, 1970). Uma unidade enzimática (UE) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 nmol de *p*-nitrofenol por minuto. A atividade específica (AE) é dada pela relação UE/mg de proteína

3.9. Atividade de Caspases 3, 8 e 9

A atividade de caspase foi determinada pela medida a 405 nm do *p*-nitroanilina (*p*NA) (coeficiente de extinção molar do *p*NA é de 10.000 M⁻¹.cm⁻¹) liberado da clivagem do Ac-DEVD-*p*NA, IETD-*p*NA e LEHD-*p*NA, os substratos das caspases 3, 8 e 9 respectivamente, utilizando-se o kit da R&D Systems (cat. # BF4100, BF10100, BF3100). A atividade enzimática foi expressa em pmol/min.

3.10. Translocação nuclear de NFκB p65 e AIF

Resumidamente, 2 x 10⁷ células foram coletadas e lavadas duas vezes em tampão fosfato gelado (PBS) e ressuspensas em 0,2 mL de tampão de extração gelado (10 mM de tampão HEPES (pH 7,9), contendo 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0,5 mM DTT, e 0,2 mM PMSF). As células foram mantidas em gelo, por 10 min, para permitir o inchaço e, em seguida, submetidas à agitação no vortex por 10 s e centrifugadas, à 4°C, a 14.000 xg, por 30 s. O sobrenadante foi descartado e o *pellet*, ressuspensado em 30 μL de tampão de extração nuclear (20 mM HEPES (pH 7,9), contendo 25% glicerol, 420 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM DTT e 0,2 mM PMSF), colocado em gelo, por 20 min, e

3. METODOLOGIA

centrifugado, à 4°C, a 14.000 xg, por 2 min. O sobrenadante foi armazenado como extrato nuclear e utilizado nos ensaios de western blotting.

3.11. Quantificação de glutathiona reduzida e oxidada

Células PC3, ainda nas placas de cultura, foram lavadas, duas vezes, com PBS gelado e removidas com 5 mM EDTA em PBS e lavadas, duas vezes, novamente com PBS gelado. O número de células foi determinado usando hemocitômetro e, em seguida, as células foram centrifugadas e volumes equivalentes de PBS gelado e 6% de ácido 5-sulfoscílico (SSA) foram adicionados ao *pellet* de células. As amostras foram sonicadas para permitir o rompimento da membrana celular e centrifugadas, a 10,000 rpm, por 5 min. O sobrenadante foi utilizado para os ensaios subsequentes. As quantidades totais de glutathiona (GSH + GSSG) e glutathiona dissulfeto (GSSG) foram determinadas usando ensaio de reciclagem envolvendo a reação de ácido 5,5'-ditio-bis 2-nitrobenzóico e glutathiona redutase. A quantidade total de glutathiona foi calculada da curva padrão de glutathiona reduzida em SSA. Para o ensaio de GSSG, 100 µL de sobrenadante foram incubados com 2µL de 2-vinilpiridina, por 60 min, em banho de gelo. A quantidade de GSSG foi calculada da curva padrão GSSG. A quantidade de GSH reduzido por célula foi calculada pela subtração da quantidade de GSSG da quantidade de glutathiona total por célula (Li and Oberley, 1998).

3.12. Avaliação de apoptose por citometria de fluxo

Dentre as características da apoptose abordadas na Introdução, uma das principais é a assimetria da membrana plasmática. Nos estágios iniciais da apoptose, o fosfolípido fosfatidilserina (PS) é translocado da camada interna para a externa da membrana plasmática, expondo-se para o meio extracelular. Anexina V é uma proteína de 25-36 kDa que se liga ao fosfolípido, dependentemente de Ca²⁺ e apresenta alta afinidade por PS, ligando-se ao PS exposto (Figura 5). Para ser detectada por citometria de fluxo, a anexina pode ser conjugada com compostos fluorescentes, como APC (aloficocianina) e FITC (isocianato de fluoresceína). Uma vez que a exposição de PS ocorre nos estágios iniciais da apoptose, a marcação de anexina pode identificar apoptose em estágios iniciais. Portanto,

3. METODOLOGIA

ela é tipicamente usada em conjunto com corante, como iodeto de propídio (PI) que permite a investigação de estágios mais avançados de morte celular. O iodeto de propídio é um agente intercalante do DNA e é uma molécula fluorescente com massa molecular de 0,67 kDa.

Células em estágio avançado de apoptose, ou mortas, são positivas tanto para Anexina V quanto para PI; células viáveis são negativas para ambos (Figura 5).

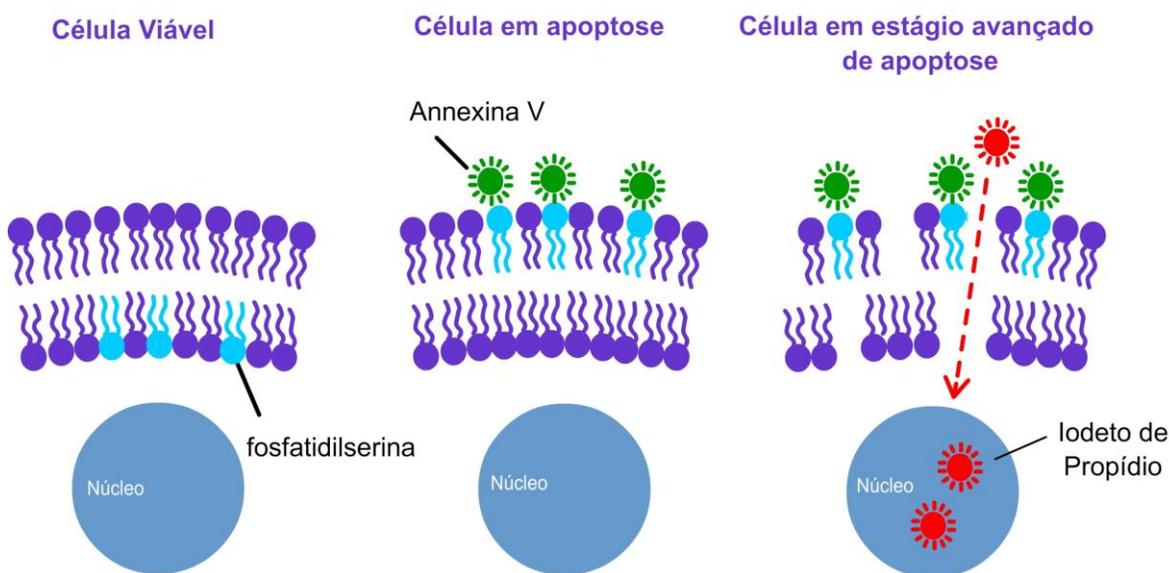


Figura 5. Esquema sobre a análise da apoptose por citometria de fluxo. Interação da anexina V conjugada com FITC à fosfatidil serina translocada da camada externa da membrana plasmática durante o processo de apoptose e ligação do iodeto de propídio ao DNA, na fase tardia da apoptose e necrose.

Para as células HL60, a determinação da quantidade de células apoptóticas foi realizada utilizando-se o kit de detecção de apoptose da BD Pharmingen™ (cat.# 556570), que utiliza anexina V conjugada com o FITC. Após o tratamento com apigenina, as células

3. METODOLOGIA

HL60 foram coletadas e lavadas duas vezes com PBS gelado e ressuspensas em tampão de ligação 0,01 M HEPES (pH 7,4), contendo 0,14 mM NaCl and 2,5 mM CaCl₂, provido pelo kit na concentração 1×10⁶ células/mL. Em seguida, 100 µL de suspensão de células foram transferidos para um tubo de citometria e 5 µl de Anexina V conjugada com FITC e 5 µl PI foram adicionados. As células foram incubadas à temperatura ambiente, por 15 min, e 400 µL de tampão foram adicionados para, em seguida, ser feita a análise no citômetro de fluxo FACS LSR-II (BD Pharmagen).

As células de câncer de próstata PC3 foram ressuspensas em tampão de ligação na concentração de 2 x 10⁷ células/mL. Em seguida, 100 µL da suspensão foram transferidos para um tubo de citometria e adicionados 5µL anexina conjugada com APC e 5µL de 7-ADD (7-amino-actinomicina D). O APC é um pigmento fotossintetizante de cianobactérias que fluoresce em azul, enquanto o 7-ADD é um agente fluorescente intercalante de DNA.

Após incubação de 15 min, à temperatura ambiente, 400 µL de tampão de ligação foram adicionados e a apoptose, detectada no citômetro FACSCalibur (Becton Dickinson FACSCalibur, Rockville, MD). Os dados obtidos foram analisados no Cell Quest Pro BD Biosciences.

3.13. Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo

A avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo é realizada através da quantificação do conteúdo de DNA celular que interage diretamente com corantes fluorescentes, como iodeto de propídio ou Brdu, com o DNA celular de forma estequiométrica. Quatro diferentes fases são encontradas em uma população de células em proliferação: a fase G1, a fase S (fase de síntese de DNA), fase G2 e fase M (mitose). Por possuírem a mesma quantidade de DNA, as fases G2 e M não podem ser distinguidas uma da outra através da análise do conteúdo de DNA (Figura 6).

3. METODOLOGIA

Após o tratamento com ferruginol, por 24 h, as células PC3 foram coletadas pela adição de 5 mM de EDTA e, cuidadosamente, retiradas da placa. O *pellet* de células obtido após a centrifugação com meio de cultura foi fixado com 70% de etanol, por 30 min, em gelo e depois lavados três vezes com 1mL de 0,1% glicose em PBS e ressuspensão em solução de iodeto de propídio (10 mL de 10 mg/mL RNase A, 5 mL de 10 mg/mL PI por 1 mL de PBS com 0,1% glicose). Após 30 min, as células foram analisadas por citometria de fluxo.

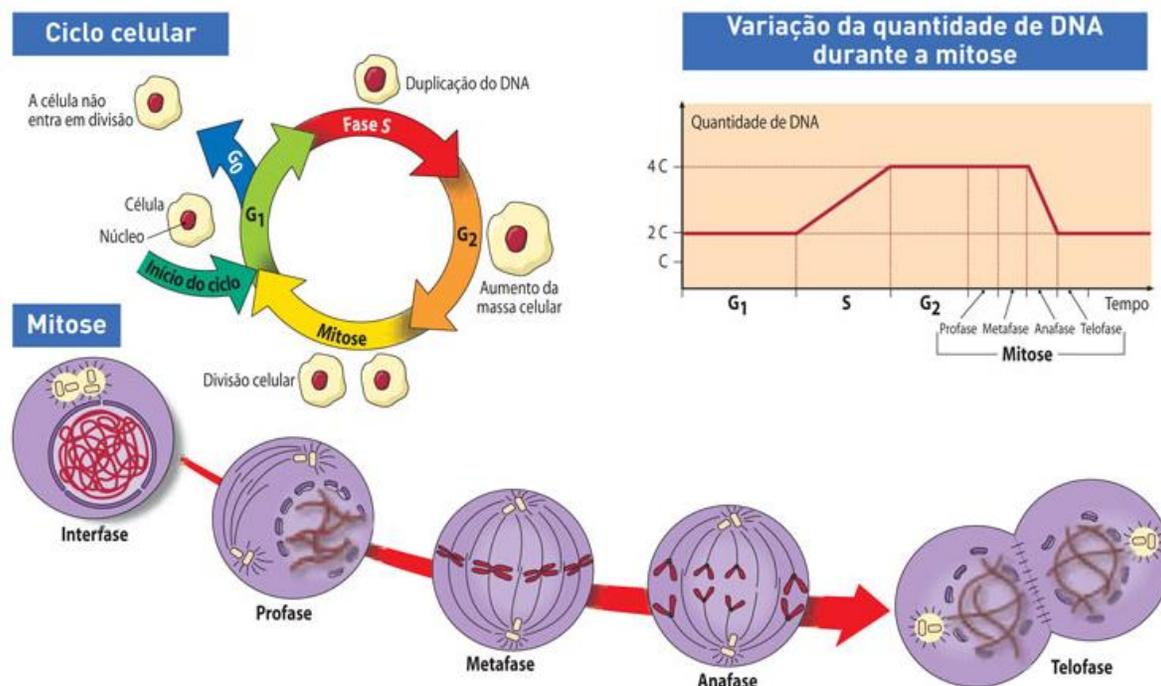


Figura 6. Esquema sobre a análise do ciclo celular por citometria de fluxo. O corante fluorescente se liga de forma estequiométrica ao DNA celular e, assim, o conteúdo de DNA celular é quantificado. Durante a fase S, o DNA é sintetizado, e finalmente na fase G₂ (tetraplóide, 4n) há duas vezes mais DNA que na fase G₁ (diploide, 2n).

4.

RESULTADOS

Os resultados estão dispostos na forma de trabalhos publicados/submetidos:

O artigo 1 contém um trabalho publicado no periódico *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* sobre efeitos causados pela fisetina nos níveis de fosfoproteína, atividade de MAPK e expressão de NFκB.

O artigo 2 contém um trabalho a ser submetido ao periódico *International Journal of Cancer* sobre efeitos da apigenina na fosforilação e desfosforilação de proteínas importantes para a progressão e desenvolvimento do câncer.

O artigo 3 contém um trabalho publicado no periódico *Biochimie* sobre a supressão das vias de sinalização em células de câncer de próstata pelo ferruginol.

Phosphoprotein levels, MAPK activities and NFκB expression are affected by fisetin

ROBERTA R. RUELA DE SOUSA¹, KARLA CRISTIANA SOUZA QUEIROZ¹, ANA CAROLINA SANTOS SOUZA¹, SONIA A. GURGUEIRA², AMANDA CAVALLARI AUGUSTO², MARCIO ANDRÉ MIRANDA¹, MAIKEL P. PEPPELENBOSCH³, CARMEN VERÍSSIMA FERREIRA¹, & HIROSHI AOYAMA¹

¹Department of Biochemistry, State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil, ²Universidade São Francisco, Bragança Paulista, SP, Brazil, and ³Department of Cell Biology, University Medical Center Groningen A. Deusinglaan 1, NL-9713 AV Groningen, The Netherlands

(Received 5 September 2006; in final form 10 November 2006)

Abstract

Flavonoids, polyphenolic phytochemicals, are ubiquitous in plants and are commonly present in the human diet. They may exert diverse beneficial effects, including antioxidant and anticarcinogenic activities. The present study was designed to evaluate three biomolecules that play important roles in the apoptotic process: mitogen-activated protein kinases, protein phosphatases and NFκB, using HL60 cells treated with fisetin as an experimental model. Our results demonstrated that cells treated with fisetin presented high expression of NFκB, activation of MAPK p38 and an increase of phosphoprotein levels; inhibition of enzymes involved in redox status maintenance were also observed. Our findings reinforce the hypothesis that fisetin is likely to exert beneficial and/or toxic actions on cells not through its potential as antioxidant but rather through its modulation of protein kinase and phosphatase signaling cascades. Additionally, our results also indicate that the cellular effects of fisetin will ultimately depend on the cell type and on the extent to which they associate with the cells, either by interactions at the membrane or by uptake into the cytosol.

Keywords: *Fisetin, flavonoids, HL60, NFκB, MAPK, phosphatases*

Introduction

Flavonoids are polyphenolic compounds widely found in plants [1]. Components of fruits, vegetables and beverages, such as wine and tea, many flavonoids are present in a regular diet [2]. Flavonoids exhibit a variety of effects such as inhibition of malignant cell growth [1], regulation of lymphocyte activation, cell proliferation and differentiation [2–4]. These biological effects of flavonoids on cells can be due to the inhibition of different key enzymes. For these reasons, the flavonoids can be considered potential compounds in the selective blocking of signal transduction pathways and in the design of more potent analogues for use in proliferative disease therapies.

Several studies have demonstrated that, depending on their structures, flavonoids can be potent inhibitors of several kinases involved in signal transduction, mainly protein kinase C (PKC) [5] and tyrosine kinases [6]. On the other hand, some flavonoids can activate cell differentiation through activation of the Ras-ERK cascade [7].

Fisetin is a common dietary component found in several fruits and vegetables [8]. Some authors have demonstrated different biological activities for this flavonoid: inhibition of topoisomerase II, an essential nuclear enzyme for DNA replication [9,10], neuroprotective, cardioprotective and anti-carcinogenic activities, which have been attributed to its antioxidant properties [7,11–13], inhibition of cellular proliferation

Correspondence: H. Aoyama, Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, UNICAMP, CEP 13083-970 Campinas, SP, Brazil. Tel: 55 19 3521 6141. Fax: 55 19 3521 6129. E-mail: aoyama@unicamp.br

4. RESULTADOS

440 R. R. Ruela de Sousa et al.

and *in vitro* angiogenesis [14], induction of apoptosis in leukemic cells [13]. Recently, Haddad et al. [15] have demonstrated that fisetin caused cell cycle arrest (G2/M) in a prostate cancer human cell line (PC3). In addition, fisetin inhibited glucose uptake in a competitive manner in a myeloid cell (U937), which indicated that this flavonoid could be used as an alternative blocker of glucose uptake *in vitro* [16].

The present study was designed to evaluate three biomolecules that play important roles in the apoptotic process: mitogen-activated protein kinases (MAPKs), protein phosphatases and NF κ B, using HL60 cells treated with fisetin as an experimental model. Our results demonstrated that cells treated with fisetin presented high expression of NF κ B, activation of MAPK p38 and an increase of phosphoprotein levels; inhibition of enzymes involved in redox status maintenance was also observed.

Materials and methods

Materials

HL60 cells was from ATCC (Rockville, MD) and fisetin (Figure 1) was from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO). The polyclonal antibodies against antiphospho-p38 mitogen-activated protein kinase (p38), antiphospho-p42/44 (ERK 1/2), antiphospho-c-jun NH₂-terminal protein kinase (JNK), antiphospho-MAPK/ERK kinase 1 (MEK1), antirabbit and antimouse peroxidase conjugated antibodies were obtained from Cell Signaling Technology (Beverly, MA).

Cell culture

HL60 cells were routinely grown in suspension in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% penicillin-streptomycin (10,000 U/mL penicillin and 10 mg/mL streptomycin) and 1% glutamine, grown at 37°C under a humidified 5% CO₂ atmosphere. In all experiments 3 × 10⁵ cells/mL were seeded, and after 72 h the cells were treated with fisetin for 24 h. Fisetin dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) was added to the culture medium and adjusted to a final DMSO concentration of 0.1%.

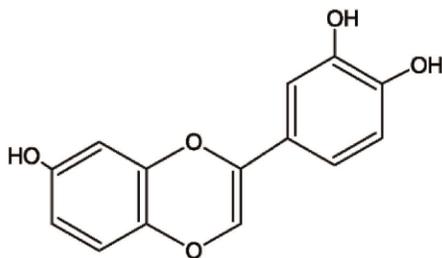


Figure 1. Molecular structure of fisetin.

Cell viability

Cell viability was assessed by the trypan blue dye exclusion and the MTT reduction assays as previously described [17].

Western blotting

Cells (3 × 10⁷) were lysed in 200 μ L cell lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1% Tween 20, 0.25% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM *o*-vanadate, 1 mM sodium fluoride, and protease inhibitors (1 μ g/mL aprotinin, 10 μ g/mL leupeptin, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)) for 2 h on ice. Protein extracts were cleared by centrifugation, and the protein concentration was determined using the Lowry method [18]. Twice the volume of sodium dodecyl sulfate (SDS) gel loading buffer (100 mM Tris-HCl, pH 6.8, 200 mM dithiothreitol, 4% SDS, 0.1% bromophenol blue, and 20% glycerol) was added to the samples and the mixture boiled for 10 min. Cell extracts, corresponding to 3 × 10⁵ cells, were resolved by SDS-polyacrylamide gel (12%) electrophoresis (PAGE) and transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes. Membranes were blocked for 1 h in 1% fat-free dried milk or bovine serum albumin (2%) in Tris-buffered saline (TBS) - Tween 20 (0.05%) and incubated overnight at 4°C with appropriate primary antibody at 1:1000 dilution. After washing in TBS-Tween 20 (0.05%), membranes were incubated with antirabbit or antimouse horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies, at 1:2000 dilutions (in all Western blotting assays), in blocking buffer for 1 h. Detection was performed by using enhanced chemiluminescence (ECL).

Antioxidant enzyme activities

Total superoxide dismutase (SOD) activity was determined from the rate of inhibition of ferrocytochrome c oxidation, at 550 nm, in a standard reaction medium [19]. The manganese superoxide dismutase (MnSOD) activity was measured after inhibition of the Cu/Zn isoenzyme by addition of 1 mM KCN [20]. Catalase activity was determined by measuring the decrease in absorption of H₂O₂ at 240 nm [21]. Glutathione peroxidase (GPX) activity was determined by measuring the NADPH oxidation rate in the presence of GSH and GSH reductase [22].

Marker enzyme activities for oxidative stress

Aconitase activity was measured at 25°C by following the change in the absorption at 340 nm, due to NADP⁺ reduction [23]. Fumarase activity was measured at 25°C by following the increase in absorbance at 240 nm at 25°C in a standard reaction mixture [24]. All the measurements were carried out in a UV-VIS spectrophotometer (Hitachi, model U-2001).

4. RESULTADOS

Statistical evaluation

The Western blots represent three independent experiments. Cell viability was expressed as the mean \pm standard error of three independent experiments run in triplicate. Data for each assay were statistically evaluated by analysis of variance (ANOVA).

Results and discussion

Differential effect of fisetin on HL60 cells and normal human lymphocyte viabilities

We have previously described cytotoxic effects and mechanism of action of different compounds on cancer cells [25–27]. Other natural products have also been reported as important sources of potential chemotherapeutic agents [28–30]. Flavonoids, widely distributed in vegetables, fruits, and wine, have been shown to exert anticarcinogenic effects [10,13,15,31]. However, the molecular mechanisms by which flavonoids can act against cancer cells need to be elucidated. To establish the specificity of fisetin action on HL60 cells we checked, in parallel, the effect of this compound on normal human lymphocytes viability using the MTT assay. It was observed that after 24 hours of fisetin-treated HL60 cells, the mitochondrial activity was decreased, displaying an IC_{50} value around $30 \mu M$ (Figure 2). In agreement with other authors [13], it was also observed that fisetin induced HL60 cells death by apoptosis. Interestingly, human lymphocyte viability remained unchanged, even in the presence of fisetin at concentrations up to $200 \mu M$. These results suggest that fisetin can be an interesting

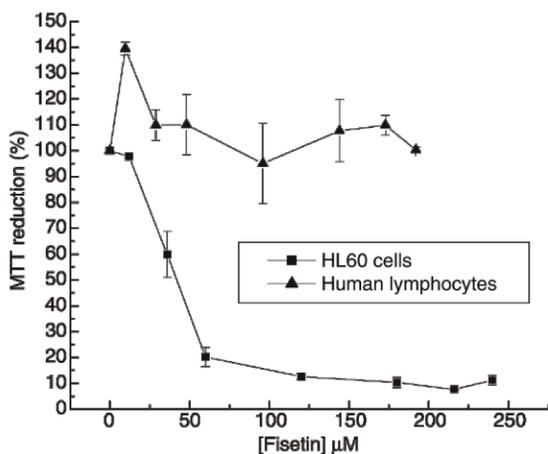


Figure 2. Cytotoxicity of fisetin in leukemic cells and normal human lymphocytes. HL60 cells (■) and normal human lymphocytes (▲) were treated with different concentrations of fisetin for 24 h. In the absence of fisetin, the MTT reduction was considered as 100%. The experiment was performed in a 24-well plate. Results represent the means \pm standard error of three experiments run in triplicate ($P < 0.05$).

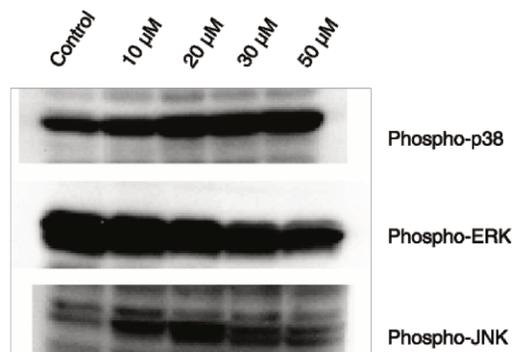


Figure 3. Effect of fisetin on MAPKs phosphorylation in HL60 cells. Cells were treated with different concentrations of fisetin (10, 20, 30 and $50 \mu M$). Soluble lysates were matched for protein content and analyzed by Western blot. One representative immunoblot of three independent experiments is presented.

candidate for cancer treatment with a cellular-specific mechanism of action.

Effect of fisetin on MAPKs phosphorylation and NF κ B expression in HL60 cells

To obtain more insight into the molecular mechanisms mediated by fisetin on HL60 cells, we examined the phosphorylation state of total proteins and MAPKs, in response to fisetin at concentrations up to $50 \mu M$. Fisetin caused activation of p38 and JNK MAPKs, while ERK was inhibited (Figure 3). Williams et al. [32] have demonstrated that flavonoids and their metabolites differentially acted on PI3-kinase, Akt/protein kinase B (Akt/PKB), tyrosine kinases, PKC, and MAPK signaling cascades. Inhibitory or stimulatory actions at these pathways are likely to profoundly affect cellular function by altering the phosphorylation state of target molecules and/or by modulating gene expression.

In addition, we also observed that cells treated with fisetin presented high expression of NF κ B (Figure 4). Decrease in MAPKs phosphorylation (Figure 3) and in the expression of NF κ B p65 (Figure 4) in HL60 cells at fisetin concentrations higher than $20 \mu M$ could be ascribed to different steps of apoptosis. Our results indicate that depending on the fisetin concentration two steps of apoptosis can be reached: early and late apoptosis. Apparently, fisetin concentrations

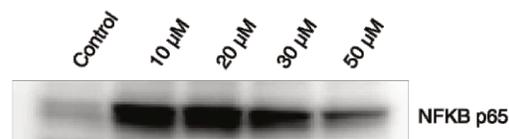


Figure 4. Fisetin changes the expression of NF κ B p65. After treatment of HL60 cells with different concentrations of fisetin for 24 h, equal amounts of protein ($50 \mu g$) of total lysates were subjected to immunoblot analysis with NF κ B (p65) antibodies.

4. RESULTADOS

442 R. R. Ruela de Sousa et al.

up to 20 μM caused early apoptosis, that was reinforced by the overexpression of NF κ B. Recently, Kanno et al. [33] demonstrated that the overexpression of NF κ B is a pivotal event for apoptosis in HL60 cells induced by the flavonoid naringenin. It has been shown that the transcription factor NF κ B participated in cell growth, differentiation, inflammatory responses induced by different signals related to the regulation of apoptosis and neoplastic transformation [34,35]. The pro- and antiapoptotic regulatory functions of NF κ B have been shown to depend on the cell type, the differentiation state of the cell, and the nature of the apoptotic stimulus [35]. Our data provided evidence that the overexpression of the subunit NF κ B p65 in cell death was associated with ROS generation. Some authors observed that ROS *per se* were potent inducers of apoptosis [36] and that the hydrogen peroxide-induced apoptosis required the release of mitochondria-derived ROS and the activation of NF κ B [37]. Our results demonstrating the ability of NF κ B p65 overexpression to induce apoptosis, are in agreement with published data implicating NF κ B to the induction of cell death in certain cells such as neurons, Schwann cells, prostate carcinoma, and embryonic kidney cells [38–42].

Effects of fisetin on protein phosphorylation in HL60 cells

In order to analyze the phosphorylation state in HL60 cells treated with fisetin, we examined the tyrosine and threonine phosphorylation on the cellular proteins. Phosphorylation of both residues increased in the cells treated with fisetin, except for a decrease in tyrosine phosphorylation at 50 μM fisetin (Figure 5). Our results indicated that the fisetin action in HL60 cells was accompanied by an increase in tyrosine and

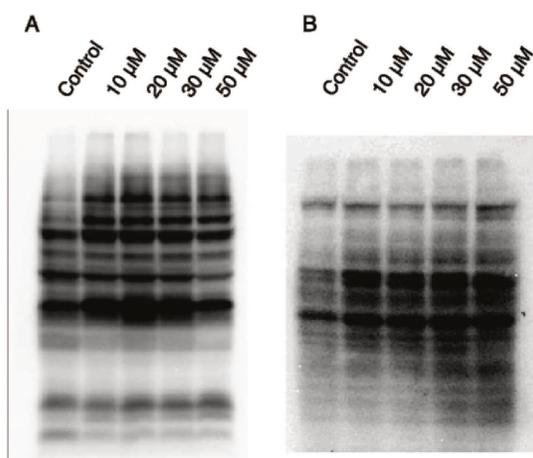


Figure 5. Effect of fisetin on protein phosphorylation levels. Cells were treated with fisetin (10, 20, 30 and 50 μM), and the tyrosine (A) and threonine (B) phosphorylations were evaluated by immunoblotting. One representative immunoblot of three independent experiments is presented.

threonine phosphorylations. We have observed that fisetin inhibited cytosolic phosphatase activities in HL60 cells (not shown).

Fisetin induces oxidative stress and decrease in antioxidant enzymes activities in HL60 cells

In order to analyze the cellular redox status after treatment of HL60 cells with fisetin we quantified the activities of aconitase, fumarase, catalase, glutathione peroxidase and two isoforms of superoxide dismutase (SOD), i.e. the MnSOD (mitochondrial isoform), and the CuZnSOD (cytosolic isoform). Treatment of HL60 cells with fisetin resulted in inactivation of mitochondrial aconitase, an enzyme sensitive to oxidative stress, but not fumarase, a mitochondrial enzyme sensitive to oxidative stress (Table I). Fisetin caused also an expressive decrease in the antioxidant enzymes catalase, MnSOD, CuZnSOD and GPX. Our results suggest that fisetin can induce oxidative stress through ROS production. ROS can lead to cell death through inactivation of mitochondrial aconitase, an iron-sulfur (Fe-S) protein [43]. Recent studies showed that ROS are emerging as obligatory mediators of cell death signaling in response to stimulation of TNF receptors and induction of JNK and p38 signaling [44–47]. A MAPK phosphatase (MKP) was identified as a critical molecular target of ROS during TNF α -induced apoptosis, due to oxidation of an essential cysteine residue to sulfenic acid [46]. MKP plays a critical role in the regulation of the activity of MAPKs [48,49]. Thus, ROS-dependent inhibition of MKPs caused persistent activation of JNK by TNF α , and, ultimately, programmed cell death *via* either a necrotic or an apoptotic pathway [47]. These findings are in agreement with our results since, besides activating JNK and p38, fisetin also caused an increase of phosphoprotein levels which can be due to either inactivation of protein phosphatases or activation of protein kinases, activities which are highly sensitives to oxidant agents.

Conclusion

In summary, our results have reinforced the hypothesis that fisetin was likely to exert beneficial and/or

Table I. Effects of fisetin on antioxidant enzymes activities of HL60 cells. Cells were treated with fisetin (100 μM) and enzyme activities were determined as described in Materials and methods.

Enzyme	Specific activities	
	Control	+Fisetin
Aconitase	2.32 mU/mg	0.11 mU/mg
Fumarase	0.029 mU/mg	0.029 mU/mg
Catalase	0.23 pmoles/mg	0.11 pmoles/mg
GPX	0.66 mU/mg	0.22 mU/mg
MnSOD	6.22 U/mg	2.46 U/mg
CuZnSOD	11.74 U/mg	3.33 U/mg

toxic actions on cells not through its potential to act as antioxidant but rather through its modulation of protein kinase and phosphatase signaling cascades. Additionally, our results also indicated that the cellular effects of fisetin ultimately depended on the cell type, and on the extent to which it associated with the cells, either by interactions with the membrane or by uptake into the cytosol.

Acknowledgements

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - Proc. 04/15041-5, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), CAPES postgraduate scholarship to RRRS, and FAPESP postgraduate scholarships to KCSQ and ACSS.

References

- [1] Middleton E Jr, Kandaswami C. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: Implications for immunity, inflammation and cancer. In: Harborne JH, Liss AR, editors. *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*. New York: 1993. p 619–652.
- [2] Verbeek R, Plomp AC, van Tol EA, van Noort JM. The flavones luteolin and apigenin inhibit *in vitro* antigen-specific proliferation and interferon-gamma production by murine and human autoimmune T cells. *Biochem Pharmacol* 2004;68: 621–629.
- [3] Middleton E Jr, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev* 2000; 52:673–751.
- [4] Hendriks JJ, de Vries HE, van der Pol SM, van den Berg TK, van Tol EA, Dijkstra CD. Flavonoids inhibit myelin phagocytosis by macrophages; A structure-activity relationship study. *Biochem Pharmacol* 2003;65:877–885.
- [5] Ferriola PC, Cody V, Middleton E. Protein kinase C inhibition by plants flavonoids. Kinetic mechanisms and structure-activity relationships. *Biochem Pharmacol* 1989;38: 1617–1624.
- [6] Agullo G, Garnet-Payrustre L, Manenti S, Viala C, Rémésy C, Chap H, Payrustre B. Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-Kinase: A comparison with Tyrosine Kinase and Protein Kinase C inhibition. *Biochem Pharmacol* 1997;53:1649–1657.
- [7] Sagara Y, Vanhnasy J, Maher P. Induction of PC12 cell differentiation by flavonoids is dependent upon extracellular signal-regulated kinase activation. *J Neurochem* 2004;90: 1144–1155.
- [8] Kimira M, Arai Y, Shimoi K, Watanabe S. Japanese intake of flavonoids and isoflavonoids from foods. *J Epidemiol* 1998;8: 168–175.
- [9] Osheroff N, Zechiedrich EL, Gale KC. Catalytic function of DNA topoisomerase II. *BioEssays* 1991;13:269–275.
- [10] Olaharski AJ, Mondrala ST, Eastmond DA. Chromosomal malsegregation and micronucleus induction *in vitro* by the DNA topoisomerase II inhibitor fisetin. *Mut Res* 2005;582: 79–86.
- [11] van Acker FAA, Schouten O, Haenen GRMM, van der Vijn WJF, Bast A. Flavonoids can replace alpha-tocopherol as an antioxidant. *FEBS Lett* 2000;473:145–148.
- [12] Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* 2000;63: 1035–1042.
- [13] Lee WR, Shen SC, Lin HY, Hou WC, Yang LL, Chen YC. Wogonin and fisetin induce apoptosis in human promyeloleukemic cells, accompanied by a decrease of reactive oxygen species, and activation of caspase 3 and Ca²⁺-dependent endonuclease. *Biochem Pharmacol* 2002;63:225–236.
- [14] Fotsis T, Pepper MS, Aktas E, Breit S, Rasku S, Adlercreutz H, Wahala K, Montesano R, Schweigerer L. Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and *in vivo* angiogenesis. *Cancer Res* 1997;57:2916–2921.
- [15] Haddad AQ, Venkateswaran V, Viswanathan L, Teahan SJ, Flesher NE, Klotz LH. Novel antiproliferative flavonoids induce cell cycle arrest in human prostate cancer cell lines. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2006;9:68–76.
- [16] Park JB. Flavonoids are potential inhibitors of glucose uptake in U937 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;260: 568–574.
- [17] Bromberg N, Justo GZ, Haun M, Duran N, Ferreira CV. Violacein toxicity on human blood lymphocytes and effect on phosphatases. *J Enz Inhib Med Chem* 2005;20:449–454.
- [18] Hartree EF. Determination of proteins: A modification of the Lowry method that give a linear photometric response. *Anal Biochem* 1972;48:422–427.
- [19] McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969; 244:6049–6055.
- [20] Beauchamp CO, Fridovich I. Isozymes of superoxide dismutase from wheat germ. *Biochim Biophys Acta* 1973; 317:50–64.
- [21] Nelson DP, Kiesow LA. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C. *Anal Biochem* 1972; 49:474–478.
- [22] Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1976;71:952–958.
- [23] Morton RL, Iklé D, White CW. Loss of lung mitochondrial aconitase activity due to hyperoxia in bronchopulmonary dysplasia in primates. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1998;274:L127–L133.
- [24] Racker E. Spectrophotometric measurements of the enzymatic formation of fumaric acid and cis-aconitic acid. *Biochim Biophys Acta* 1950;4:211–214.
- [25] Freire AG, Melo PS, Haun M, Duran N, Aoyama H, Ferreira CV. Cytotoxic effect of the diterpene lactone dehydrocrotonin from *Croton cajucara* on human promyelocytic leukemia cells. *Planta Med* 2003;69:67–69.
- [26] Justo GZ, Ferreira CV. Coagulation and cancer therapy: The potential of natural compounds. *Cur Genomics* 2005;6: 461–469.
- [27] De Fátima A, Modolo LV, Conejero LS, Pilli RA, Ferreira CV, Kohn K, de Carvalho JE. Styryl lactones and their derivatives: Biological activities, mechanisms of action and potential leads for drug design. *Cur Med Chem*, 2006 in the press.
- [28] O’Gorman DM, Cotter TG. Molecular signals in anti-apoptotic survival pathways. *Leukemia* 2001;15:21–34.
- [29] Makin G, Dive C. Apoptosis and cancer chemotherapy. *Trends Cell Biol Sci* 2001;11:S22–S26.
- [30] Martelli AM, Tazzari PL, Tabellini G, Bortul R, Billi AM, Manzoli L, Ruggeri A, Conte R, Cocco L. A new selective AKT pharmacological inhibitor reduces resistance to chemotherapeutic drugs, TRAIL, all-trans-retinoic acid, and ionizing radiation of human leukemia cells. *Leukemia* 2003; 17:1794–1805.
- [31] Chen YC, Shen SC, Lee WR, Lin HY, Ko CH, Shih CM, Yang LL. Wogonin and fisetin induction of apoptosis through activation of caspase 3 cascade and alternative expression of p21 protein in hepatocellular carcinoma cells SK-HEP-1. *Arch Toxicol* 2002;76:351–359.

4. RESULTADOS

444 R. R. Ruela de Sousa et al.

- [32] Williams RJ, Spencer JPE, Rice-Evans C. Flavonoids: Antioxidants or signaling molecules? *Free Radic Biol Med* 2004;36:838–849.
- [33] Kanno S, Tomizawa A, Ohtake T, Koiwai K, Ujibe M, Ishikawa M. Naringenin-induced apoptosis via activation of NF- κ B and necrosis involving the loss of ATP in human promyeloleukemia HL-60 cells. *Toxicol Lett* 2006;166:131–139.
- [34] Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 1999;18:6853–6866.
- [35] Ricca A, Biroccio A, Trisciuglio D, Cippitelli M, Zupi G, del Bufalo D. relA overexpression reduces tumorigenicity and activates apoptosis in human cancer cells. *Brit J Cancer* 2001;85:1914–1921.
- [36] Kroemer G, Zamzami N, Susin SA. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* 1997;18:45–51.
- [37] Dumont A, Hehner SP, Hofmann TG, Ueffing M, Dröge W, Schmitz ML. Hydrogen peroxide-induced apoptosis is CD95-independent, requires the release of mitochondria-derived reactive oxygen species and the activation of NF- κ B. *Oncogene* 1999;18:747–757.
- [38] Lin KI, Lee SH, Narayanan R, Baraban JM, Hardwick JM, Ratan RR. Thiol agents and Bcl-2 identify an alphavirus-induced apoptotic pathway that requires activation of the transcription factor NF- κ B. *J Cell Biol* 1995;131:1149–1161.
- [39] Carter BD, Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Offenhauser N, Bohm MR, Baeuerle PA, Barde YA. Selective activation of NF-kappaB by nerve growth factor through the neurotrophin receptor p75. *Science* 1996;272:542–545.
- [40] Grimm S, Bauer MK, Baeuerle PA, Schulze Osthoff K. Bcl-2 downregulates the activity of transcription factor NF-kappaB induced upon apoptosis. *J Cell Biol* 1996;134:13–23.
- [41] Lin B, Williams-Skipp C, Tao Y, Schleicher MS, Cano LL, Duke RC, Scheinman RI. NF- κ B functions as both a proapoptotic and antiapoptotic regulatory factor within a single cell type. *Cell Death Diff* 1999;6:570–582.
- [42] Grilli M, Memo M. Nuclear factor kappa B/Rel proteins: A point of convergence of signaling pathways relevant in neuronal function and dysfunction. *Biochem Pharmacol* 1999;57:1–7.
- [43] Liang LP, Patel M. Iron-sulfur enzyme mediated mitochondrial superoxide toxicity in experimental Parkinson's disease. *J Neurochem* 2004;90:1076–1084.
- [44] Sakon S, Xue X, Takekawa M, Sasazuki T, Okazaki T, Kojima Y, Piao JH, Yagita H, Okumura K, Doi T, Nakano H. NF κ B inhibits TNF α -induced accumulation of ROS that mediate prolonged MAPK activation and necrotic cell death. *EMBO J* 2003;22:3898–3909.
- [45] Pham CG, Bubici C, Zazzeroni F, Papa S, Alvarez K, Jayawardena S, De Smaele E, Cong R, Beaumont C, Torti FM, Torti SV, Franzoso G. Ferritin heavy chain upregulation by NF- κ B inhibits TNF α -induced apoptosis by suppressing reactive oxygen species. *Cell* 2004;119:529–542.
- [46] Ventura JJ, Cogswell P, Flavell RA, Baldwin AS Jr, Davis RJ. JNK potentiates TNF-stimulated necrosis by increasing the production of cytotoxic reactive oxygen species. *Genes Dev* 2004;18:2905–2915.
- [47] Kamata H, Honda S, Maeda S, Chang L, Hirata H, Karin M. Reactive oxygen species promote TNF α -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell* 2005;120:649–661.
- [48] Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 2000;103:239–252.
- [49] Sumbayev VV, Yasinska IM. Regulation of MAP kinase-dependent apoptotic pathway: Implication of reactive oxygen and nitrogen species. *Arch Biochem Biophys* 2005;436:406–412.

4. RESULTADOS

Modulation of protein kinase and protein phosphatase by apigenin defines the myeloid leukemia cell fate

Roberta Regina Ruela de Sousa^a, Gwenny Fuhler^b, Karla Cristiana Souza Queiroz^b, Maikel P. Peppelenbosch^b, Carmen Veríssima Ferreira^a, Hiroshi Aoyama^{a#}

^aDepartamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), SP, Brasil

^bDepartment of Cell Biology, University Medical Center Groningen, Groningen, The Netherlands

#Corresponding author: Hiroshi Aoyama (aoyama@unicamp.br), UNICAMP, Instituto de Biologia, Departamento de Bioquímica, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Barão Geraldo - Campinas - SP, Brasil. CEP: 13083-970. Phone number: +551935216141, Fax number: +551935216129

Key words: apigenin, apoptosis, leukemia, phosphatase, kinase, kinome profiling

4. RESULTADOS

ABSTRACT

Protein phosphatases and kinases are key players in regulating signal transduction. We examined the effect of apigenin on HL60 cells metabolism under the protein phosphorylation/dephosphorylation aspects, using *in vitro* phosphorylation of peptide arrays containing 1,024 different kinase consensus sequences and western blotting. Among 112 substrates which showed difference in phosphorylation, we detected 101 which showed to be less phosphorylated. Inhibition of different kinases responsible for regulating cell proliferation and survival was identified by kinome profiling. Importantly, our findings highlighted Src kinase, as well as protein tyrosine phosphatases (SHP2 and LMWPTP) as important targets for apigenin, since these enzymes were strongly inhibited. Another interesting observation was the activation of PTEN on leukemia cells treated with apigenin. Our findings showed that apigenin had an effect on leukemia cell through changes on kinase and phosphatase activities, affecting primarily survival pathways which culminated with apoptosis induction.

4. RESULTADOS

INTRODUCTION

Flavonoids exhibit a variety of effects such as inhibition of malignant cell growth (Sousa et al., 2007), regulation of lymphocyte activation, cell proliferation and differentiation (Middleton et al., 2000; Verbeek et al., 2004). Apigenin (4',5,7-trihydroxyflavone), a common dietary flavonoid, abundantly present in fruits and vegetables, displays promising biological effects such as prevention and therapy of prostate cancer, suppression of tumorigenesis and angiogenesis in melanoma and breast, skin and colon carcinomas (Wang et al., 2000; Caltagirone et al., 2000; Way et al., 2004; Shukla et al., 2005). These effects appear to be primarily mediated through suppression of the expression of COX-2, MMP-9, NOS-2, VEGF, and lipoxygenase (Liang et al., 1999; Kim, 2003; Fang et al., 2005). Under cell death mechanism, apigenin exhibits antitumoral effects via apoptosis induction, through activation of caspases, inhibition of fatty acid synthase and topoisomerase and modulation of Bax and Bcl-2 expression (Wang et al., 1999, Yin, 1999). Besides, this flavonoid modulates some keys protein kinases such as PI3K, AKT, MAPK ERK1/2, casein kinase-2 and other upstream kinases involved in cancer development and progression (Way et al., 2004).

Interestingly, however, recent novel technical approaches have been developed allowing the generation of comprehensive descriptions of cellular metabolism without the need of *a priori* assumptions as to the signaling pathways affected (Diks and Peppelenbosch, 2004; Diks et al., 2004). We have pioneered an approach involving peptide arrays exhibiting consensus phosphorylation sequences for cellular kinases that allows simultaneous assessment of the activity of the total complement of kinases present in the human genome (the so-called kinome) (Diks and Peppelenbosch, 2004; Diks et al., 2004). Hence we decided to test whether this technology would allow us to define the molecular mechanisms underlying apigenin effects in leukemia. Among the kinases which were less active on cells treated with apigenin, Src kinases seems to be one important target of this flavonoid. In addition, the differential effect of apigenin on PTPs potentiates its antiproliferative action. We observed inhibition of LMWPTP and SHP2 while PTEN was more active.

4. RESULTADOS

MATERIAL AND METHODS

Cell line and reagents

HL60 and K562 cells were purchased from ATCC (Rockville, MD, USA) and Lucena cells were kindly provided by Prof. Vivian Rumjanek (Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Apigenin and apigenin 7-*O*-neohesperidoside (rhoifolin) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Polyclonal antibodies against phospho-p42/44 (ERK1/2), phospho-AKT (Ser-473), phospho-HSP27 (Ser-82), phospho-c-Raf (Ser-338), phospho-GSK-3 β (Ser-9), AIF, phospho-cdc2 (Thr-15), phospho-Rb (Ser-795), phospho-STAT5 (Tyr-694), phospho-tyr PI3K subunit p85, antirabbit and antimouse peroxidase-conjugated antibodies were purchased from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). Antibodies against p21, NF κ B p65 subunit, phospho-STAT3 (Tyr-705), Bcl2, Bax, TNFR1 and IKK α were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).

Cell culture

HL60, K562 and Lucena-1 cells were cultured in RPMI 1640 containing 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin and 10% fetal bovine serum, at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. TF-1 cells were cultured at the same conditions except for addition of 5ng/mL GMCSF. In all experiments, 6 x 10⁵ cells/mL were treated for 24 h with different concentrations of apigenin.

Human lymphocytes were obtained from healthy blood donors. Blood cells were separated by density through Ficol Paque[®] gradient. Mononuclear blood cells were harvested and cultured in RPMI 1640 containing 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin, 10% fetal bovine serum and concanavalin A (5 μ g/mL) for 48 h when the treatment was done.

MTT assay for cellular viability

Cell viability was assessed by MTT reduction assay as described by Mosmann (1983). The effect of apigenin on cell growth was assessed as the percentage of inhibition

4. RESULTADOS

in cell growth where non-treated cells were taken as 100% of viability. IC₅₀ values were determined from three independent experiments.

Western blotting analysis

Cells (3×10^7) were lysed in 200 μ L cell lysis buffer [50 mM Tris-HCl pH 7.4 containing 1% Tween 20, 0.25% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM *o*-vanadate, 1 mM sodium fluoride, and protease inhibitors (1 μ g/mL aprotinin, 10 μ g/mL leupeptin, and 1 mM PMSF)] for 2 hours on ice. Protein extracts were cleared by centrifugation, and the protein concentration was determined using Lowry method (Hartree, 1972). Sodium dodecyl sulfate (SDS) gel loading buffer (100 mM Tris-HCl, pH 6.8 containing 200 mM dithiothreitol, 4% SDS, 0.1% bromophenol blue, and 20% glycerol) was added to the samples and boiled for 10 minutes. Cell extracts, corresponding to 3×10^5 cells, were resolved by SDS-polyacrylamide gel (12%) electrophoresis (PAGE) and transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes. Membranes were blocked for 1 h in 1% fatfree dried milk or bovine serum albumin (2%) in Tris-buffered saline (TBS) - Tween 20 (0.05%) and incubated overnight at 4°C with appropriate primary antibody at 1:1000 dilution. After washing in TBS-Tween 20 (0.05%), membranes were incubated with antirabbit or antimouse horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies, at 1:2000 dilutions (in all Western blotting assays), in blocking buffer for 1 hour. Detection was performed by using enhanced chemiluminescence (ECL).

Immunoprecipitation of the LMWPTP

After treatment of the cells with apigenin for 24 h, whole-cell lysates were prepared with lysis buffer (20 mM HEPES pH 7.7, 2.5 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 1% Nonidet-P40 (NP40), 1 mM 4-(2-amino-ethyl)-benzenesulfonylfluoride hydrochloride), 1 mM DTT, 10 mg/mL aprotinin, and 10 mg/mL leupeptin) and chilled on ice for 2 h. After centrifugation, lysates were rotated with anti-LMWPTP overnight and with GammaBind G Sepharose at 4°C for 3 h. The beads were washed three times with lysing buffer and twice with 0.1 M acetate buffer pH 5.0. Next, the phosphatase activity was

4. RESULTADOS

determined using pTy1146 Insuline Receptor peptide as a substrate, using the PTP no radioactive assay kit from Sigma. Cells without any treatment have LMWPTP imuprecipitated and the PTP activity was measured in the presence of apigenin.

Apoptosis Analysis by Cytometry Assay using Annexin V and Propidium iodide (PI)

To perform the Annexin and PI assay, the FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit II from BD Pharmingen™ was used. Briefly, control and apigenin-treated cells were collected, washed twice in cold PBS and then resuspended in 1X binding buffer (0.01 M HEPES/NaOH, pH 7.4, 0.14 mM NaCl and 2.5 mM CaCl₂) at the concentration of 1×10⁶cells/mL. Subsequently, 100 µL of cell suspension were transferred to a 5 mL tube and Annexin V FITC (5 µL) and PI (5 µL) were added. The cells were incubated at room temperature for 15 min, after which 400 µL of 1X binding buffer were added and apoptosis assessed by flow cytometry.

Cell Cycle Analysis by Cytometry using Propidium iodide (PI)

After treatment with apigenin 20, 30 and 40µM, cells were spin down, washed with PBS and resuspended in 200µL of work solution (0.96g/mL sodium citrate, 1mg/mL Ribonuclease A, 0.02mg/mL propidium iodide, 0.01% Triton X-100). After incubation in the dark for 60 min at room temperature, the samples were analysed in FACSCalibur BD Bioscience.

Kinomic array

The production of the array and the protocol of the kinome array have been described in detail earlier (Diks and Peppelenbosch, 2004; Diks et al., 2004; Lowenberg et al., 2005, 2006; van Baal et al., 2006; de Borst et al., 2007). In short, cells were washed in PBS and lysed in a non-denaturing lysis buffer. The peptide arrays (Pepscan, Lelystad, The Netherlands), containing up to 1024 different kinase substrates in *triplo*, were

4. RESULTADOS

incubated with cell lysates, for 90 min, in a humidified incubator at 37°C. Subsequently, the arrays were washed in 2 M NaCl, in 1% Tween, in PBS, in 1% Tween and water, whereafter slides were exposed to a phosphoimaging screen for 72 h and scanned on a phospho-imager (Fuji, Stanford, USA). The spot intensities were analysed using Scanalyse software.

Statistical analysis

All experiments were performed in triplicate and the results shown in the graphs represent the means and standard errors. Cell viability data were expressed as the means \pm standard errors of 3 independent experiments carried out in triplicates. Data from each assay were statistically analyzed by ANOVA. Differences were considered significant when the p value was less than 0.05. Western blottings represent 3 independent experiments.

RESULTS

High-throughput kinase analysis on leukemia cells treated with apigenin

To investigate the effects of apigenin (Figure 1A) on the phosphorylation events, we used the kinome assay to analyse the general profile of kinase activity. HL60 cells (2.5×10^5 cells) were incubated for 24 h with vehicle (0.1% DMSO) or 30 μ M apigenin and subsequently analyzed using the peptide array. The correlation coefficient (r) of non-treated and treated cells was 0.78, which was determined by taking all spot intensities into account (Figure 1B), what means that there is difference of phosphorylation peptides between the treated and non-treated cells.

Protein kinases that displayed an expressive change in activity are summarized in Table 1. We detected significant differences in the phosphorylation of 112 peptides from 1024 in the array, when apigenin-treated and vehicle-treated HL60 cells were compared, 101 out of 112 peptides were less phosphorylated ($p < 0.05$; see supplementary information for a full description of results obtained – Table 1). Figure 1 B shows the kinases which displayed ratio of spots phosphorylation between treated and non-treated

4. RESULTADOS

cells. Among the kinases that were most noticeably affected we highlighted those that play a critical role in tumor aggressiveness: AKT, ERK, JNK, JAK 2, c-Src, PAK, Cdc2, PKC, CK2, PKC, PKA (Figure 1C). In addition, the kinome profiling reveals that other protein kinases involved in cell survival, cytoskeleton remodelling and cell cycle progression were modulated upon apigenin treatment (Figure 1D).

Next, to validate the results obtained with kinome profiling, we performed Western blot analysis of HL60 cells treated with either vehicle, or 20, 30 and 40 μ M apigenin for 24 h.

Figure 2 shows that the treatment of HL60 cells with apigenin resulted in an inhibition of the AKT/PI3K pathway due to downregulation of the PI3K regulatory subunit p85, and downregulation of PDK1. The expression of AKT slightly increased, however, it was downregulated due to the decrease of phosphorylation at Ser473. In agreement, PDK-1, a kinase responsible for activation of AKT via phosphorylation at Thr308, was shown to have a decreased phosphorylation on the activation loop (Ser241). One of the downstream effects of AKT is the inhibition of GSK3- β through phosphorylation of this molecule. As expected, apigenin treatment resulted in a diminished phosphorylation of GSK3- β at Ser9.

MAPK pathway as target of apigenin

The kinome profiling was an useful tool to analyze the effect of apigenin in MAPK pathway. The peptides substrate of MAPK pathway showed significant diminution of phosphorylation, predicting that this pathways was depressed by apigenin. On the other hand, JNK and p38 were activated in the presence of apigenin, as shown in Figure 3.

Src pathway as target of apigenin

Cells treated with apigenin displayed diminishing of phosphorylation of Src family at Tyr416, an activator site of this protein tyrosine kinase (Figure 3). Accordingly, the phosphorylation level of 18 peptides corresponding to Src substrates, such as FAK, ZAP70, Caveolin-2, decreased by the treatment with apigenin, as revealed by Pepchip (Table 2)

4. RESULTADOS

Apigenin treatment causes cell cycle arrest in HL60 cells

The kinome profiling revealed changes in protein phosphorylation related to cell cycle, peptides of Cdc2, CDK2 and CDK5' substrates showed by decreasing of phosphorylation levels when exposed to apigenin-treated cells. To obtain more information of the action of apigenin in cell cycle, we analyzed the DNA content from cells treated or not with apigenin. Apigenin caused arrest in HL60 cells in G₂/M phase, as determined by flow cytometry (Figure 4A). This fact was in agreement with an increase in apigenin-induced phosphorylation of Tyr15 cdc2 (CDK1) which resulted in inhibition of this kinase and, consequently, provoked cell cycle arrest at G₂/M. However, the expression of c-myc and p21 remained unchanged (Figure 4B).

Apigenin differentially affects phosphatase activities

Cells treated with apigenin displayed a decrease of phosphorylation of SHP2 at activator residue (Tyr542). We also examined the expression as well as the activity of the LMWPTP after immunoprecipitation (Figure 5A). Despite having a tendency of increase the expression of the LMWPTP, we observed an expressive decrease of this phosphatase activity on cells treated with apigenin (Figure 5A and B). Its activity was inhibited about 50% by apigenin treatment, even at low concentrations (20µM) (Figure 5B). The effect of apigenin on LMWPTP can be explained, at least in part, by a direct effect of the flavonoid on the enzyme activity, as shown in the Figure 5C. The LMWPTP immunoprecipitated from non-treated cells was inhibited *in vitro* about 30% in the presence of apigenin. On the other hand, the activity of PTEN was increased on cells treated with apigenin (Figure 5A).

Apigenin induces apoptosis of HL60 cells via the intrinsic pathway

As a result of changes of protein phosphorylation, apigenin led to the HL60 cells death, as shown in Figure 6A. Leukemia cells were treated with apigenin in concentrations up to 200 µM, for 24h (Figures 6A). As shown in Figure 6B, apigenin caused a dose-dependent

4. RESULTADOS

reduction in the viable leukemia cell number. Erythroleukemia cells K562 and their counterpart with resistance phenotype, Lucena-1, displayed low sensitive effect towards apigenin; at the highest concentration used (200 μM) 60% of the cells remained viable. However, in relation to TF1 and HL60 the following IC_{50} values were obtained: 125 and 30 μM , respectively (Figure 6C). Additionally, we examined the effect of apigenin 7-*O*-neohesperidoside, however no toxic effect was observed (Figure 1C). Importantly, no effect was observed with apigenin in human peripheral blood lymphocytes.

Apoptosis has been reported in the literature for many cell lines, inclusive leukemia cells, but not specifically to HL60 cells. We observed apoptosis induction of HL60 cells by apigenin through the annexin assay (Figure 6C). This induction occurred via an intrinsic pathway, since downregulation of TNFR1, changes in the Bax:Bcl-2 ratio and increase of caspase 3 and PARP cleavage were detected (Figure 6D).

DISCUSSION

Our research group has a long-standing interest in the possible beneficial biological effects of natural compounds and their derivatives (Freire et al., 2003; Ferreira et al., 2004; Cavagis et al., 2006; Miranda et al., 2006; Kodach et al., 2006; Souza et al., 2006; Queiroz et al., 2007; Sousa et al., 2007; de Jesus et al., 2008). In this work, we correlated the apoptotic effect of apigenin with modulation of protein kinases and phosphatases. Protein phosphatases and protein kinases are key players in regulating intricate mechanisms in signal transduction. Therefore, the evaluation of the effect of a potential antitumoral agent on the kinome profile and phosphatase activity might be useful to provide more details about its molecular mechanism.

In the light of the importance of flavonoids in the human diet and taking into consideration that this class of biocompounds is emerging as potent cancer preventing and chemotherapeutic agents acting as inhibitor of cell growth and apoptosis inductor (Sousa et al., 2007), we decided to examine the effect of apigenin in the leukemia cells phosphorylation levels.

Ninety percent of all the peptides which showed significant differences in phosphorylation levels, had increase of phosphorylation under apigenin treated-cells lysed, indicating that apigenin had intense effect on kinase activity. Flavonoids have the

4. RESULTADOS

potential to bind to the ATP-binding sites of a large number of proteins (Conseil et al., 1998), including protein kinase A (Revuelta et al., 1997) and protein kinase C (Huang et al., 1999) due to their similarity to ATP structure, which make flavonoids competitive inhibitors of protein kinases. Flavonoids, such as quercetin and luteolin, have been reported to display inhibitory activities at a number of protein kinases, interacting to the ATP binding site, presumably causing structural changes in the kinase and leading to its inactivity (Huang et al., 1999). For instance, the most selective PI3K inhibitor, currently available, LY294002, was modelled on the structure of quercetin (Williams et al., 2004). Apigenin has already been reported to be a competitive inhibitor of protein tyrosine kinase (Huang et al., 1996). Herein, we showed that apigenin can also negatively modulate kinase activity by regulating other mediators, for instance, PTEN. We observed that apigenin provoked inhibition of AKT/PI3K pathway, due to negative modulation of upstream mediators of this kinase, such as EGFR, FAK and activation of PTEN. PTEN, as a negative modulator of PI3K/AKT signalling pathway, represents an important mediator of cell death, inhibition of growth or both. PI3K phosphorylates phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂), into the secondary messenger phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PIP₃). This second messenger mediates downstream signalling by recruiting and activating PDK-1 followed by the activation of PKB/AKT. PTEN has the ability to dephosphorylate PIP₃ to its precursor, PIP₂, thereby blocking the cascade of events generated as a consequence of the accumulation of the secondary messenger (Mocanu and Yellon, 2007). Therefore, activating PTEN, apigenin decreases the PI3K, as well as, PDK-1 activities and, consequently, induces apoptosis.

Kinome profiling also revealed inhibition of casein kinase II (CK₂) and JAK₂ by apigenin. The CK₂ is a ubiquitously expressed serine-threonine kinase and its activity is enhanced in all human tumors examined so far (Guerra and Issinger, 2008). Recently, Hamacher et al. (2007) demonstrated that the inhibition of CK₂ led to a reduction of pancreatic cancer cell viability, which was due to caspase-dependent apoptosis. Cytokine stimulation induces proliferation and growth of acute myeloid leukemia (AML) blasts and high levels of cytokines have been associated with poor prognosis in AML. The JAK-Stat pathway constitutes a major mediator of cytokine activity. Therefore, the inhibition of JAK1 by apigenin is also an important factor that reinforces the apoptotic cascade activation.

4. RESULTADOS

Another kinase we evaluated in this work was Src, which plays key roles in cell differentiation, motility, proliferation, and survival. In our study, apigenin led to a decrease of phosphorylation of Tyr416 residue with consequent inhibition of its activity. Up to date, there is no consensus mechanism by which Src promotes cell survival. Roskoski and co-authors (2005) reported that the antiapoptotic activity of Src was correlated with its capacity to modulate NF κ B, MEK1/2–ERK1/2–CREB pathway, STAT3 and Bclxl. Despite apigenin is more effective in inhibiting kinases, it induced the activity of JNK and MAPK p38. Recently some studies have been suggesting that ERK pathway can be suppressed by JNK and p38 during apoptosis process (Junttila et al., 2008).

Interestingly, we observed that not only kinases were affected by apigenin, but also phosphatases can be negatively or positively modulated by this flavonoid. LMWPTP was 50% inhibited in cells treated with apigenin, even in lower concentration, although the expression was slightly increased. We also analyzed if apigenin could have a direct effect on this enzyme. Importantly, we also detected inhibition of the immunoprecipitated LMWPTP and incubated with apigenin. In previous studies we observed that flavonoids can inhibit or activate the LMWPTP *in vitro* depending on the flavonoid structure (Miranda et al., 2006). LMWPTP expression is upregulated in various human cancers since it can act as a positive signal for cell growth and proliferation (for review see Souza et al., 2008). SHP-2 has also shown to be inhibited by apigenin, due to the decrease of phospho-Tyr542. SHP-2 participates in signalling events downstream of receptors for growth factors, cytokines, hormones, antigens and extracellular matrices in the control of cell growth, differentiation, migration and death (Edouard et al., 2007).

Accordingly to kinome profiling, HL60 treated with apigenin displayed cell cycle arrest in G2/M phase. This flavonoid has already shown to induce cell cycle arrest in both epidermal and fibroblast cells and inhibited skin tumorigenesis in murine models (Lepley et al., 1997). However, depending on the cell type, apigenin has different effect on cell cycle arrest; it can lead G2/M arrest in colon carcinoma (Wang et al., 2000), breast cancer (Choi and Kin, 2008) and pancreatic cancer cells (Ujiki et al., 2006). Nevertheless, in human prostate cancer, LNCap and PC3 cells, apigenin induced cell cycle arrest in G0/G1 (Shukla and Gupta, 2007). Although, the expression levels of p21 and c-myc remained unchanged in HL60 cell treated with apigenin, the Cdc2 activity was decreased as

4. RESULTADOS

evidenced by increasing of Tyr15 phosphorylation. Cdc2, normally driving cells into mitosis, is the ultimate target of pathways that mediate rapid arrest in G₂, in response to DNA damage (Stark and Taylor, 2006). Additionally, kinome profiling revealed a decrease of phosphorylation of Rb protein, indicating the low activity of CDK4. The active complex of CDK4/cyclin D targets the Rb protein for phosphorylation, allowing the release of E2F transcription factor that activate G₁/S-phase gene expression (Sherr, 1996). These results together suggest that apigenin shows a complex mechanism of action into cell cycle arrest.

All the effects on phosphorylation led cells to death, as we and others have shown. Apigenin induced HL60 leukemic cells death by apoptosis. Importantly, this effect was not observed in normal human lymphocytes, which indicates that apigenin is more active against cells with high proliferation rate. The molecular structure of apigenin is essential to its cell death induction. Apigenin 7-*O*-neohesperidoside (rhoifolin) did not cause induction of HL60 cell death. The main difference between these two flavones is the presence of a disaccharide (glucose-rhaminose) at the carbon 7 of rhoifolin, which confers less hydrophobicity to its structure. The hydrophobic nature of apigenin can be one factor which contributes to its high capacity to induce apoptosis, characteristic that probably allow the apigenin, but not rhoifolin, to reach the cell interior and, consequently, triggers cell death. Some studies demonstrated that the interaction of flavonoids with biological membrane, especially mitochondria membrane, is responsible for the modulation of the mitochondrial transition pore and cytochrome c release (Green and Reed, 1998). In this context, apigenin has already been shown to induce mitochondrial depolarization and cytochrome c release in HL60 cell (Wang et al., 1999). Furthermore, apigenin was detected in mitochondria membrane of THP-1 leukemic cell after only 3 h of treatment (Vargo et al., 2006). Our results also show that mitochondria is an important cellular target for the apigenin action as evidenced by the induction of caspase-3 and poly-(ADPribose) polymerase (PARP) cleavage.

Flavonoids are recognized as antioxidant agents, characteristic which confers cardioprotective, neuroprotective and chemopreventive actions (Cao et al., 1997; Havsteen, 2002; William et al., 2004). On the other hand, a wide variety of studies has shown the pro-oxidizing effects of flavonoids *in vitro*, which results on cell signalling modulation (William et al., 2004). Vargo and co-authors (2006) have shown that apigenin

4. RESULTADOS

induced ROS generation at 1 h of treatment in THP-1 cells, but after 3 h the ROS levels reached the basal concentration. We observed no changes in thiol levels and glutathione reductase activity (data not shown) in HL60 cells treated with 30 μ M apigenin, indicating that there was no production of ROS at 24 h.

To establish the molecular mode of action of compounds with clinically useful properties is difficult if there is no information with biochemical details of the biological effect observed. The present study has shown that techniques, which generate comprehensive descriptions of cellular signaling pathways, may substantially contribute to this field. We feel that the results obtained showed that apigenin is a potential chemotherapeutic adjuvant agent due to the intervention on signaling pathways that guarantee pro-apoptotic response on cells that display high proliferative rate.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Proc. 2004/15041-5; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), scholarship to RRRS and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

4. RESULTADOS

Figure 1

Sousa et al.

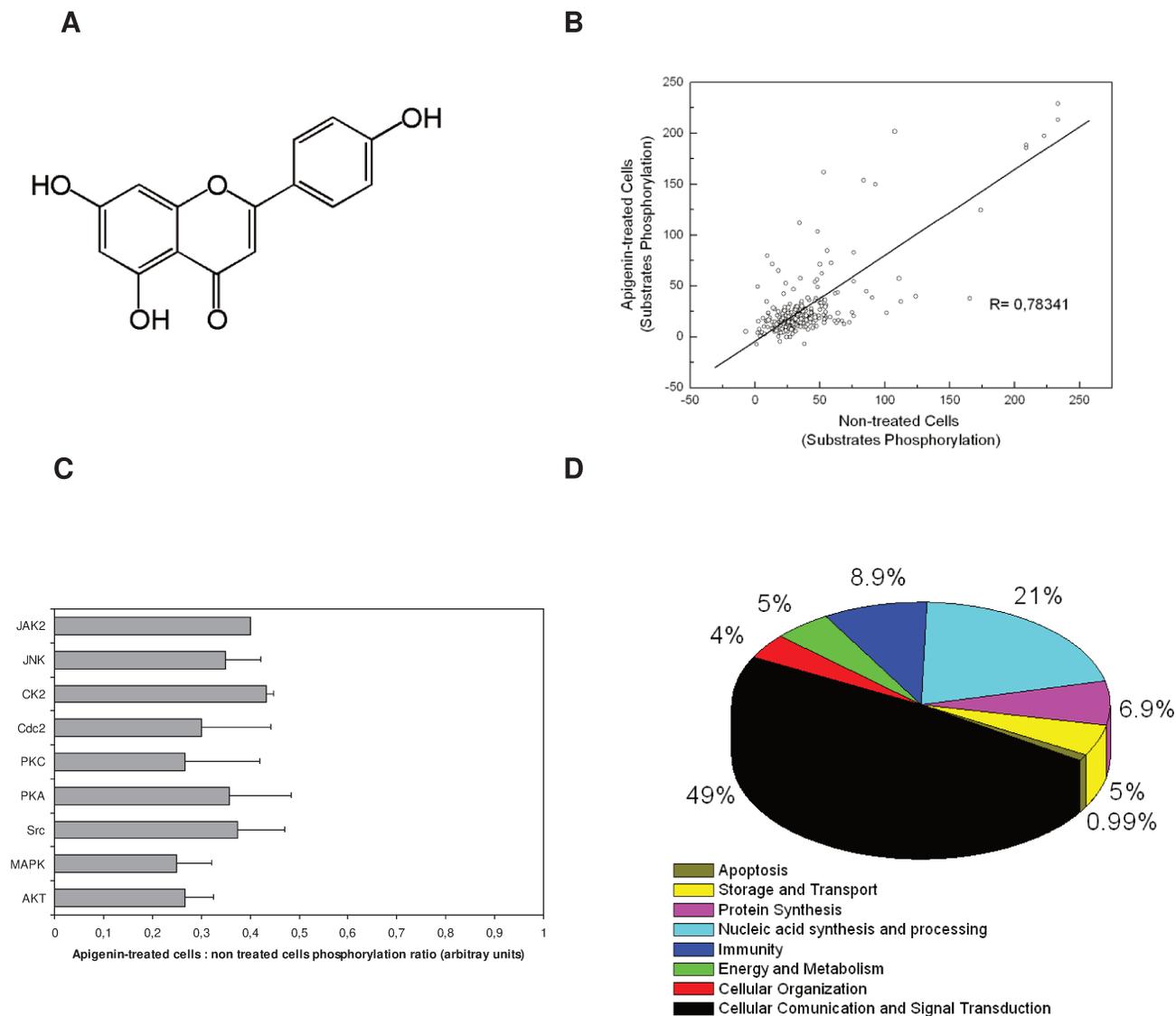


Figure 1. Phosphorylation levels of protein in HL60 cells. (A) Apigenin structure. **(B)** Correlation between non-treated and apigenin treated cells. The distribution was determined based on the substrates spotted on the PepChip by kinases from apigenin-treated cells *versus* control. **(C)** Decrease of kinase activities. **(D)** The general panel of apigenin effect on HL60, the kinases related to cellular communication and signal transduction and nucleic acid synthesis and processing were the most affected by apigenin.

4. RESULTADOS

Figure 2

Sousa et al.

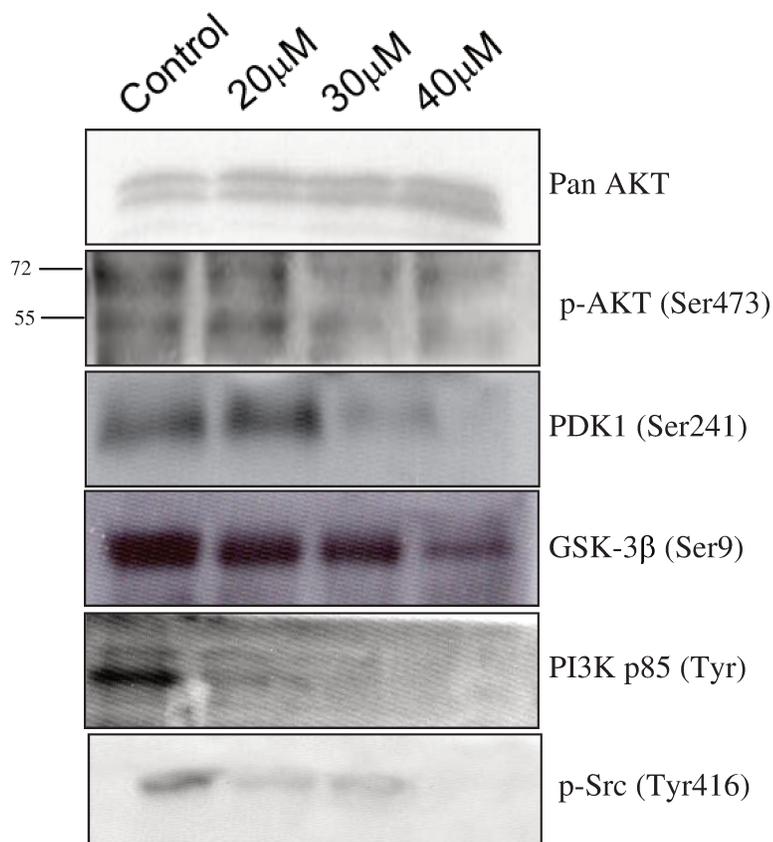


Figure 2. Effect of the treatment of HL60 cells with apigenin on key kinase molecules involved in the cell proliferation. Cells were treated with specified concentrations of apigenin for 24 h and the expression or phosphorylation of the proteins was determined by western blot. Equal loading was confirmed by reprobing them for β -actin.

4. RESULTADOS

Figure 3

Sousa et al.

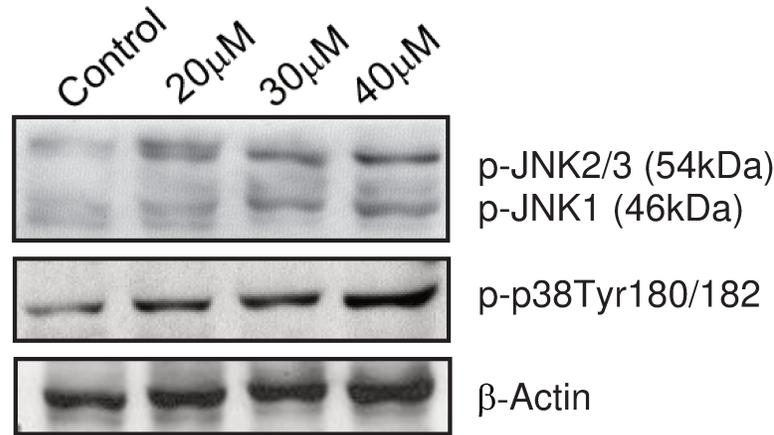


Figure 3. Effect of the treatment of HL60 cells with apigenin on MAPKs. Cells were treated with specified concentrations of apigenin for 24 h and the expression or phosphorylation of the proteins was determined by western blot. Equal loading was confirmed by reprobing them for β -actin.

Table 2. Protein kinases with expressive changes in activities

Spot	Protein Name	UP_KIN	PEPTIDE	Ratio	T-value (%)
652	CD5	Lck Fyn	SRLSAYPALEG	0,4	5
329	CD32	Lyn Blk Fyn SYK	ETNNDYETADG	0,4	2
928	CD19	Lyn kinase	MRGILYAAPQL	0,4	0.1
148	CD19	Lyn kinase, Bruton's tyrosine kinase	LGSQSYEDMRG	0,4	4
480	ADAM 12	c-Src	PRSTHTAYIK	0,5	4
852	Bone marrow kinase BMX	c-Src	VLDDQYVSSVG	0,3	3
908	DAG1	c-Src	PYRSPPPYVPP	0,4	2
921	Caveolin 2	c-Src	SYSHHSGLEYA	0,3	2
330	SIGLEC4A	Fyn	EELAIEYAEIRV	0,4	5
141	CCR2	JAK2	LTIDRYLAIVH	0,4	2
393	CD33	Src kinase	DEELHYASLNF	0,5	5
331	ZAP70	ZAP70	VYESPYSDPEE	0,2	3
847	LAT	ZAP70	DGSREYVNVSQ	0,4	4
641	SLP 76	ZAP70 Protein tyrosine kinase TXK	FEEDDYESPND	0,4	2
267	Ras-related protein	EphB2	TIEDSYTKIAS	0,2	3
910	HPK1	SYK	SSDDDYDDVDI	0,6	2
596	Shc	c-Src, SYK	PDHQYYNDFPG	0,3	3

DAG1: Dystrophin associated glycoprotein 1

4. RESULTADOS

Figure 4

Sousa et al.

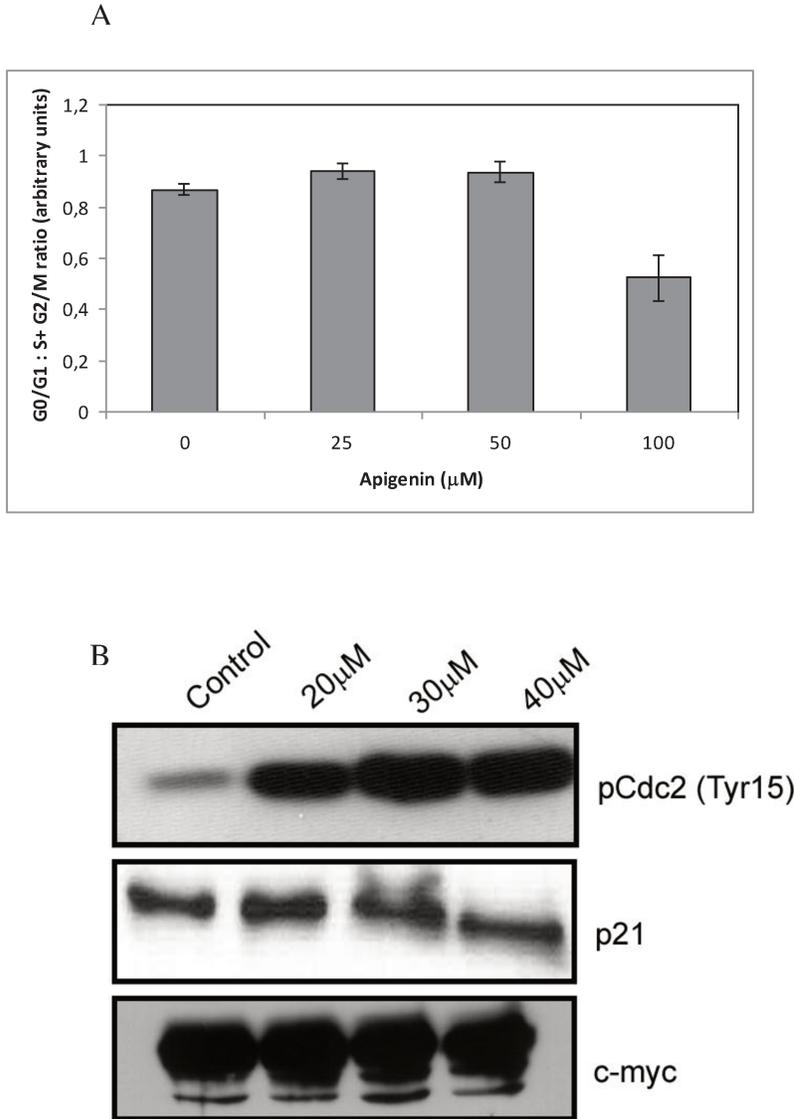


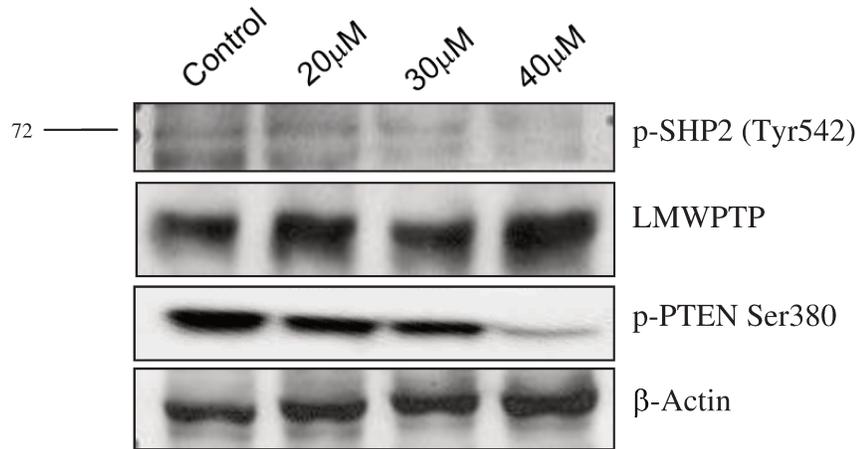
Figure 4. Effect of the treatment of HL60 cells with apigenin on cell cycle control. on the activity of key molecules involved in the cell cycle control. Cells were treated with specified concentrations of apigenin for 24 h and the ratio between the number of cells in G0/G1 phase and number of cell in S+G2/M was plot in graph A and the expression or phosphorylation of the protein-key of cell cycle control was determined by western blot. Equal loading was confirmed by reprobing them for β -actin.

4. RESULTADOS

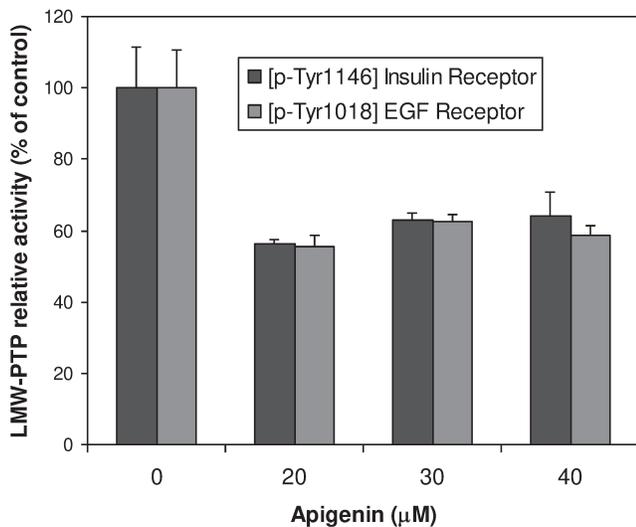
Figure 5

Sousa et al.

A



B



C

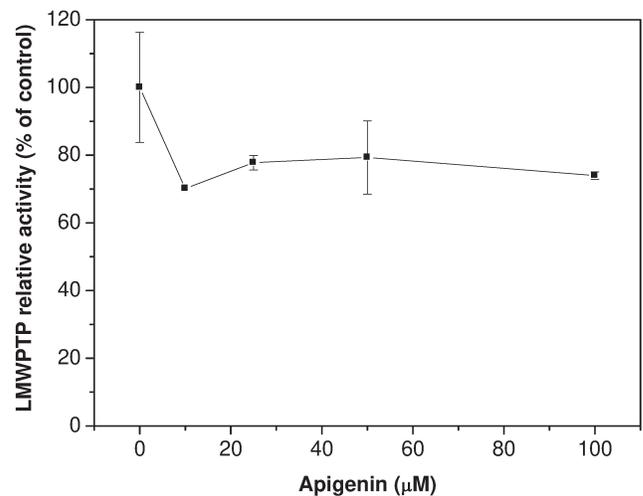


Figure 5. Effect of the treatment of HL60 cells with apigenin on the phosphatases activity. Cells were treated with 20, 30 and 40 μ M of apigenin for 24 h and the levels of LMWPTP and phosphorylation of SHP-2 were analyzed (A). The ratio between LMWPTP and actin is shown (B). The activity of LMWPTP was measured after immunoprecipitation of LMWPTP from cells treated with apigenin (C).

4. RESULTADOS

Figure 6

Sousa et al.

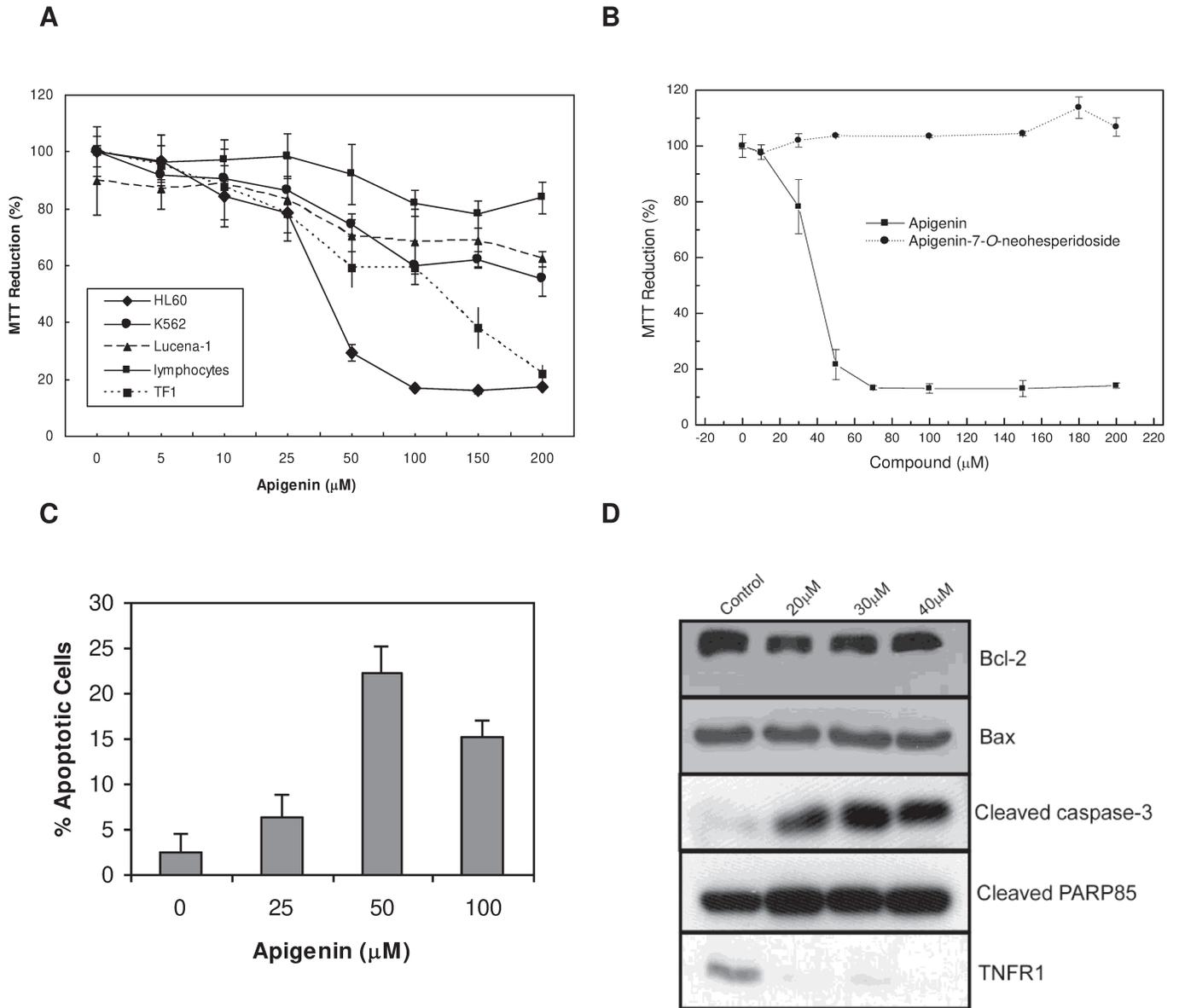


Figure 6. Apigenin induces apoptosis in HL60 cells. Leukemia cells and human peripheral blood lymphocytes were treated with apigenin for 24 h (A). Effects of apigenin and Rhoifolin in HL60 viability (B). The cell viability was measured by MTT assay and the cell viability of non-treated cells was considered as 100%. Cells were treated with apigenin (20, 30 and 40 µM) and the percentage of apoptotic cells was measured through cytometry assay, the apoptotic cells were considered all annexin V positive cells (C). The expression of pro- and anti-apoptotic proteins was evaluated by immunoblotting; Soluble lysates were matched for protein content and analyzed by Western blot. Equal loading was confirmed by reprobing the blots with anti-β-actin antibodies (D).

4. RESULTADOS

REFERENCES

- Caltagirone S, Rossi C, Poggi A, Ranelletti FO, Natali PG, Brunetti M, Aiello FB, Piantelli M. 2000. Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential. *Int J Cancer* 87: 595-600.
- Cao G, Sofic E, Prior RL. 1997. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic. Biol. Med.* 22:749-760.
- Cavagis ADM, Ferreira CV, Versteeg HH, Assis CF, Bos CL, Bleuming SA, Diks SH, Aoyama H, Peppelenbosch MP. 2006. Tetrahydroxyquinone induces apoptosis of leukemia cells through diminished survival signaling. *Exp Hematol* 34: 188-196.
- Choi EJ, Kim GH. 2008. Apigenin causes G(2)/M arrest associated with the modulation of p21(Cip1) and Cdc2 and activates p53-dependent apoptosis pathway in human breast cancer SK-BR-3 cells. *J. Nutr. Biochem.* [Epub ahead of print]
- Conseil G, Baubichon-Cortay H, Dayan G, Jault JM, Barron D, Di Pietro A. 1998. Flavonoids: a class of modulators with bifunctional interactions at vicinal ATP- and steroid-binding sites on mouse P-glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 9831-9836.
- de Borst MH, Diks SH, Bolbrinker J, Schellings MW, van Dalen MBA, Peppelenbosch MP, Kreutz R, Pinto YM, Navis G, van Goor H. 2007. Profiling of the renal kinome: a novel tool to identify protein kinases involved in angiotensin II-dependent hypertensive renal damage *Am. J Physiol Renal Physiol* 293: F428-F437.
- de Jesus MB, Zambuzzi WF, Sousa RRR, Areche C, Souza ACS, Aoyama H, Schmeda-Hirschmann G, Rodríguez JA, Brito ARMS, Peppelenbosch MP, den Hertog J, de Paula E, Ferreira CV. 2008. Ferruginol suppresses survival signaling pathways in androgen-independent human prostate cancer cells. *Biochimie* 90: 843-854
- Diks SH, Kok K, O'Toole T, Hommes DW, van Dijken P, Joore J, Peppelenbosch, MP. 2004. Kinome profiling for studying lipopolysaccharide signal transduction in human peripheral blood mononuclear cells. *J Biol Chem* 279: 49206-49213.
- Diks SH, Peppelenbosch MP. 2004. Single cell proteomics for personalised medicine. *Trends Mol Med* 10: 574-577.

4. RESULTADOS

- Edouard T, Montagner A, Dance M, Conte F, Yart A, Parfait B, Tauber M, Salles JP, Raynal P. 2007. How do SHP-2 mutations that oppositely influence its biochemical activity result in syndromes with overlapping symptoms? *Cell Mol Life Sci* 64, 1585-90.
- Fang J, Xia C, Cao Z, Zheng JZ, Reed E, Jiang BH. 2005. Apigenin inhibits VEGF and HIF-1 expression via PI3K/AKT/p70S6K1 and HDM2/p53 pathways. *FASEB J* 19: 342-353.
- Ferreira CV, Bos CL, Versteeg HH, Justo GZ, Duran N, Peppelenbosch MP. 2004. Molecular mechanism of violacein-mediated human leukemia cell death. *Blood* 104: 1459-1464.
- Freire AG, Melo PS, Haun M, Duran N, Aoyama H, Ferreira CV. 2003. Cytotoxic effect of the diterpene lactone dehydrocrotonin from *Croton cajucara* on human promyelocytic leukaemia cells. *Planta Medica* 69: 67-69.
- Green DR, Reed JC. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281: 1309- 1312.
- Guerra B, Issinger OG. 2008. Protein Kinase CK2 in human disease. *Curr Med Chem*. 15:1870-1886.
- Hamacher R, Saur D, Fritsch R, Reichert M, Schmid RM, Schneider G. 2007. Casein kinase II inhibition induces apoptosis in pancreatic cancer cells. *Oncol Rep* 18: 695-701.
- Hartree EF. 1972. Determination of proteins: a modification of Lowry method that give a linear photometric response. *Anal Biochem* 48:422-427.
- Havsteen BH. 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther* 96:67-202.
- Huang YT, Hwang JJ, Lee PP, Ke FC, Huang JH, Huang CJ, Kandaswami C, Middleton, E Jr, Lee MT. 1999. Effects of luteolin and quercetin, inhibitors of tyrosine kinase, on cell growth and metastasis-associated properties in A431 cells overexpressing epidermal growth factor receptor. *Br J Pharmacol* 128: 999-1010.
- Huang YT, Kuo ML, Liu JY, Huang SY, Lin JK. 1996. Inhibitions of protein kinase C and proto-oncogene expressions in NIH 3T3 cells by apigenin. *Eur J Cancer* 32A: 146-151.
- Junttila MR, Li SP, Westermarck J. 2008. Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *FASEB J*. 22:954-965.

4. RESULTADOS

- Kim MH. 2003. Flavonoids inhibit VEGF/bFGF-induced angiogenesis in vitro by inhibiting the matrix-degrading proteases. *J Cell Biochem* 89: 529-538.
- Kodach LL, Bos CL, Durán N, Peppelenbosch MP, Ferreira CV, Hardwick JC. 2006. Violacein synergistically increases 5-fluorouracil cytotoxicity, induces apoptosis and inhibits AKT-mediated signal transduction in human colorectal cancer cells. *Carcinogenesis* 27: 508-516.
- Landis-Piwowar KR, Milacic V, Dou QP. 2008. Relationship between the methylation status of dietary flavonoids and their growth-inhibitory and apoptosis-inducing activities in human cancer cells *J. Cell. Biochem.* 105: 514-523.
- Lepley DM, Pelling JC. 1997. Induction of p21/WAF1 and G1 cell cycle arrest by the chemopreventive agent apigenin. *Mol Carcinog* 19: 74-82.
- Liang YC, Huang YT, Tsai SH, Lin-Shiau SY, Chen CF, Lin JK. 1999. Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. *Carcinogenesis* 20: 1945-1952.
- Lowenberg M, Tuynman J, Bilderbeek J, Gaber T, Buttgereit F, van Deventer S, Peppelenbosch M, Hommes D. 2005. Rapid immunosuppressive effects of glucocorticoids mediated through Lck and Fyn. *Blood* 106: 1703-1710.
- Middleton Jr. E, Kandaswami C, Theoharides TC. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev* 52: 673-751.
- Miranda MA, Okamoto AK, Ferreira CV, Silva TL, Granjeiro JM, Aoyama H. 2006. Differential effects of flavonoids on bovine kidney low molecular mass protein tyrosine phosphatase. *J Enzyme Inhib Med Chem* 21: 419-425.
- Mocanu MM, Yellon DM. 2007. PTEN, the Achilles' heel of myocardial ischaemia/reperfusion injury? *Brit J Pharmacol* 150: 833-838.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* 65: 55-63
- Olaharski AJ, Mondrala ST, Eastmond DA. 2005. Chromosomal malsegregation and micronucleus induction in vitro by the DNA topoisomerase II inhibitor fisetin. *Mut Res* 582: 79-86.

4. RESULTADOS

- Queiroz KCS, Zambuzzi WF, Souza ACS, Silva RA, Machado D, Justo GZ, Carvalho, HF, Peppelenbosch MP, Ferreira CV. 2007. A possible anti-proliferative and anti-metastatic effect of irradiated riboflavin in solid tumours. *Cancer Lett* 258: 126-134.
- Revuelta MP, Cantabrana B, Hidalgo A. 1997. Depolarization-dependent effect of flavonoids in rat uterine smooth muscle contraction elicited by CaCl_2 . *Gen Pharmacol* 29: 847-857.
- Roskoski Jr R. 2005. Src kinase regulation by phosphorylation and dephosphorylation *Biochem Biophys Res Commun* 331: 1-14.
- Sherr CJ. 1996. Cancer cell cycles. *Science* 274: 1672-1677.
- Shukla S, Gupta S. 2007. Apigenin-induced cell cycle arrest is mediated by modulation of MAPK, PI3K-Akt, and loss of cyclin D1 associated retinoblastoma dephosphorylation in human prostate cancer cells. *Cell Cycle* 6: 1102-1114.
- Shukla S, Mishra A, Fu P, MacLennan GT, Resnick MI, Gupta S. 2005. Up-regulation of insulin-like growth factor binding protein-3 by apigenin leads to growth inhibition and apoptosis of 22Rv1 xenograft in athymic nude mice. *FASEB J* 19: 2042-2044.
- Sousa RRR, Souza ACS, Queiroz KC, Peppelenbosch MP, Ferreira CV, Aoyama H. 2007. Phosphoprotein levels, MAPK activities and NFkB expression are affected by fisetin. *J Enz Inhib Med Chem* 22: 439-444.
- Souza ACS, Kodach L, Gadelha FR, Bos CL, Cavagis AD, Aoyama H, Peppelenbosch MP, Ferreira CV. 2006. A promising action of riboflavin as a mediator of leukaemia cell death. *Apoptosis* 11: 1761-1771.
- Stark GR, Taylor WR. 2006. Control of the G2/M transition. *Mol Biotechnol.* 32:227-248.
- Souza ACS, Azoubel S, Queiroz KCS, Peppelenbosch MP, Ferreira CV. 2008. From immune response to cancer: a spot on the Low Molecular Weight Protein Tyrosine Phosphatase. *Molecular and Cellular Life Science* (in press).
- Ujiki MB, Ding XZ, Salabat MR, Bentrem DJ, Golkar L, Milam B, Talamonti MS, Bell RH Jr, Iwamura T, Adrian TE. 2006. Apigenin inhibits pancreatic cancer cell proliferation through G2/M cell cycle arrest. *Mol Cancer* 5:76-83.
- van Baal JWPM, Diks SH, Wanders RJA, Rygiel AM, Milano F, Joore J, Bergman JGHM, Peppelenbosch MP, Krishnadath KK. 2006. Comparison of kinome profiles of

4. RESULTADOS

- Barrett's esophagus with normal squamous esophagus and normal gastric cardia. *Cancer Res* 66: 11605-11612.
- Vargo MA, Voss OH, Poustka F, Cardounel AJ, Grotewold E, Doseff AI. 2006. Apigenin-induced-apoptosis is mediated by the activation of PKCdelta and caspases in leukemia cells. *Biochem Pharmacol*. 72: 681-692.
- Verbeek R, Plomp AC, van Tol EA, van Noort JM. 2004. The flavones luteolin and apigenin inhibit in vitro antigen-specific proliferation and interferon-gamma production by murine and human autoimmune T cells. *Biochem Pharmacol* 68: 621-629.
- Wang IK, Lin-Shiau SY, Lin JK. 1999. Induction 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: 1517-1525.
- Wang W, Heideman L, Chung CS, Pelling JC, Koehler KJ, Birt DF. 2000. Cell cycle arrest at G2/M and growth inhibition by apigenin in human colon carcinoma cell lines. *Mol Carcinog* 28:102-110.
- Way TD, Kao MC, Lin JK. 2004. Apigenin induces apoptosis through proteasomal degradation of HER2/neu in HER2/ neu-overexpressing breast cancer cells via the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-dependent pathway. *J Biol Chem* 279: 4479-4489.
- Williams RJ, Spencer JPE, Rice-Evans C. 2004. Flavonoids: Antioxidants Or Signaling Molecules? *Free Rad Biol Med* 36: 838-849.
- Yin F, Giuliano AE, Van Herle AJ. 1999. Growth inhibitory effects of flavonoids in human thyroid cancer cell lines. *Thyroid* 9: 369-376.

4. RESULTADOS

Table 1. Significant differentially phosphorylated consensus peptides

Spot	Protein Name	UP_KIN	Peptide	Ratio	T-value	▲▼
283	SMAD2	Activin receptor like kinase 4 TGF beta receptor, type I	GSPSVRASSMS	0,3	0,03	▼
45	Nitric oxide synthase 3	AKT1	RIRTQSFSLQE	0,3	0,03	▼
617	Androgen receptor	AKT1	RAREASGAPTS	0,3	0	▼
623	Oncoprotein Mdm2	AKT1	RRRAISETTEN	0,2	0,01	▼
282	Tumor protein p53 binding protein 1	ATM	EKASDSQSWED	0,2	0,03	▼
550	E2F transcription factor 1	ATM ATR	RLLDSSQIVII	0,5	0,02	▼
204	Aryl hydrocarbon receptor	auto	NGRPDYHIVTQ	0,3	0	▼
521	AXL receptor tyrosine kinase	auto	PDEILYVNMDE	0,2	0,03	▼
86	Formyl peptide receptor 1	Beta-adrenergic receptor kinase1	TATNSTLPSAE	0,4	0,03	▼
210	Phospholamban	Ca2+Calmodulin dependent protein kinase	IRRASTIEMPQ	0,5	0	▼
1009	Glutamate receptor ionotropic, AMPA 1	CaM-Kinase II	TLPRNSGAGAS	0,3	0,04	▼
107	HMG CoA reductase	cAMP protein kinase	MIHNRSKINLQ	0,2	0,04	▼
808	p53	CK1, alpha 1	MEEPQSDPSVE	0,4	0,01	▼
46	Histone deacetylase 2	CK2	AVHEDSGDEDG	0,5	0,05	▼
616	Protein phosphatase inhibitor 2	CK2	DEDAASDTEAT	0,3	0,01	▼
302	High mobility group AT-hook 1	CK2, alpha 1	GISQESSEEEQ	0,3	0,04	▼
440	RPA2	CDC2	GGYTQSPGGFG	0,2	0,03	▼
940	RAP1 GTPase activating protein 1	CDC2	IVPGKSPTRKK	0,4	0	▼
867	B-Myb	CDK2	PGLRRSPIKKV	0,3	0,02	▼
721	Retinoblastoma 1	CDK2-cyclin A	SEGLPTPTKMT	0,7	0,04	▼
686	Nude like protein	CDK5/p35	ENTFPPSPKAIP	0,4	0,03	▼
931	Phosphodiesterase 5A	cGMP dependent protein kinase	PTRKISASEFD	0,6	0,01	▼
28	CRIP2	cGMP kinase I	EERKASGPPKG	0,1	0,02	▼
998	Presenilin 2	CK 2	SFGEPSYPEVF	0,3	0,03	▼
1005	PC4	CK2, alpha 1	GSDSDSEVDKK	0,7	0,03	▼
508	CD20	CK2	NIVLLSAEEKK	0,5	0,02	▼
480	ADAM 12	c-Src	PRSTHTAYIK	0,5	0,04	▼
852	Bone marrow kinase BMX	c-Src	VLDDQYVSSVG	0,3	0,03	▼
908	Dystrophin associated glycoprotein 1	c-Src	PYRSPPPYVPP	0,4	0,02	▼
921	Caveolin 2	c-Src	SYSHHSGLEYA	0,3	0,03	▼
680	HCDH1	CDK2	SPYSLSPVSNK	0,5	0,01	▼
214	MEK1	CDK 5	GDAAEETPPRPR	0,3	0,03	▼
279	Protein phosphatase 1, regulatory subunit 1B	CDK 5	NPAAYTPPSLK	0,2	0,02	▼
415	Presenilin 1	CDK 5	GPHRSTPESRA	0,4	0,03	▼
297	p53	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit ATR	LSPLPSQAMDD	0,2	0,01	▼
140	CBL	EGF receptor	SANAIYSLAAR	0,3	0,01	▼

4. RESULTADOS

984	Mucin 1 transmembrane	EGF receptor	TDRSPYEKVSA	0,4	0,01	▼
267	Ras-related protein	EphB2	TIEDSYTKIAS	0,2	0,03	▼
706	ErbB2	erbB2	SPQPEYVNQPD	0,5	0,05	▼
817	Estrogen receptor, alpha	ERK2	PPPQLSPFLQP	0,3	0,04	▼
14	FGF receptor 1	FGF receptor 1	FMAKVYSDPQP	-0,1	0,04	▼
330	SIGLEC4A	Fyn	EELAEYAEIRV	0,4	0,05	▼
47	Heat-shock transcription factor 1	Glycogen synthase kinase-3	KEEPPSPQSP	-6,7	0,05	▼
943	CCR5	GRK	APERASSVYTR	0,5	0,02	▼
593	Amyloid beta A4 protein	GSK3-beta	VDAAVTPEERH	0,4	0,03	▼
269	IGF-I receptor	Insulin receptor	MTRDIYETDYY	0,3	0,02	▼
141	CCR2	Janus kinase 2	LTIDRYLAIVH	0,4	0,02	▼
875	BCL2-interacting protein BIM	JNK1	STQTPSPAQA	0,4	0,03	▼
284	H3 histone, family 3A	JNK2	QTARKSTGGKA	0,3	0,05	▼
194	KIT	KIT	INGNNYVYIDP	0,3	0,04	▼
652	CD5	Lck Fyn	SRLSAYPALEG	0,4	0,05	▼
329	CD32	Lyn Blk Fyn SYK	ETNNDYETADG	0,4	0,02	▼
928	CD19	Lyn kinase	MRGILYAAPQL	0,4	0	▼
148	CD19	Lyn kinase, Bruton's tyrosine kinase	LGSQSYEDMRG	0,4	0,04	▼
149	Transcription factor 3	MAP Kinase	SSSPSTPVGSP	0,3	0,03	▼
145	c-Fos	MAP kinase	PVVTATPSATA	0,2	0,05	▼
95	MAP3K11	MAP3K11	REWHKTTQMSA	0,4	0,05	▼
937	CHOP	MAPK14	LQEVLSSENG	0,2	0,02	▼
603	MAPK6	MAPK6	HKGHLSEGLVT	0,2	0,02	▼
759	Microtubule associated protein 2	MARK	KSKIGSTDNIK	0,4	0	▼
76	Calpastatin	nb	TIPPKYRELLA	0,4	0,03	▼
97	SH3 protein expressed in lymphocytes	nb	LQRSSSFKDFFA	0,7	0,04	▼
253	Glutamate receptor ionotropic, AMPA 4	nb	NKARLSITGSV	0,3	0,02	▼
281	Statherin	nb	IGADSSEEKFL	-0,2	0,02	▼
403	Cyclin dependent kinase 2	nb	PVRTYTHEVVT	0,3	0,02	▼
447	Notch2	nb	NRSFLSLKHTP	0,4	0,02	▼
592	Crystallin beta B3	nb	YKVILYELENF	0,4	0,01	▼
601	NFAT1	nb	LPPGASPQRSR	0,3	0,01	▼
805	Leukotriene A4 hydrolase	nb	YVEKFSYKSIT	0,4	0,01	▼
1	IKK beta	NIK MAP3K7 MEKK1 IKK alpha	ELDQGLSATSF	0,7	0,05	▼
286	Kinesin like protein 1	p34cdc2/cyclin B	IPTGTTPQRKS	0,2	0,02	▼
952	MEK1	p74raf-1	DSMANSFVGTR	0,2	0,05	▼
560	MEK1	PAK1	PGRPLSSYGMD	0,5	0,02	▼
930	PAK1	PAK1	SQKYMSFTDKS	0,3	0	▼
802	Ribosomal protein S6	PAK2	RRRLSSLRAST	0,4	0,05	▼

4. RESULTADOS

807	PAK2	PAK2	PVRMSSTIFST	0,5	0,03	▼
494	Phosphorylase kinase muscle gamma-1	Phosphorylase kinase muscle gamma-1	ILRKVSGHPNI	0,3	0,05	▼
876	Secreted phosphoprotein 1	Phosphotyrosyl protein phosphatase	DGRGDSVVYGL	0,2	0,03	▼
122	RAS related associated with diabetes	PKA	RLRRDSKEANA	0,5	0,05	▼
241	Potassium channel, voltage gated subfamily H, member 2	PKA	SVRRASSADDI	0,3	0,03	▼
954	ATP-binding cassette, subfamily A, member 1	PKA	MQRKLSVALAF	0,5	0,05	▼
61	HSP22	PKC	RDSPLSSRLLD	0,1	0,02	▼
819	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, α	PKC delta	GSHSNSFRLSN	0,3	0,01	▼
99	TFII-I	PRKG1	PFRRPSTYGIP	0,5	0,04	▼
296	Sucrase isomaltase	Protein kinase A	ARKKFSGLEIS	0,4	0,02	▼
679	Low density lipoprotein receptor-related protein 1	Protein kinase A	HGSRHSLASTD	0,4	0,02	▼
797	Guanine nucleotide binding protein, alpha13	Protein kinase A	LARRPTKGIHE	0,2	0	▼
936	Cyclic GMP inhibited phosphodiesterase B	Protein kinase A	IFRRPSLPAIS	0,2	0,04	▼
189	Cytohesin-1	Protein kinase C	RKKKVSSTKRH	-0,2	0,04	▼
94	Epithelial calcium channel 2	Protein Kinase C alpha	RLRQGTLRDL	0,4	0	▼
270	Protein tyrosine kinase 6	Protein tyrosine kinase 6	IKEDVYLSHDH	0,4	0,04	▼
665	Ribosomal S6 kinase 1	Pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 1	EKKAYSFAGTV	0,3	0,04	▼
738	Ribosomal protein L10	RPL10	QKIHISKKWGF	0,3	0,02	▼
393	CD33	Src kinase	DEELHYASLNF	0,5	0,05	▼
910	HPK1	SYK	SSDDDYDDVDI	0,6	0,02	▼
596	Shc	c-Src, SYK	PDHQYYNDFPG	0,3	0,03	▼
152	Tec tyrosine kinase	Tec tyrosine kinase	ERGQEYLILEK	0,4	0,05	▼
975	Fatty acid binding protein 4	Tyrosyl kinase	ENFDDYMKEVG	0,5	0,04	▼
651	VEGF receptor 2	VEGF receptor 2	APEDLYKDFLT	-0,1	0,04	▼
331	ZAP70	ZAP70	VYESPYSDPEE	0,2	0,03	▼
847	LAT	ZAP70	DGSREYVNVSQ	0,4	0,04	▼
641	SLP 76	ZAP70 Protein tyrosine kinase TXK	FEEDDYESPND	0,4	0,02	▼
897	Protein tyrosine kinase TXK	Protein tyrosine kinase TXK	QVKALYDFLPR	5,4	0,01	▲
314	Nitric oxide synthase 1	CaMKII α , CaM K1 α , CaM-kinase IV, PKA, PKC	KVRFNSVSSYS	3,3	0,02	▲
745	E2F transcription factor 1	CDC2	SATIVSPPSS	1,8	0,02	▲
756	Kinesin family member 1C	CKII	MRRQRSAPDLK	2	0,04	▲
594	Ezrin	Cyclin dependent kinase 5	KDDKLTPKIGF	1,4	0,05	▲
495	Serum response factor	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	VLNAFSQAPST	1,8	0,04	▲
457	SLP 76	Lck	LNEEWYVSYIT	1,9	0,01	▲
332	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1	MAP3K10	MNEVTYSTLNF	2,4	0,04	▲
101	Runt related transcription factor 2	nb	PGGDRSPRML	3,3	0	▲
1018	PPP1R9B	PKA	LPRASSLNEV	16,4	0,01	▲
948	Sterol regulatory element binding transcription factor1	Sterol regulatory element binding transcription factor1	SMPAFSPGPGI	2,2	0,03	▲

4. RESULTADOS

Lysates from 3 independent biological replicates of HL60 cell treated with apigenin 30 μ M and non-treated HL60 cells are put on PepChips and spot intensities were quantified (see also supplemental data). P-values derived from paired t-Tests performed on original and logarithmic normalized intensities are given; n.s., not significant ($p > 0.05$). Substrate proteins from which the peptides are derived and -if known- kinases phosphorylating those substrates are indicated.



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com



Biochimie 90 (2008) 843–854

BIOCHIMIE

www.elsevier.com/locate/biochi

Research paper

Ferruginol suppresses survival signaling pathways in androgen-independent human prostate cancer cells

Marcelo Bispo de Jesus ^{a,1}, Willian Fernando Zambuzzi ^{a,1}, Roberta Regina Ruela de Sousa ^a, Carlos Areche ^b, Ana Carolina Santos de Souza ^a, Hiroshi Aoyama ^a, Guillermo Schmeda-Hirschmann ^b, Jaime A. Rodríguez ^b, Alba Regina Monteiro de Souza Brito ^c, Maikel P. Peppelenbosch ^d, Jeroen den Hertog ^e, Eneida de Paula ^a, Carmen Veríssima Ferreira ^{a,*}

^a Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Cidade Universitária, Zeferino Vaz, Barão Geraldo, 13083-970 Campinas, SP, Brazil

^b Laboratorio de Química de Productos Naturales, Instituto de Química de Recursos Naturales, Universidad de Talca, Casilla 747, Talca, Chile

^c Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil

^d Department of Cell Biology, University Medical Center Groningen, University of Groningen, Groningen, The Netherlands

^e Hubrecht Institute, Utrecht, The Netherlands

Received 24 June 2007; accepted 29 January 2008

Available online 3 February 2008

Abstract

Ferruginol, a bioactive compound isolated from a Chilean tree (Podocarpaceae), attracts attention as a consequence of its pharmacological properties, which include anti-fungal, anti-bacterial, cardioprotective, anti-oxidative, anti-plasmodial and anti-ulcerogenic actions. Nevertheless, the molecular basis for these actions remains only partly understood and hence we investigated the effects of ferruginol on androgen-independent human prostate cancer cells (PC3), a known model for solid tumor cells with an exceptional resistance to therapy. The results show that ferruginol induces PC3 cell death via activation of caspases as well as apoptosis-inducing factor (AIF) as confirmed by its translocation into the nucleus. In order to clarify the biochemical mechanism responsible for the anti-tumor activity of ferruginol, we analyzed a set of molecular mediators involved in tumor cell survival, progression and aggressiveness. Ferruginol was able to trigger inhibition/downregulation of Ras/PI3K, STAT 3/5, protein tyrosine phosphatase and protein kinases related to cell cycle regulation. Importantly, the toxic effect of ferruginol was dramatically impeded in a more reducing environment, which indicates that at least in part, the anti-tumoral activity of ferruginol might be related to redox status modulation. This study supports further examination of ferruginol as a potential agent for both the prevention and treatment of prostate cancer.

© 2008 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Natural compound; Ferruginol; Apoptosis; Prostate cancer

Abbreviations: AIF, apoptosis-inducing factor; Bax, Bcl-2 associated x protein; CDKIs, cyclin-dependent kinase inhibitors; CDKs, cyclin-dependent kinases; DISC, death-inducing signaling complex; ERK, extracellular signal-regulated kinase; ERK1/2, extracellular signal-regulated protein kinase 1/2; GSK-3 β , glycogen synthase kinase-3 β ; Hsp27, heat shock protein 27; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MEK, MAPK/ERK kinase; p21, tumor suppressor protein; PC3, androgen-independent prostate cancer cell line; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; Rb, retinoblastoma; STAT, signal transducer and activator of transcription; TNFR, tumor necrosis factor receptor; FADD, Fas-associated death domain protein; AKT/PKB, protein kinase B; PCNA, proliferating cellular nuclear antigen; NF κ B, nuclear factor kappa B; IKK, inhibitory-kappa B kinase; LMWPTP, low molecular weight protein tyrosine phosphatase; JAK, Janus kinase.

* Corresponding author. Tel.: +55 19 3521 6659; fax: +55 19 3521 6129.

E-mail address: carmenv@unicamp.br (C.V. Ferreira).

¹ These authors contributed equally to this work.

1. Introduction

Prostate cancer is a major cause of cancer-related death among males and the second leading cause of cancer death in Western countries. Although recent years have seen an improvement in prostate cancer diagnosis, only a few novel therapeutic strategies have emerged and there has been little progress in improving survival [1,2]. Therefore, novel strategies for dealing with this disease are called for. Our research group has a long-standing interest in the possible beneficial biological effects of natural compounds and/or their derivatives, such as antioxidants [3] and anti-tumor agents [4–10], and hence we were interested whether we could define novel compounds with therapeutic potential for prostate cancer. Among the different classes of natural compounds, the diterpenoids have been shown to present a potent anti-proliferative action [4,11]. Ferruginol, an active compound isolated from the Chilean tree *Persea nubigena* and from the stem bark of *Podocarpus andina* (Podocarpaceae), is an abietane diterpene occurring in plants belonging to the Podocarpaceae, Cupressaceae, Lamiaceae and Verbenaceae families. This diterpene presents promising biological activities, such as anti-fungal and anti-bacterial [12], mitocidal [13], cardioactive [14], anti-oxidative [15], anti-plasmodial [16] and anti-ulcerogenic [17] properties.

We decided to investigate the potential effects of ferruginol in prostate cancer. In this work we show for the first time the molecular mechanism by which ferruginol, induces resistant prostate cancer cell death. Ferruginol was able to trigger inhibition/downregulation of Ras/PI3K, STAT 3/5, protein tyrosine phosphatase and protein kinases related to cell cycle regulation. Importantly, the toxic effect of ferruginol was dramatically impeded under the condition of more reducing environment, which indicates that at least in part, the anti-tumoral activity of ferruginol might be related to redox status modulation. This study supports further examination of ferruginol as a potential agent for both the prevention and treatment of prostate cancer.

2. Material and methods

2.1. Cell line and reagents

PC3 cells were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). Ferruginol (Fig. 1A) was extracted from the wood of *P. nubigena* Lind. and from the stem bark of *P. andina* (Poepp. ex Endl.) de Laub. (Podocarpaceae) as previously described [18].

Polyclonal antibodies against phospho p38MAPK, phospho-p42/p44 MAPK (ERK1/2) Thr202/204, ERK1/2, phospho-MEK1/2 Ser217/221, pan-AKT, phospho-AKT Ser473, phospho-Hsp27 Ser82, phospho-c-Raf Ser338, phospho-GSK-3 β Ser9, AIF, phospho-cdc2 Thr15, phospho-Rb Ser795, phospho-STAT5 Tyr694, phospho-PI3K p85 subunit, CDK6, CDK4, cyclin D1, cyclin D3, PCNA, tubulin, anti-rab-

(Beverly, MA). Antibodies against p21, NF κ B p65 subunit, phospho-STAT3 Tyr705, phospho-STAT3 Ser727, Bcl2, Bax, TNF receptor 1, FADD, IKK α and β -actin were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). LMWPTP antibody was from Abcam. Caspases 3, 8 and 9 Colorimetric Assay Kits were obtained from R&D Systems (Minneapolis, MN).

2.2. Cell culture

PC3 cells were cultured in RPMI containing 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin and 10% fetal bovine serum, at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. In all experiments, cells at semi-confluence were treated for 24 h with different concentrations of ferruginol.

2.3. MTT assay for cellular viability

Cell viability was assessed by MTT reduction assay as previously reported [19,20]. The effect of ferruginol on cell growth was assessed as the percentage of inhibition in cell growth where non-treated cells were taken as 100% of viability. IC₅₀ values were determined from three independent experiments.

2.4. Western blotting analysis

Following treatment of cells with ferruginol, the medium was aspirated and the cells were washed with cold physiological solution. The cells were then incubated in 200 μ l of lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 20 mmol/L NaF, 1 mM Na₃VO₄, 0.25% sodium deoxycholate and protease inhibitors (1 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/ml leupeptin, and 1 mM 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride)) over ice for 30 min. Protein extracts were cleared by centrifugation and protein concentrations were determined using the Lowry method [21]. An equal volume of 2 \times sodium dodecyl sulfate (SDS) gel loading buffer (100 mM Tris-HCl (pH 6.8), 200 mM DTT, 4% SDS, 0.1% bromophenol blue and 20% glycerol) was added to samples which were subsequently boiled for 10 min. Cell extracts, corresponding to 50 μ g of protein, were resolved by SDS-polyacrylamide gel (12%) electrophoresis (PAGE) and transferred to PVDF membranes. Membranes were blocked in 1% fat-free dried milk or bovine serum albumin (1%) in Tris-buffered saline (TBS)-Tween 20 (0.05%) and incubated overnight at 4 °C with appropriate primary antibody at 1:1000 dilution. After washing in TBS-Tween 20 (0.05%), membranes were incubated with anti-rabbit, anti-mouse or anti-goat horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies, at 1:2000 dilutions (in all Western blotting assays),

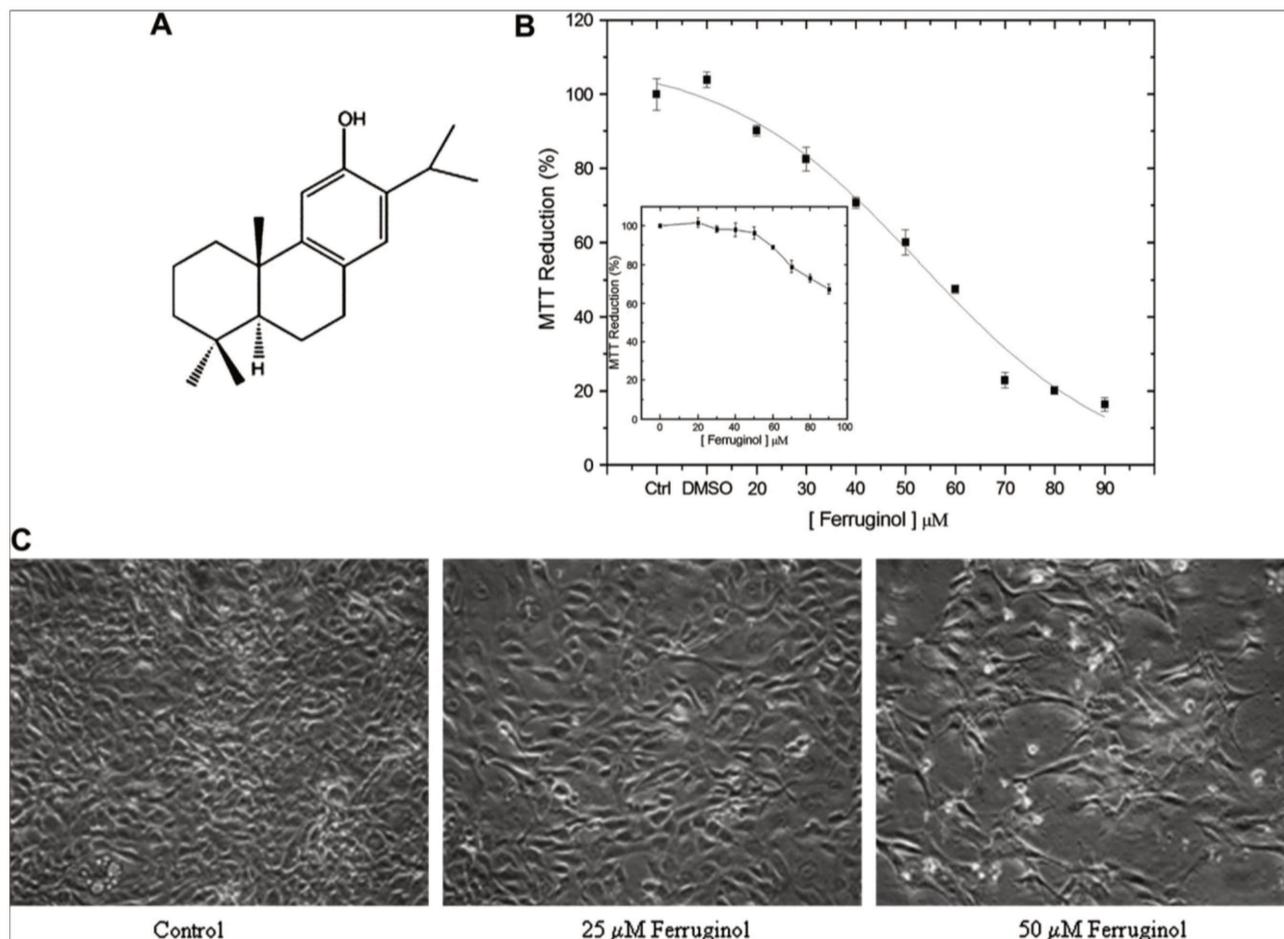


Fig. 1. Ferruginol induces toxic effects in PC3 cells. Cells were treated with specified concentrations of ferruginol (A) for 24 h. (B) Mitochondria function was evaluated through the MTT reduction. The results are expressed as the mean % of absorbance (ratio of absorbance in ferruginol treated and control cells); cell viability was also evaluated when the cells were pre-treated for 1 h with 10 mM GSH (inset plot). (C) Morphological analysis of PC3 cells treated with 25 µM and 50 µM ferruginol for 24 h (100× magnification). Ferruginol was dissolved in DMSO and the final concentration of this solvent was remained at 0.1%.

2.5. Immunoprecipitation of LMWPTP

After treatment of the cells with ferruginol for 24 h, whole-cell lysates were prepared with lysis buffer (20 mM HEPES pH 7.7, 2.5 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 1% Nonidet-P40 (NP40), 1 mM 4-(2-amino-ethyl)-benzenesulfonylfluoride hydrochloride), 1 mM DTT, 10 µg/ml aprotinin, and 10 µg/ml leupeptin) and chilled on ice for 2 h. After centrifugation, lysates were rotated with anti-LMWPTP and Protein A–Sepharose at 4 °C for 2 h. The beads were washed three times with lysing buffer and twice with 0.5 M Mes, pH 6.0. Next, the phosphatase activity was determined using pNPP as a substrate.

2.6. Caspases 3, 8 and 9 activity assays

Caspase activities were determined by the measurement at 405 nm of *p*-nitroaniline (pNA) released from the cleavage of

expressed in pmol/min and the extinction coefficient of pNA was 10,000 M⁻¹ cm⁻¹.

2.7. NFκB p65 and AIF nuclear translocation

Briefly, 2 × 10⁷ cells were harvested and washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) and resuspended in 0.2 ml ice-cold cell extract buffer (10 mM HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid)–KOH pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, and 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)). The cells were kept on ice for 10 min to allow them to swell, mixed by vortex for 10 s, and microfuged at 4 °C at 14,000 × g for 30 s. The supernatant was discarded, and the pellet was resuspended in 30 µl nuclear extraction buffer (20 mM HEPES–KOH pH 7.9, 25% glycerol, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), 0.5 mM DTT, and 0.2 mM PMSF), placed on ice for 20 min, and centrifuged at

2.8. Quantification of reduced and oxidized glutathione

Cells were washed twice with PBS, detached with 5 mM EDTA in PBS and washed twice again with cold PBS. Cell number was counted using a hemocytometer; afterwards the cells were centrifuged and equal volumes of cold PBS and 6% 5-sulfosalicylic acid (SSA) were added to cell pellets. The samples were sonicated, centrifuged at 10,000 rpm for 5 min and the supernatants used for the assays. Total glutathione (GSH + GSSG) and glutathione disulfide (GSSG) were determined by using recycling assays involving the reaction of 5,5'-dithio-bis(2nitrobenzoic acid) and glutathione reductase. The total amount of glutathione was calculated from a reduced glutathione standard curve prepared in SSA. For GSSG assay, 100 μ l of supernatant was incubated with 2 μ l of 2-vinylpyridine for 60 min on ice. The amount of GSSG was calculated from the GSSG standard curve. The amount of reduced GSH per cell was calculated by subtracting the amount of GSSG per cell from the amount of total glutathione per cell [22].

2.9. Annexin V and 7-amino-actinomycin D assays

Control and ferruginol-treated cells were collected and resuspended in $1 \times$ binding buffer (0.01 M HEPES–NaOH (pH 7.4), 0.14 mM NaCl and 2.5 mM CaCl_2) at a concentration of 2×10^7 cells/ml. Subsequently, 100 μ l of cell suspension was transferred to a 5 ml tube and 5 μ l each of Annexin V-APC and 7-amino-actinomycin D (7-AAD) was added. Cells were incubated at room temperature for 15 min, after which 400 μ l of $1 \times$ binding buffer was added and apoptosis detected by flow cytometry (Becton Dickinson FACSCalibur, Rockville, MD), the data obtained were analyzed using the software Cell Quest Pro BD Biosciences Pharmingen (Erembodegem, Belgium).

2.10. Flow cytometry

After treatment of PC3 cells with ferruginol for 24 h, cells were harvested by the addition of 5 mM EDTA and gently washed off the plate. Cells were pelleted along with the previously collected media. Cell pellets were fixed with 70% ethanol for 30 min on ice and then rinsed three times with 1 ml of 0.1% glucose in PBS (20 mM NaH_2PO_4 , 150 mM NaCl), repelleted and resuspended in propidium iodide (PI) staining solution (10 μ l of 10 mg/ml RNase A, 5 μ l of 10 mg/ml PI per 1 ml of PBS with 0.1% glucose). After 30 min the cells were analyzed using a flow cytometer.

2.11. Statistical analysis

All experiments were performed in triplicate and the results shown in the graphs represent the means and standard errors. Cell viability data were expressed as the mean \pm standard error of three independent experiments carried out in triplicate.

less than 0.05. Western blots represent three independent experiments. Quantitative analysis of the proteins was performed by volume densitometry after scanning the film (data are presented as the protein to β -actin or tubulin ratio).

3. Results

3.1. Inhibition of PC3 growth by ferruginol

PC3 cells were treated with ferruginol in concentrations up to 100 μ M and the effect of ferruginol on cell viability was determined employing the MTT method. As shown in Fig. 1B, ferruginol caused a dose-dependent reduction in the cell number displaying an IC_{50} value of 55 μ M. Importantly, pre-treatment of the cells with 10 mM GSH prevented the toxic action of ferruginol (inset plot). In agreement, the microscopy analysis also demonstrated a decrease of the cell number (Fig. 1C).

3.2. Ferruginol induces apoptosis of PC3 cells via caspases and AIF activation

In the next series of experiments, it was determined whether treatment of PC3 cells to ferruginol led to apoptosis. Ferruginol caused around 15% and 30% (in the presence of 25 and 50 μ M ferruginol, respectively) of cell death via apoptosis as detected through phosphatidylserine exposure (Fig. 2A). In agreement, we also observed activation of caspases 8, 9 and 3 (Fig. 2B). Additionally, at the lowest concentration, ferruginol led to an overexpression of TNFR1; however, FADD expression was not affected. We also examined the possible participation of mitochondria in response to ferruginol. Bcl2:Bax ratio was not significantly affected; however the expression of AIF was dramatically increased at 50 μ M ferruginol. Accordingly, AIF nuclear translocation was detected (Fig. 2C). These findings suggest that PC3 cell response toward ferruginol involves activation of caspases and release of AIF from mitochondrial intermembrane space.

3.3. Ferruginol treatment impairs prostate cancer cell survival

To obtain more insight into the molecular mechanisms mediating ferruginol effects on PC3 cells, the phosphorylation/expression state of a panel of signal transduction mediators in response to ferruginol was examined. As shown in Fig. 3, PC3 cell treatment with 50 μ M ferruginol provoked downregulation of p85 subunit of PI3K and inhibition of AKT. The results presented above indicate that ferruginol should produce a decrease of the survival and anti-apoptotic relevant kinase activities. Accordingly, cells treated with 50 μ M ferruginol displayed activation of MAPK p38, an important apoptosis inducer, and a slight inhibition of ERK2. However, the upstream activator of ERK, MEK, was not affected.

4. RESULTADOS

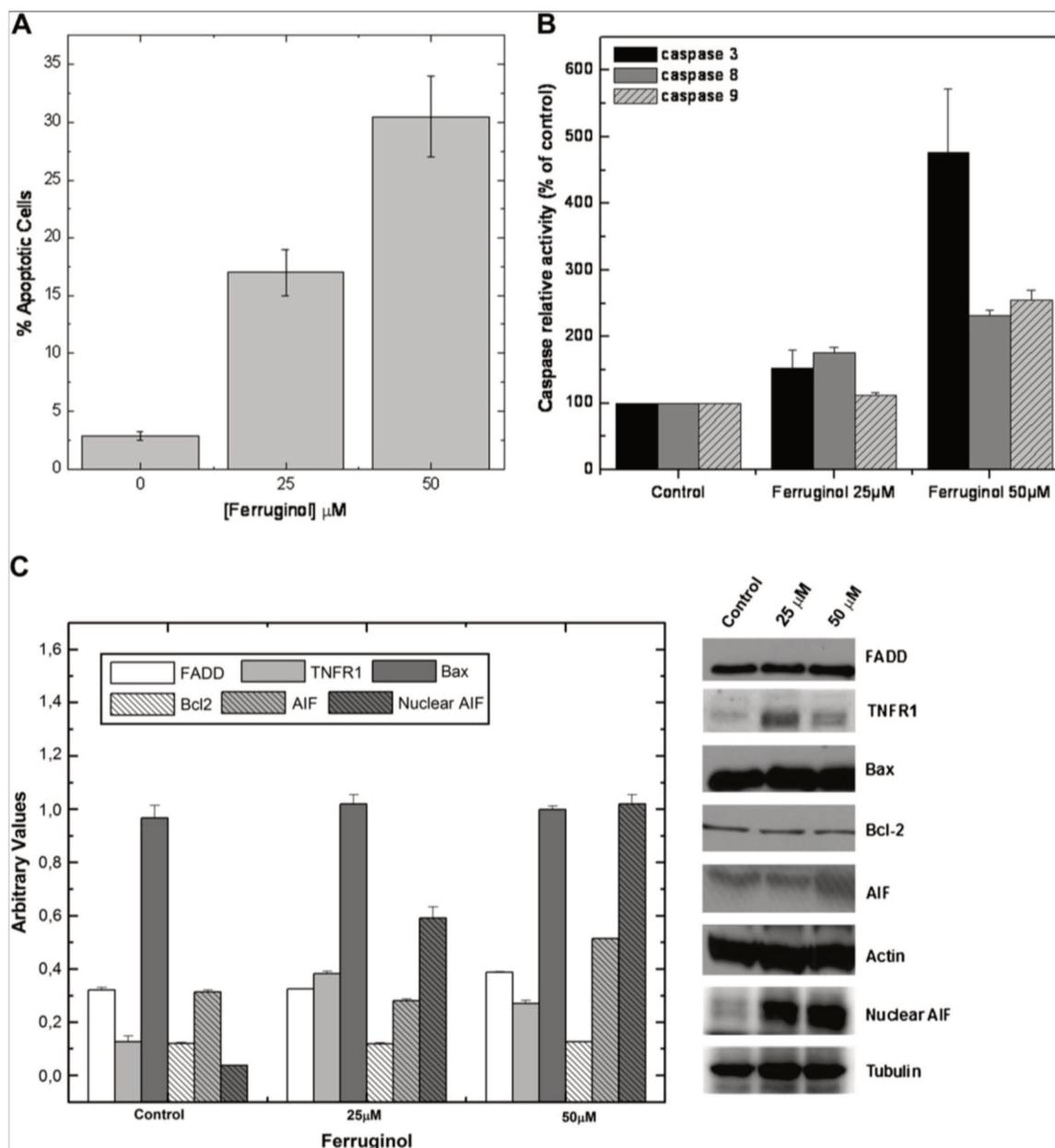


Fig. 2. Apoptosis induction of PC3 cells by ferruginol. (A) Cell samples were prepared as described in Section 2 and Annexin V-positive, 7-AAD-positive and Annexin V/7-AAD-positive populations were analyzed by flow cytometry. (B) Caspases 3, 8 and 9 activities were determined by using colorimetric assay. (C) The expression of pro- and anti-apoptotic proteins was determined by Western blot analysis. Soluble lysates were matched for protein content and analyzed on Western blot and immunoblots were probed with actin antibody to ensure equal loading. Nuclear translocation of AIF was also determined.

3.4. Inhibition of cell cycle progression by ferruginol

By plotting the ratio of the cells in G_0 plus G_1 against cells in G_2/M plus S-phase it is apparent that PC3 cells undergo G_0/G_1 -phase cell cycle arrest after ferruginol treatment (Fig. 4A). Approximately 2.5-fold of the PC3 population was at phase G_0/G_1 after exposure to ferruginol for 24 h.

We therefore turned to characterize the effect of ferruginol

p21 was increased even at the lowest concentration of ferruginol. On the other hand, the phosphorylated Rb protein and the expression of PCNA were not affected. The level of phospho-cdc2, the key protein of the cell cycle progression from G_2 to M phase, remained unchanged. Ferruginol decreased the level of CDK4, CDK6, cyclin D1 and cyclin D3. This response directly mirrored the ability of ferruginol to induce cell cycle arrest in PC3 cells. We conclude that the combination of

4. RESULTADOS

848

M. Bispo de Jesus et al. / Biochimie 90 (2008) 843–854

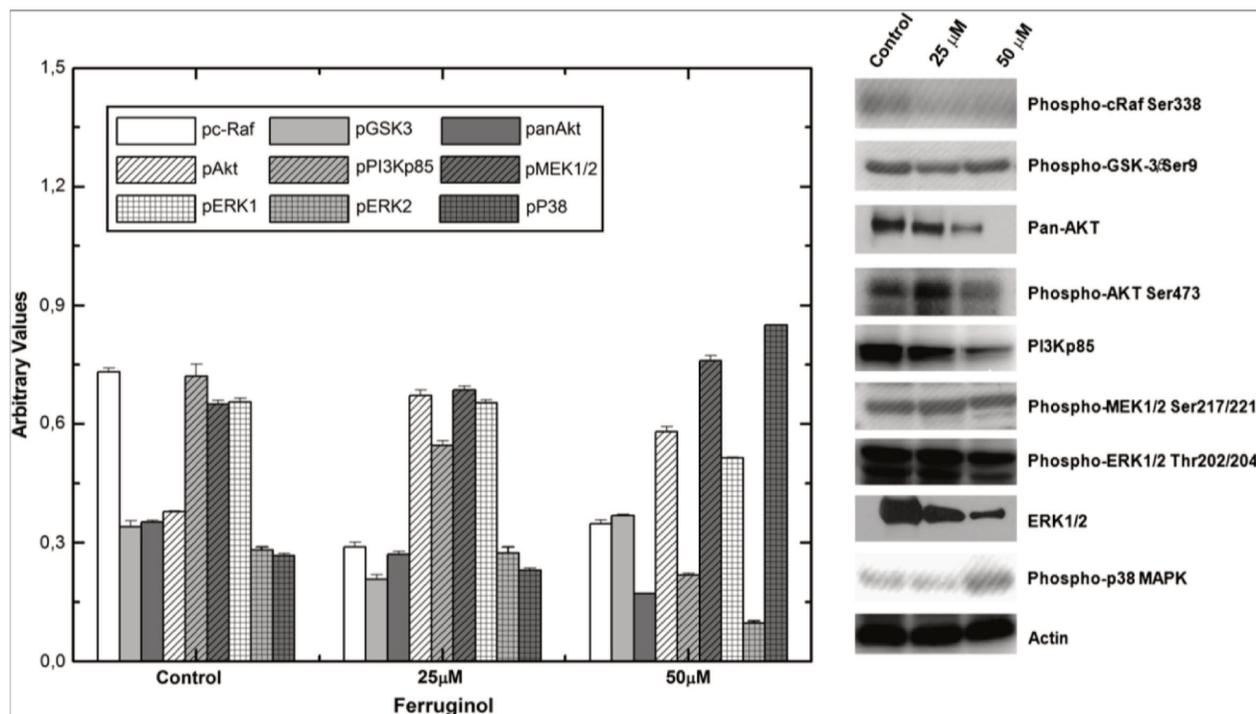


Fig. 3. Effect of ferruginol treatment on the function of key mediators involved in the PC3 cells proliferation/survival. Cells were treated with specified concentrations of ferruginol for 24 h and the expression or phosphorylation of the proteins determined by Western blot. Equal loading was confirmed by reprobing them for β -actin.

3.5. Ferruginol causes downregulation of $IKK\alpha$ and hypophosphorylation of STATs

The immunoblot analysis data showed that the expression of $IKK\alpha$ was significantly decreased after treatment with ferruginol; however, the total level of $NF\kappa B$ remained unchanged (Fig. 5). In addition, ferruginol caused a decrease of this transcription factor into the nucleus.

The phosphorylation status of STAT 3 and 5, key signaling molecules for many cytokines and growth-factor receptor response, was also evaluated by Western blot. The treatment of PC3 with 50 μM ferruginol was able to decrease the phosphorylation levels of STAT3 (Tyr705) and STAT5 (Tyr694). Interestingly, 50 μM ferruginol caused a strong decline in Hsp27 expression, which can be associated with the increase in the number of apoptotic cells.

3.6. Redox status on PC3 cells treated with ferruginol

Based on the diterpene chemical properties, which can lead to antioxidant and/or oxidant action depending on its concentration, and the importance of reducing equivalents for PC3 cells survival [23], we investigated the effect of ferruginol on PC3 cell GSH metabolism. PC3 cells treated with ferruginol displayed a more oxidizing environment as defined by a decrease of GSH and an increase of GSSG levels (Fig. 6). Both effects were dose dependent and the highest concentration of ferrugi-

ratio remained almost in equilibrium (GSH:GSSG = 4.4, 2.7 and 1.1 at 0, 25 and 50 μM ferruginol, respectively).

3.7. Low molecular weight protein tyrosine phosphatase is modulated by ferruginol

Besides the fact that protein tyrosine phosphatases are highly sensitive to cell redox status, there is some evidence that this class of phosphatases can contribute to tumor cell progression and aggressiveness. Especially LMWPTP has been recognized as a positive regulator of tumor growth [24]. Therefore, to address the possible modulation of LMWPTP by ferruginol, we examined the LMWPTP activity as well as expression. LMWPTP immunoprecipitated from PC3 cells was inhibited around 30% by 50 μM ferruginol (Fig. 7). On the other hand, when the LMWPTP activity was checked after treating the cells for 24 h, this enzyme displayed only 20% of residual activity. Reduced LMWPTP activity is consistent with the change in redox status in response to ferruginol. In addition, treated cells demonstrated downregulation of LMWPTP expression.

4. Discussion

Prostate cancer is commonly malignant and it is the second leading cause of cancer-related deaths (after lung cancer) of males in Brazil, with a similar trend in many Western coun-

4. RESULTADOS

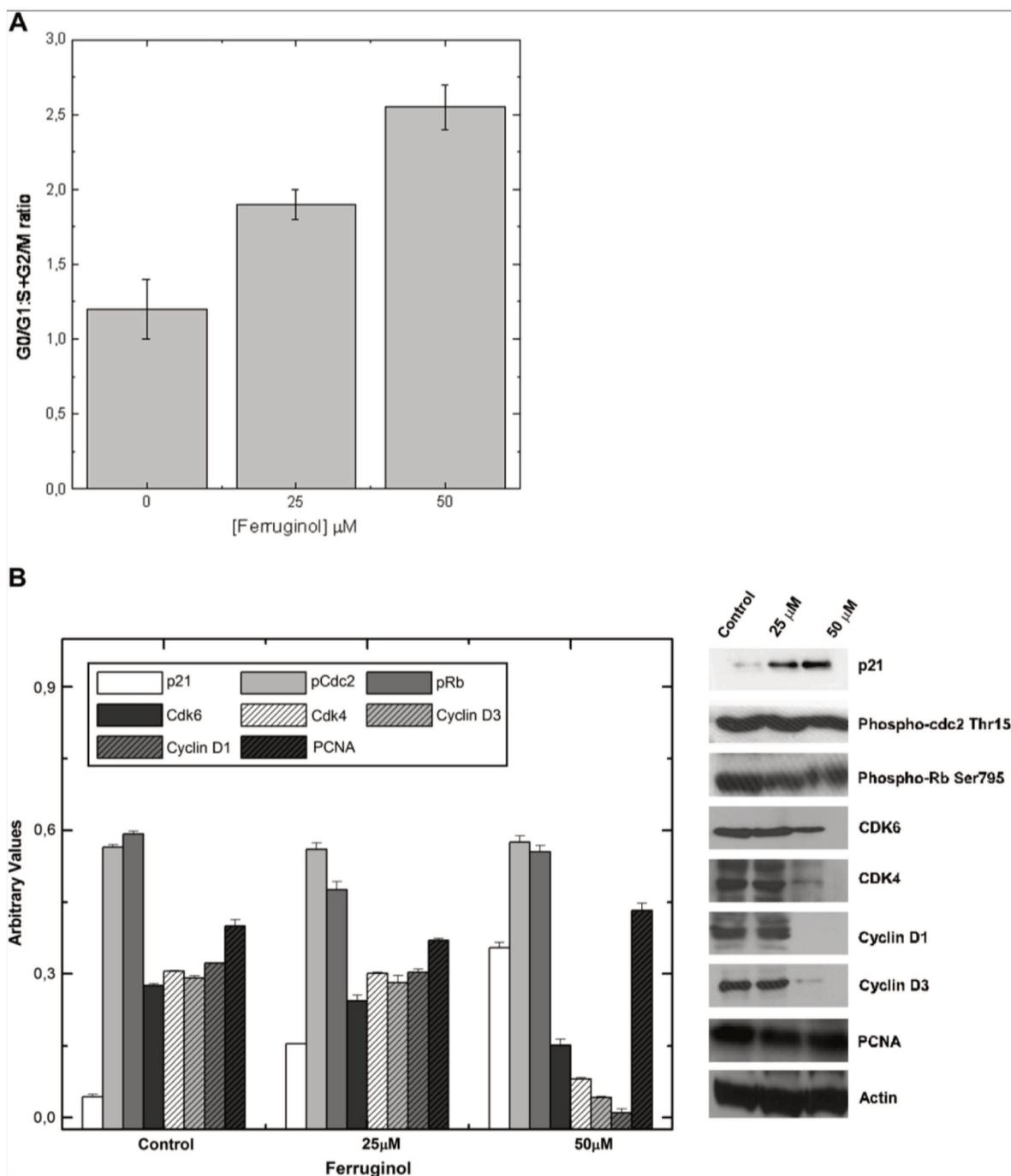


Fig. 4. Ferruginol impedes prostate cancer cell proliferation by targeting key cell cycle mediators. After treating PC3 cells with ferruginol for 24 h, cells were harvested, stained with PI and analyzed by flow cytometry (A) or lysed for Western blotting analysis (B). The number of cells in each phase of the profile and ratios of cells in resting phase (G0/G1) versus those undergoing mitosis (S, G2/M) was determined. The expression or phosphorylation of the proteins was determined by Western blot. Equal loading was confirmed by reprobing them for β -actin.

and because of the increasing life expectancy, its incidence is expected to further rise in the years to come [25]. Chemoprevention and intervention strategies using anticancer agents are considered as promising therapeutic options. The search for

great interest in phytochemicals with potential activity in this respect [26]. Suppression of tumorigenesis often involves modulation of signal transduction pathways, leading to alterations in gene expression, cell cycle progression or apoptosis.

4. RESULTADOS

850

M. Bispo de Jesus et al. / Biochimie 90 (2008) 843–854

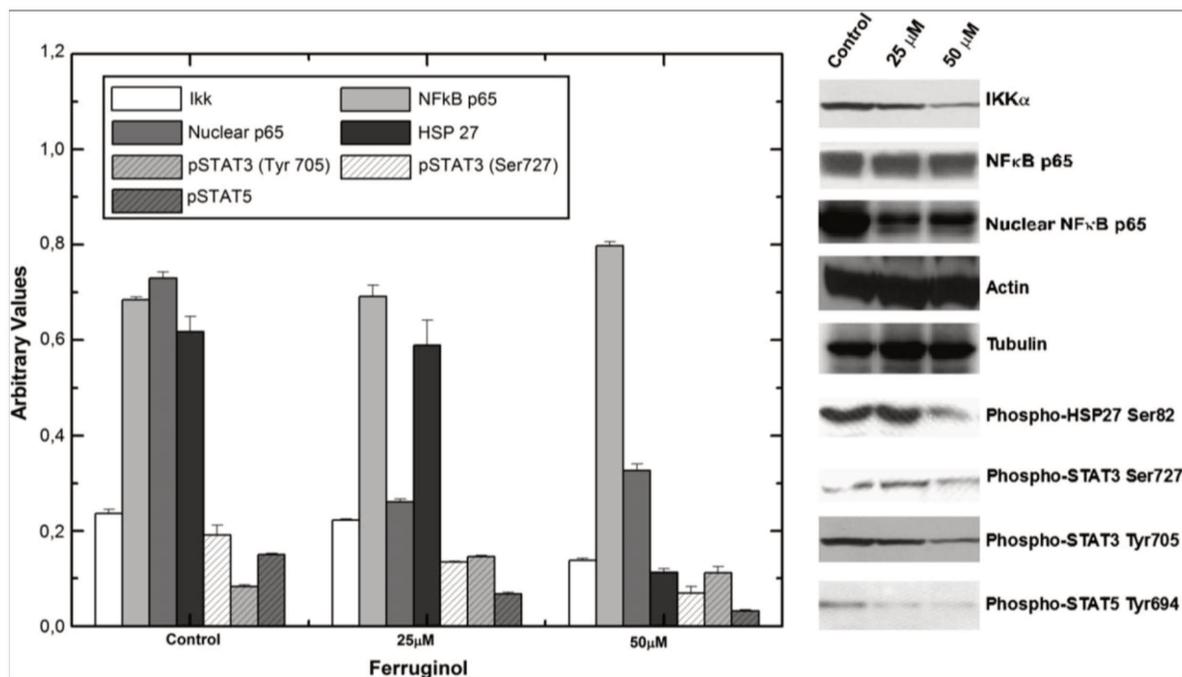


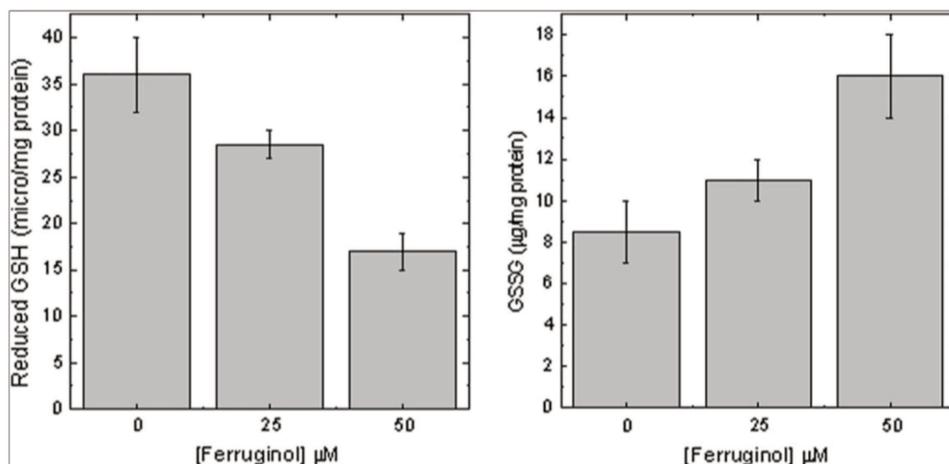
Fig. 5. Ferruginol modulates molecules that play a crucial role in the prostate cancer aggressiveness. Cells were treated with specified concentrations of ferruginol for 24 h, harvested and total cell lysates were prepared. The expression of IκB kinase, cytosolic and nuclear NFκB, and phosphorylation status of Hsp27 and STAT 3 and 5 were determined by Western blot analysis. Equal loading was probed with actin antibody to ensure equal loading.

elimination of cancer cells [27] and as a consequence targeting signaling elements controlling apoptosis may open novel therapeutic avenues [28,29]. Several plant-derived bioactive agents may have such action, at least as judged from model systems [4,9,30–33]; the present study may add ferruginol to this growing list.

Our results suggest that ferruginol is a negative regulator of cancer cell proliferation. Androgen-independent human prostate cancer cells (PC3 cells) a model that exhibits extreme therapy resistance exhibited, upon treatment with this phytochemical, remarkable induction of apoptosis via extrinsic

and intrinsic pathways, as demonstrated by the observation of overexpression of TNFR1 and activation of caspases 8, 9 and 3. The extrinsic pathway for cell death involves plasma membrane death receptors [34]. These receptors trimerize and recruit the adaptor molecule FADD which, in turn, activates caspase 8 and also leads to the activation of downstream execution caspases [35–38]. In both pathways, activation of effector caspases leads to a series of morphological changes that are characteristic for apoptosis [28].

Ferruginol-induced apoptosis and cell growth inhibition were also accompanied by an increase of apoptosis-inducing



4. RESULTADOS

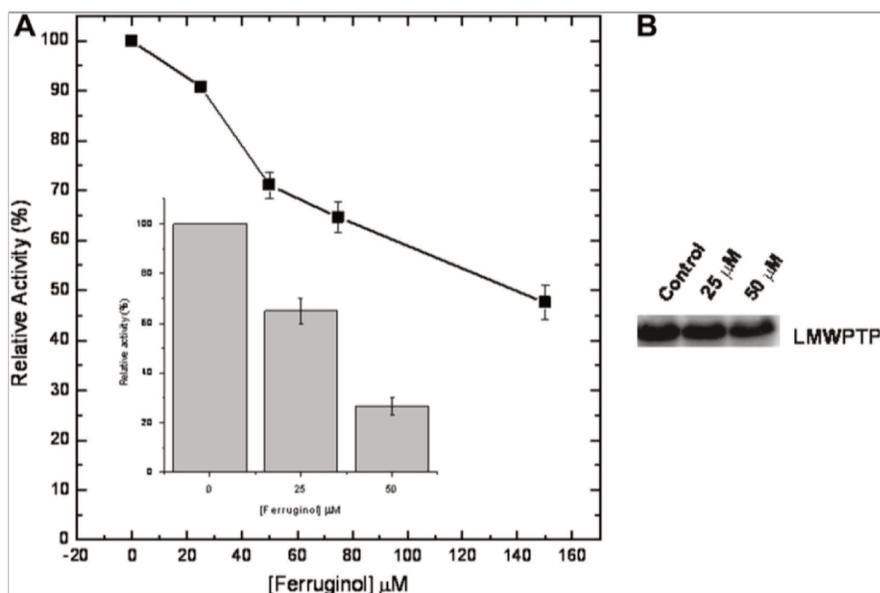


Fig. 7. Ferruginol affects low molecular weight protein phosphatase activity and expression. (A) The effect of ferruginol was examined directly in the LMWPTP immunoprecipitated from non-treated PC3 cells and also after PC3 treatment with ferruginol (inset plot). The LMWPTP specific activity was used to determine the relative activity. (B) Expression of LMWPTP was checked by Western blotting.

factor (AIF) expression and maintenance of Bax and Bcl-2 levels. AIF was identified as a mitochondrial intermembrane space protein, which is released from mitochondria and translocated to the nucleus, in response to apoptotic stimuli, and participates in peripheral chromatin condensation and the exposure of phosphatidylserine in the outer leaf of the plasma membrane. Increasing evidence supports the notion that AIF plays an important role in caspase-independent apoptosis [39,40].

Ferruginol, even at lower concentration, caused inhibition of Ras/PI3K cascade and suppression of downstream mitogenic targets such as cyclin D1. Additionally, this diterpene also induced activation of MAPK p38. The phosphatase and tensin homologue (PTEN) gene is deleted in PC3 cells. This phosphatase is defined as a tumor suppressor, since it is the major negative modulator of AKT protein, an important mediator of cell survival. It is therefore important to identify agents that can overcome the therapeutic resistant properties of PTEN deficient tumor cells. Importantly, in accordance with cell survival diminishing, ferruginol caused cell cycle arrest. Eukaryotic cell cycle progression is regulated by sequential activation and subsequent inactivation of a series of CDKs at different phases [41]. Ferruginol caused an overexpression of protein p21 a member of the cyclin-dependent kinase inhibitors, and downward expression of cyclin D1, cyclin D3, CDK4 and CDK6. These data showed the involvement of p21 in ferruginol-induced G₁ phase arrest, through binding to and subsequently inhibiting the cyclin-CDK activity. The active complex of cyclin D/CDK4 targets the Rb protein for phosphorylation, allowing the release of E2F transcription factors that activate G₁/S-phase gene expression. Importantly cdc-2,

modulation by various plant-derived agents are gaining widespread attention in recent years. A large number of phytochemicals has been shown to inhibit cell cycle progression of various cancer cells [42].

Ferruginol decreased the phosphorylation level of STAT3, STAT5 and Hsp27. STATs are latent cytoplasmic transcription factors consisting of seven mammalian members. They become phosphorylated on Tyr residues upon activation, a post-translational modification that is critical for dimerization, nuclear import, DNA binding, and transcriptional activation [43]. The activation of STATs is mediated by the action of an upstream Janus kinase (JAK), usually JAK1 or JAK2, showing that the JAK cascade might itself be a target for therapy in prostate cancer. Ahoen and coworkers [44] demonstrated that STAT5 is activated in a significant number of human prostate cancer specimens. Additionally, these authors also reported induction of apoptosis via caspases 9 and 3 activation dependent on inhibition of STAT5 phosphorylation. Activated STAT3 was reported in many types of malignancies, such as myeloma, head and neck cancer, breast cancer, and prostate cancer [45]. Recently, it has been demonstrated that inhibition of STAT3 in tumors impeded vascular endothelial growth factor production [46]. Data from the literature have identified Hsp27 as a modulator of STAT3-regulated apoptosis after androgen ablation. Hsp27 is a 27 kDa protein of which expression is seen to be correlated with an increase of survival in response to a wide variety of physiological and environmental insults including heat, reactive oxygen species and anticancer drugs. Indeed analysis by co-immunoprecipitation and immunofluorescence confirmed that Hsp27 is able to interact with STAT3 and that STAT3 levels correlate directly

4. RESULTADOS

852

M. Bispo de Jesus et al. / Biochimie 90 (2008) 843–854

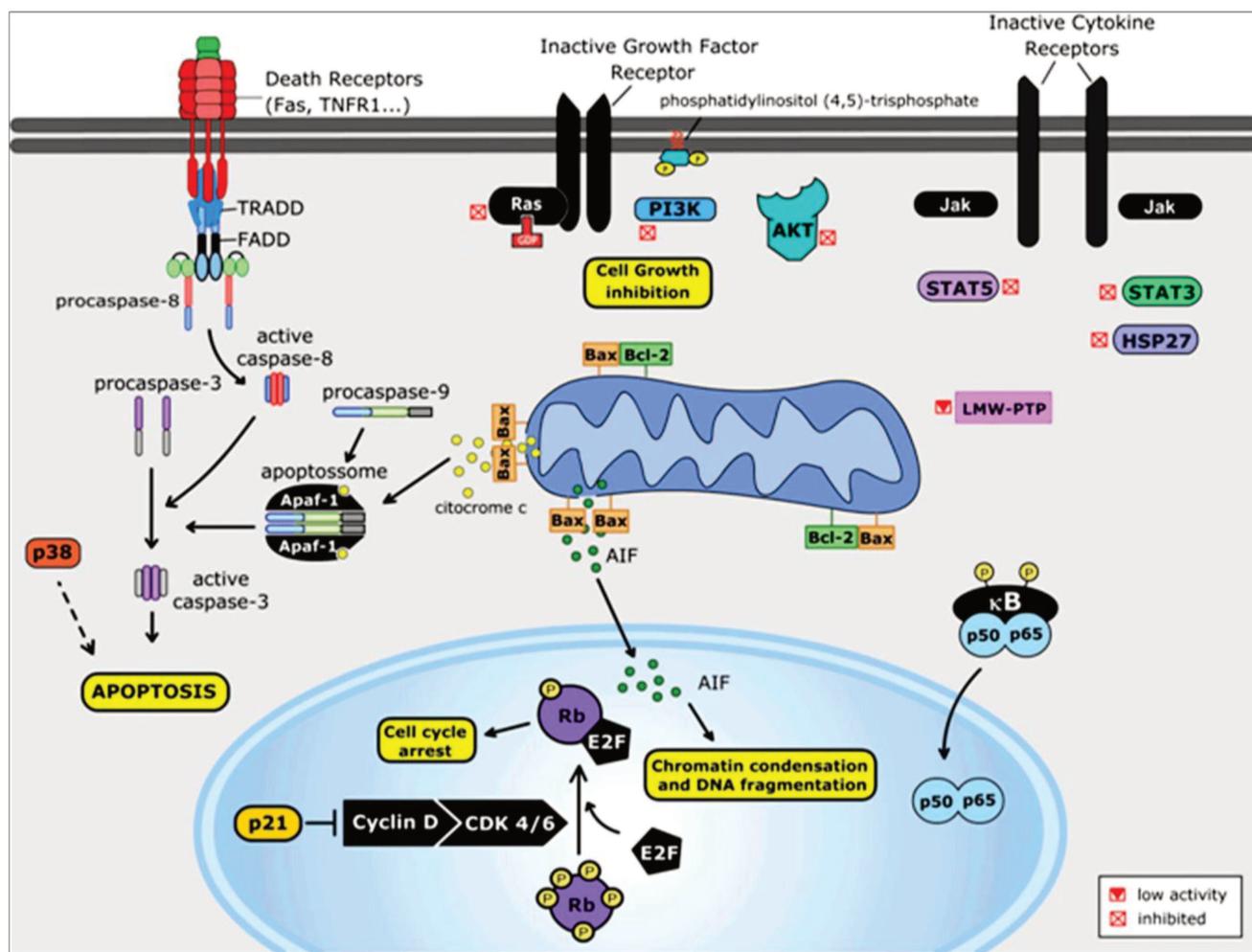


Fig. 8. Schematic representation of the molecular mechanism of ferruginol-induced PC3 cell death. Data presented in this report revealed that ferruginol exhibits multi-activities, which culminate with apoptosis induction of prostate cancer. Ferruginol caused inhibition of two important signaling cascade pathways involved in the cell survival/proliferation (Ras/PI3K and Jak/STAT). Additionally treated prostate cancer cells displayed a decrease in the phosphorylated form of Hsp27. Ferruginol-induced apoptosis was accompanied by activation of caspase 3, an increase of AIF expression and maintenance of Bax and Bcl-2 levels. AIF is released from mitochondria and translocated to the nucleus, and participates in peripheral chromatin condensation. In accordance with cell survival diminishing, ferruginol caused cell cycle arrest. Ferruginol caused an overexpression of protein p21 (a member of the cyclin-dependent kinase inhibitors), and downward expression of cyclin D1, cyclin D3, CDK4 and CDK6, which indicates cell cycle arrest at G_0/G_1 . Importantly, LMWPTP was directly and indirectly modulated by ferruginol, which indicates that this enzyme can be a target for this natural compound.

after androgen ablation and that this protein is highly expressed in androgen-independent tumors, and inhibition of Hsp27 in prostate cancer cells can increase the number of apoptotic cells (G_0-G_1), an event that seems to be associated with the decrease in the STAT3 levels [47]. These findings indicate that the anti-apoptotic effects of Hsp27 are associated with its ability to interact and stabilize the STAT3 molecule, leading to more resistant prostate cancer cells. In accordance with this notion, our results show a decrease in the phosphorylated forms of Hsp27 and STAT3, when PC3 cells were treated with ferruginol at the concentration of 50 μM , suggesting that the pro-apoptotic and anti-proliferative actions of ferruginol might be associated with diminished function of STAT3 through the decrease of Hsp27 levels.

agreement with the findings of Rodriguez and coworkers [17] related to the anti-inflammatory effect of ferruginol.

Recently, Chaiswing and collaborators [23] reported in a very well designed paper the effect of cellular redox state on prostate cancer cell growth *in vitro*. These authors demonstrated that during PC3 cells growth, these cells require higher ratio of reduced glutathione (GSH)/glutathione disulfide (GSSG). Based on this observation, we evaluated the redox status toward PC3 cell treatment with ferruginol. This diterpene caused a decrease of GSH and increase of GSSG, indicating a dominant effect in favor of oxidizing equivalent. Several signaling mediators can be modulated by redox modifiers, including protein tyrosine phosphatases [48,49]. To investigate the effect of ferruginol on PTPs we chose LMWPTP. The ra-

and (b) Chiarugi and collaborators [24] have reported the importance of this enzyme for cancer cell growth. Interestingly, we observed a direct effect of ferruginol on LMWPTP but also there was a correlation between cellular oxidizing equivalents and inhibition of this enzyme. The oxidation of catalytic site cysteine of PTPs, such as LMWPTP, leads to the transformation of the sulfhydrylic residue in sulfenic acid and the consequent inactivation of the enzyme due to its inability to form cysteinyl-phosphate intermediate during the first step of the catalysis [48]. Altogether, our results demonstrate that ferruginol can act as a chemical and genetic modulator of LMWPTP. These data indicate that at least in part, the anti-proliferative action of ferruginol is dependent on changing cellular redox, which is in agreement with the protective effect of GSH. This observation also confirms the importance of reducing equivalents for PC3 cell survival, as recently reported [23]. Further experiments to clarify the role of LMWPTP on prostate cancer progression are currently in progress in our laboratory.

5. Conclusion

One of the challenges of cancer therapy is to combine efficacy with few side effects and consequently improve the quality of life of the patient. Prostate cancer represents a spectrum of diseases in which the cost of cure may be substantial, with short- and long-term side effects. Therefore, new agents are needed to extend survival, improve cure rates, and avoid undesired treatment-related toxicities. In this scenario, there are at least two aims: (a) to provide therapeutic agents with a very specific target and (b) to discover agents which present differential action mechanisms in comparison with the traditional chemotherapy. In this context, ferruginol appears as an interesting bioactive compound, since it exhibits multi-activities in the signal transduction/biochemical aspects in prostate cancer cells. In summary, ferruginol negatively modulates signaling cascades, which are known to be defective in some types of prostate cancers, namely Ras/PI3K and Jak/STAT, as well as cell cycle regulators (Fig. 8). Importantly, we demonstrated for the first time that LMWPTP is directly and indirectly modulated by ferruginol, which indicates that this enzyme can be a target for this natural compound. Besides affecting signal transduction triggered by TNFR1, ferruginol also affected mitochondria permeability as demonstrated by the presence of nuclear AIF (protein involved with chromatin condensation and DNA fragmentation); however, the Bax:Bcl2 ratio remained unchanged. In general, this study provides an overview of biochemical aspects which were affected by ferruginol and in turn confirms its anti-tumor activity. This type of investigation can contribute to the development of “smart” drugs.

Acknowledgments

Financial support by FONDECYT (Grant No. 1060841) and the Programa de Productos Bioactivos, University of Talca is gratefully acknowledged. C.A. thanks the Universidad de

support by the Brazilian Agencies: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico and Fundo de Apoio ao Ensino, à Pesquisa e à Extensão.

References

- [1] J. Moul, Report from Durham, Prostate Cancer Prostatic Dis. 8 (2005) 1.
- [2] N. Dawson, New molecular targets in advanced prostate cancer, Expert Rev. Anticancer Ther. 6 (2006) 993–1002.
- [3] M.A. Miranda, A.K. Okamoto, C.V. Ferreira, T.L. Silva, J.M. Granjeiro, H. Aoyama, Differential effects of flavonoids on bovine kidney low molecular mass protein tyrosine phosphatase, J. Enzyme Inhib. Med. Chem. 21 (2006) 419–425.
- [4] A.G. Freire, P.S. Melo, M. Haun, N. Duran, H. Aoyama, C.V. Ferreira, Cytotoxic effect of the diterpene lactone dehydrocrotonin from *Croton cajucara* on human promyelocytic leukaemia cells, Planta Med. 69 (2003) 67–69.
- [5] C.V. Ferreira, C.L. Bos, H.H. Versteeg, G.Z. Justo, N. Duran, M.P. Peppelenbosch, Molecular mechanism of violacein-mediated human leukemia cell death, Blood 104 (2004) 1459–1464.
- [6] A.D. Martins Cavagis, C.V. Ferreira, H.H. Versteeg, C.F. Assis, C.L. Bos, S.A. Bleuming, S.H. Diks, H. Aoyama, M.P. Peppelenbosch, Tetrahydroxyquinone induces apoptosis of leukemia cells through diminished survival signaling, Exp. Hematol. 34 (2006) 188–196.
- [7] L.L. Kodach, C.L. Bos, N. Durán, M.P. Peppelenbosch, C.V. Ferreira, J.C. Hardwick, Violacein synergistically increases 5-fluorouracil cytotoxicity, induces apoptosis and inhibits Akt-mediated signal transduction in human colorectal cancer cells, Carcinogenesis 27 (2006) 508–516.
- [8] A.C.S. de Souza, L. Kodach, F.R. Gadelha, C.L. Bos, A.D. Cavagis, H. Aoyama, M.P. Peppelenbosch, C.V. Ferreira, A promising action of riboflavin as a mediator of leukaemia cell death, Apoptosis 11 (2006) 1761–1771.
- [9] R.R.R. Sousa, A.C.S. Souza, K.C. Queiroz, M.P. Peppelenbosch, C.V. Ferreira, H. Aoyama, Phosphoprotein levels, MAPK activities and NFkB expression are affected by fisetin, J. Enzyme Inhib. Med. Chem. 22 (2007) 439–444.
- [10] K.C. de Souza Queiroz, W.F. Zambuzzi, A.C. Santos de Souza, R.A. da Silva, D. Machado, G.Z. Justo, H.F. Carvalho, M.P. Peppelenbosch, C.V. Ferreira, A possible anti-proliferative and anti-metastatic effect of irradiated riboflavin in solid tumours, Cancer Lett. 258 (2007) 126–134.
- [11] M. Iwamoto, T. Minami, H. Tokuda, H. Ohtsu, R. Tanaka, Potential antitumor promoting diterpenoids from the stem bark of *Thuja standishii*, Planta Med. 69 (2003) 69–72.
- [12] J. Becerra, C. Flores, J. Mena, P. Aqueveque, J. Alarcón, M. Bittner, V. Hernández, M. Hoeneisen, E. Ruiz, M. Silva, Antifungal and antibacterial activity of diterpenes isolated from wood extractables of Chilean Podocarpaceae, Boletín de la Sociedad Chilena de Química 47 (2002) 151–157.
- [13] S. Chang, P. Chen, S. Wang, H. Wu, Antimite activity of essential oils and their constituents from Taiwan cryptomerioides, J. Med. Entomol. 38 (2001) 455–457.
- [14] A. Ulubelen, H. Birman, S. Oksuz, G. Topcu, U. Kolak, A. Barla, W. Voelter, Cardioactive diterpenes from the roots of *Salvia eriophora*, Planta Med. 68 (2002) 818–821.
- [15] M. Ono, M. Yamamoto, C. Masuoka, Y. Ito, M. Yamashita, T. Nohara, Diterpenes from the fruits of *Vitex rotundifolia*, J. Nat. Prod. 62 (1999) 1532–1537.
- [16] C. Clarkson, W.E. Campbell, P. Smith, In vitro antiplasmodial activity of abietane and tatarane diterpenes isolated from *Harpagophytum procumbens* (devil's claw), Planta Med. 69 (2003) 720–724.
- [17] J.A. Rodriguez, C. Theoduloz, T. Yanez, J. Becerra, G. Schmeda-Hirschmann, Gastroprotective and ulcer healing effect of ferruginol in mice and rats: assessment of its mechanism of action using in vitro models. Life

4. RESULTADOS

- [18] C. Areche, J.A. Rodríguez, I. Razmilic, T. Yáñez, C. Theoduloz, G. Schmida-Hirschmann, Gastroprotective and cytotoxic effect of semi-synthetic ferruginol derivatives, *J. Pharm. Pharmacol.* 59 (2007) 289–300.
- [19] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay, *J. Immunol. Methods* 65 (1983) 55–63.
- [20] F. Denizot, R. Lang, Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability, *J. Immunol. Methods* 89 (1986) 71–77.
- [21] E.F. Hartree, Determination of proteins: a modification of Lowry method that give a linear photometric response, *Anal. Biochem.* 48 (1972) 422–427.
- [22] N. Li, T.D. Oberley, Modulation of antioxidant enzymes, reactive oxygen species, and glutathione levels in manganese superoxide dismutase-over-expressing NIH/3T3 fibroblasts during the cell cycle, *J. Cell Physiol.* 177 (1998) 148–160.
- [23] L. Chaiswing, J.M. Bourdeau-Heller, W. Zhong, T.D. Oberley, Characterization of redox state of two human prostate carcinoma cell lines with different degrees of aggressiveness, *Free Radic. Biol. Med.* 43 (2007) 202–215.
- [24] P. Chiarugi, M.L. Taddei, N. Schiavone, L. Papucci, E. Giannoni, T. Fiaschi, S. Capaccioli, G. Raugei, G. Ramponi, LMW-PTP is a positive regulator of tumor onset and growth, *Oncogene* 23 (2004) 3905–3914.
- [25] A. Jemal, R.C. Tiwari, T. Murray, A. Ghafoor, A. Samuels, E. Ward, E.J. Feuer, M.J. Thun, American Cancer Society Cancer statistics, *Cancer J. Clin.* 54 (2004) 8–29.
- [26] A.S. Tsao, E.S. Kim, W.K. Hong, Chemoprevention of cancer, *CA Cancer J. Clin.* 54 (2004) 150–180.
- [27] R.P. Singh, S. Dhanakakshmi, R. Agarwal, Phytochemicals as cell cycle modulators: a less toxic approach in halting human cancer, *Cell Cycle* 1 (2002) 156–161.
- [28] W. Hu, J.J. Kavanagh, Anticancer therapy targeting the apoptotic pathway, *Lancet Oncol.* 4 (2003) 721–729.
- [29] S. Fulda, K.M. Debatin, Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy, *Oncogene* 25 (2006) 4798–4811.
- [30] M. D-Huang, J.-H. Guh, Y.-T. Huang, S.-C. Chueh, P.-C. Chian, C.-M. Teng, Induction of mitotic arrest and apoptosis in human prostate cancer pc-3 cells by evodiamine, *J. Urol.* 173 (2005) 256–261.
- [31] G.Z. Justo, C.V. Ferreira, Coagulation and cancer therapy: the potential of natural compounds, *Curr. Genomics.* 6 (2005) 461–469.
- [32] J.C. Hsu, A. Dev, A. Wing, C.T. Brew, L.F. Bjeldanes, G.L. Firestone, Indole-3-carbinol mediated cell cycle arrest of LnCap human prostate cancer cells requires the induced production of activated p53 tumor suppressor protein, *Biochem. Pharmacol.* 72 (2006) 1714–1723.
- [33] L. Gapter, Z. Wang, J. Glinski, K.-Y. Ng, Induction of apoptosis in prostate cancer cells by pachymic acid from *Poria cocos*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 332 (2005) 1153–1161.
- [34] E. Solary, N. Droin, O. Sordet, Cell death pathways as targets for anticancer drugs, in: B.C. Baguley, D.J. Kerr (Eds.), *Anticancer Drug Development*, Academic Press, San Diego 2002, pp. 55–76.
- [35] N. Thornberry, Y. Lazebnik, Caspases: enemies within, *Science* 281 (1998) 1312–1316.
- [36] A. Ashkenazi, V.M. Dixit, Death receptors: signaling and modulation, *Science* 281 (1998) 1305–1308.
- [37] A.M. Chinnaiyan, K. O'Rourke, M. Tewari, V.M. Dixit, FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis, *Cell* 81 (1995) 505–512.
- [38] M.E. Peter, P.H. Kramer, Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis, *Curr. Opin. Immunol.* 10 (1998) 545–551.
- [39] C. Pepper, T. Hoy, D.P. Bently, Bcl-2/Bax ratios in chronic lymphocytic leukaemia and their correlation with in vitro apoptosis and clinical resistance, *Br. J. Cancer* 76 (1997) 935–938.
- [40] C. Cande, I. Cohen, E. Daugas, L. Ravagnan, N. Larochette, N. Zamzami, G. Kroemer, Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria, *Biochimie.* 84 (2002) 215–222.
- [41] C.J. Sherr, G1 phase progression: Cycling on cue, *Cell* 79 (1994) 551–555.
- [42] J.-M. Yun, M.-H. Kweon, H. Kwon, J.-K. Hwang, H. Mukhtar, Induction of apoptosis and cell cycle arrest by a chalcone panduratin A isolated from *Kaempferia pandurata* in androgen-independent human prostate cancer cells PC3 and DU145, *Carcinogenesis* 27 (2006) 1454–1464.
- [43] C.P. Lim, X. Cao, Structure, function, and regulation of STAT proteins, *Mol. Biosyst.* 2 (2006) 536–550.
- [44] T.J. Ahonen, J. Xie, M.J. LeBaron, J. Zhu, M. Nurmi, K. Alanen, H. Rui, M.T. Nevalainen, Inhibition of transcription factor Stat5 induces cell death of human prostate cancer cells, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 27287–27292.
- [45] B.E. Barton, J.G. Karras, T.F. Murphy, A. Barton, H.F. Huang, Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) activation in prostate cancer: Direct STAT3 inhibition induces apoptosis in prostate cancer lines, *Mol. Cancer Ther.* 3 (2004) 11–20.
- [46] G. Niu, K.L. Wright, M. Huang, L. Song, E. Haura, J. Turkson, S. Zhang, T. Wang, D. Sinibaldi, D. Coppola, R. Heller, L.M. Ellis, J. Karras, J. Bromberg, D. Pardoll, R. Jove, H. Yu, Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis, *Oncogene* 21 (2002) 2000–2008.
- [47] P. Rocchi, E. Beraldi, S. Ettinger, L. Fazli, R.L. Vessella, C. Nelson, M. Gleave, Increased Hsp27 after androgen ablation facilitates androgen-independent progression in prostate cancer via signal transducers and activators of transcription 3-mediated suppression of apoptosis, *Cancer Res.* 65 (2005) 11083–11093.
- [48] J. den Hertog, A. Groen, T. van der Wijk, Redox regulation of protein-tyrosine phosphatases, *Arch. Biochem. Biophys.* 434 (2005) 11–15.
- [49] C.V. Ferreira, G.Z. Justo, A.C.S. Souza, K.C. Queiroz, W.F. Zambuzzi, H. Aoyama, M.P. Peppelenbosch, Natural compounds as a source of protein tyrosine phosphatase inhibitors: application to the rational design of small-molecule derivatives, *Biochimie* 88 (2006) 1859–1873.

5.

DISCUSSÃO GERAL

No presente trabalho, os flavonóides fisetina e apigenina e o diterpeno ferruginol foram avaliados quanto à potencialidade de ação antitumoral em linhagens de leucemia mielóide (HL60) e de câncer prostático humano (PC3). Visando o fornecimento de maiores detalhes sobre os mecanismos de ação molecular desses compostos, moléculas sinalizadoras envolvidas em vias de sobrevivência e morte celular foram avaliadas quanto à expressão e/ou atividade, após tratamento das células tumorais. Este tipo de estratégia de investigação pode ser útil para identificação de potenciais alvos terapêuticos, bem como predição de possíveis efeitos colaterais. Para este propósito, células HL60 foram tratadas com fisetina ou apigenina, por 24 horas, enquanto que células PC3 foram submetidas ao tratamento com ferruginol, pelo mesmo período de tempo.

Os flavonóides fisetina e apigenina mostraram ser efetivos indutores de morte na linhagem celular HL60, reduzindo pela metade o número de células viáveis quando utilizados na concentração de 30 μ M. Muitos trabalhos na literatura tem mostrado a ação citotóxica, sobre células tumorais, dos flavonóides fisetina (Chen et al., 2002; Lee et al., 2002, Kim et al., 2008) e apigenina (Birt et al., 1997; Wang, 2000; Caltagirone et al., 2000; Way et al., 2004; Shukla et al., 2005). Observou-se também que ambos os flavonóides eram capazes de induzir apoptose através da ativação de caspases (Wang et al., 1999).

5. DISCUSSÃO GERAL

Recentemente, Khan e colaboradores (2008) mostraram que a fisetina induzia apoptose de células de câncer de próstata através da ativação das caspases 3, 8 e 9. No entanto, o mecanismo molecular de ação destes flavonóides na atividade antitumoral tem sido pouco explorado.

Nossos resultados revelaram que a ação citotóxica da fisetina e apigenina está associada, em parte, a sua capacidade de alterar, direta ou indiretamente, as atividades de proteínas quinases e fosfatases. A fisetina mostrou-se um inibidor de fosfatases e/ou ativador de quinases, como evidenciado pelo aumento nos níveis de proteínas fosforiladas em tirosina e treonina. Em relação à apigenina, o perfil quinômico indicou diminuição significativa da fosforilação de 101 peptídeos dos 1024 peptídeos do chip sugerindo, portanto, inibição das quinases responsáveis por fosforilar tais peptídeos. É importante ressaltar que o efeito geral dos flavonóides em estudo sobre fosforilação de proteínas é o resultado de um balanço da atividade de quinases e fosfatases, podendo tanto ativar como inibir ambas enzimas.

Os flavonóides, frequentemente, são mostrados como inibidores de proteínas quinases (Graziani et al., 1983; Gschwendt et al., 1983; Srivastava, 1985). Lu e colaboradores (2005) demonstraram que a fisetina formava um complexo com a quinase CDK6, inibindo sua atividade. Sarno e colaboradores (2002) mostraram que a posição da hidroxila na estrutura do flavonóide alterava a capacidade de inibir a proteína quinase CK2. A fisetina mostrou-se o mais potente inibidor da CK2 ($IC_{50} = 0,35 \mu M$), seguida pela quercetina ($IC_{50} = 0,55 \mu M$). A única diferença entre os dois flavonóides é a hidroxila na posição 5 da quercetina. Ao remover as hidroxilas 3 e 3' da quercetina, formando a apigenina, o valor da IC_{50} de inibição da CK2 aumentou para $0,8 \mu M$. Removendo a hidroxila da posição 4' da apigenina, formando a crisina, a eficiência na inibição da CK2 diminuiu drasticamente ($IC_{50} = 9,0 \mu M$), sugerindo que o mínimo de 3 hidroxilas são requeridas para inibição enzimática da CK2.

De modo geral, o tratamento das células HL60 com os flavonóides inibiu a atividade de quinases responsáveis pela proliferação e sobrevivência celular, levando assim à morte celular. No caso da fisetina, observou-se um aumento da fosforilação e, portanto, ativação da JNK e p38. Por outro lado, detectou-se diminuição dos níveis de fosforilação da ERK. A família das MAPKs é conhecida pelo importante papel na regulação de diversos eventos fisiológicos, como proliferação, diferenciação e morte celular, o que,

5. DISCUSSÃO GERAL

consequentemente, torna os membros desta família de proteínas serina/treonina quinases potenciais alvos terapêuticos. Em leucemia, a via Raf/MEK/ERK pode ser ativada por mutações/amplificações de receptores de fatores de crescimento, além das mutações que levam à expressão da proteína Ras constitutivamente ativa. A superexpressão da proteína Ras tem sido observada em aproximadamente 30% dos cânceres humanos (Steelman et al., 2008). Entretanto, muitos estudos mostraram que mais de 50% dos pacientes com leucemia mielóide aguda e leucemia linfocítica aguda apresentavam ativação constitutiva da via Raf/MEK/ERK sem, no entanto, apresentar qualquer mutação genética (Ricciard et al., 2005; Kornblau et al., 2006). As células HL60 apresentam ERK constitutivamente ativa, evento importante para manutenção das vias de sobrevivência e proliferação, sendo importante alvo molecular para a indução de morte. Recentemente, alguns trabalhos têm sugerido que a via da ERK pode ser suprimida pelas quinases JNK e p38, durante o processo de apoptose (Junttila et al., 2008). Apesar da apigenina se mostrar inibidora de quinases, de forma interessante, ela foi capaz de ativar tanto a quinase JNK quanto a p38 pois a fosforilação essencial para a atividade dessas quinases apresentou-se aumentada nas células HL60 tratadas com apigenina, fato também observado por Vargo e colaboradores (2006) em outra linhagem de leucemia, THP-1.

Em relação às vias de sobrevivência celular PI3K/AKT e à via da JAK/STAT, observou-se que o tratamento das células com apigenina levava a uma regulação negativa dessas vias. A fosfatase PTEN, principal modulador negativo da via PI3K/AKT, apresentou-se mais ativa com o aumento da concentração de apigenina decorrente da diminuição da fosforilação do seu sítio inibitório (Ser380). Além disso, os iniciadores da via, as quinases PI3K, AKT e PDK foram inibidas na presença de apigenina. A via de sobrevivência da PI3K/AKT é iniciada através da ligação de um fator de crescimento ou citocina a um receptor na membrana plasmática com atividade tirosina quinase. Esse receptor, em seguida, sofre autofosforilação em resíduos de tirosina, sinal para o recrutamento e ativação da proteína PI3K. Uma vez ativa e localizada na membrana, a PI3K fosforila os lipídios fosfatidil inositol di-fosfato, levando à produção de fosfatidil inositol 3 - fosfato (PtdIns 3,4-P₂ – PtdIns 3,4,5-P₃). Esses lipídios especializados recrutam a proteína serina-treonina quinase AKT e PDK para a membrana plasmática. Assim, a PDK-1 torna-se ativa, sendo capaz, portanto, de fosforilar e ativar a AKT. Através da fosforilação de diversas proteínas, AKT é a proteína-chave na regulação de

5. DISCUSSÃO GERAL

importantes funções das células, como metabolismo de glicose, proliferação celular e sobrevivência (Paez and Sellers, 2002). Resumidamente, a AKT mantém ativas as proteínas responsáveis pela sobrevivência celular e inibe as proteínas pró-apoptóticas, como Bad, caspase 9 e “*forkhead*”. A PTEN é capaz de desfosforilar o PtdIns 3,4,5-P3 impedindo, portanto, que AKT e PDK sejam recrutadas e ativadas.

A proteína tirosina quinase Src, uma outra quinase importante para as vias de sobrevivência, foi completamente inibida nas células tratadas com apigenina, fato observado pela diminuição da fosforilação do resíduo Tyr416, essencial para a catálise. A Src é um dos ativadores da via JAK/STAT, responsável por fosforilar a proteína STAT promovendo, assim, sua translocação para o núcleo, onde exercerá seu papel de fator de transcrição.

Outro aspecto avaliado neste trabalho foi a influência da apigenina no ciclo celular. As células foram tratadas com apigenina 25, 50 e 100 μM . Apenas na concentração maior observou-se inibição do ciclo celular na fase G2/M. Recentemente, Choi e Kim (2008) observaram que células de câncer de mama tratadas com apigenina apresentavam interrupção do ciclo celular na fase G2/M, após 48h de tratamento com 50 e 100 μM de apigenina. Em câncer de pâncreas, o mesmo efeito foi observado por Ujiki e colaboradores (2006), enquanto que em células de câncer de próstata humano, LNCap e PC3, a apigenina causou parada do ciclo na fase G0/G1 (Shukla and Gupta, 2007).

Os efeitos neuroprotetores, cardioprotetores e quimiopreventivos da dieta rica em flavonóides estão bem documentados (Cao et al., 1997; Havsteen, 2002; William et al., 2004). Entretanto, muitos estudos mostraram que os flavonóides apresentam características pró-oxidantes *in vitro*, efeito que resulta na modulação de vias de sinalização (William et al., 2004). Uma grande variedade de compostos naturais induz apoptose, principalmente, em células tumorais, pelo aumento da produção de ROS mitocondrial, evento que desencadeia a permeabilização da membrana mitocondrial e liberação de citocromo c. Em células tumorais, como próstata (PC3), pulmão (A549) e leucemia (HL60), diversos flavonóides, inclusive apigenina, induzem a depleção de GSH (Kachadourian and Day, 2006). Depleção de GSH intracelular e produção de ROS podem resultar em inibição de proteína tirosina fosfatases (PTP) por oxidação de grupos tíóis. As atividades tanto de PTP quanto de proteínas tirosinas quinases (PTK) podem ser modificadas por oxidação de resíduos de cisteína através da ação de H_2O_2 . A inibição de

5. DISCUSSÃO GERAL

PTPs e ativação de PTK, provavelmente, leva a altos níveis de fosfoproteínas intracelulares, alterando vias de transdução de sinal. Neste trabalho, o tratamento das células HL60 por 24h não causou depleção de GSH. Apesar de não ter sido observada alteração do estado redox celular, detectou-se inibição de aproximadamente 50% da atividade da proteína tirosina fosfatase de baixa massa molecular (LMWPTP). Este resultado indica que a apigenina tem capacidade de interagir diretamente com a LMWPTP. Vargo e colaboradores (2006) observaram aumento de ROS apenas na primeira hora de tratamento das células THP-1 com apigenina; após 3 h não houve qualquer alteração nos níveis de ROS.

Em relação à fisetina, a avaliação da produção de ROS foi realizada indiretamente pela quantificação da atividade das enzimas aconitase, fumarase, catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase (MnSOD e CuZnSOD). A enzima aconitase, que participa do ciclo de Krebs convertendo citrato em isocitrato, é altamente sensível à oxidação, graças à presença de um cluster de ferro e enxofre no sítio ativo que reage diretamente com o substrato. Na presença de fisetina, a aconitase das células tratadas apresentou-se inibida 20 vezes, resultado que sugere a produção de ROS pela fisetina. Recentemente, Kawabara e colaboradores (2008) observaram que, em fibroblastos (V79), H₂O₂ levou à ativação de p38 MAPK, JNK e ERK. Contudo, a adição de inibidores de proteínas tirosinas quinases (PTK) bloqueou tais fosforilações, indicando que ROS leva à ativação de MAPK p38 e JNK através da ativação de PTKs e/ou inibição de PTPs, o que está de acordo com os nossos resultados referentes ao tratamento de células HL60 com fisetina. O fato de a fisetina inibir fosfatases citossólicas quando adicionada ao extrato celular indica que a capacidade desse composto de inibir fosfatases pode não somente ser mediada pela ação de ROS, mas também por interação direta.

Embora flavonóides sejam reconhecidos por agirem como importantes agentes antioxidantes, os resultados aqui apresentados revelam que a atividade anticarcinogênica desses compostos pode estar associada à indução de geração de ROS no ambiente celular. Os resultados obtidos reforçam a hipótese de que a ação celular da fisetina e apigenina, assim como de muitos outros flavonóides e seus metabólitos, pode estar associada à modulação direta ou indireta da atividade de proteínas quinases e fosfatases, tais como PI3K, PKB/AKT, tirosina quinases e MAPKs mostrando, portanto, o potencial

5. DISCUSSÃO GERAL

antileucêmico de tais compostos como reguladores da expressão gênica e moduladores de importantes vias de transdução de sinal.

Os resultados obtidos no presente trabalho reforçam dados da literatura que associam ROS ao aumento da expressão de NFκB e estimulação de sua atividade como agente pró-apoptótico (Kroemer et al., 1997; Dumont et al., 1999). Embora a maior parte dos trabalhos encontrados na literatura reporte a atividade indutora de sobrevivência e proliferação de NFκB, um número crescente de estudos tem associado a ação desse fator de transcrição como indutor de morte celular sob certas condições (Lin et al., 1995; Carter et al., 1996; Grimn et al., 1996; Grill and Memo, 1999; Lin et al., 1999).

Ferruginol suprime vias de sobrevivência em câncer de próstata independente de androgênio

O câncer de próstata é a segunda causa de morte relacionada ao câncer no Brasil e no mundo. Como o câncer de próstata atinge homens com mais de 50 anos, com o aumento da expectativa de vida, a incidência desse tipo de câncer tende a aumentar nos próximos anos. Logo, a busca de compostos preventivos e terapêuticos mais efetivos e com menos efeitos colaterais tem gerado grande interesse e, sob estes aspectos, os produtos naturais são altamente promissores.

O diterpeno ferruginol apresentou-se como um potente inibidor do crescimento celular e indutor de apoptose de células de câncer de próstata PC3, as quais exibem extrema resistência à terapias.

O aumento da expressão de TNFR1, em baixa dose de ferruginol (25 μM) e ativação de caspase 8 demonstraram, claramente, a ativação da via extrínica, em baixas concentrações de ferruginol. A via intrínica torna-se mais proeminente na indução de morte, em concentração mais alta de ferruginol (50 μM), mostrada pelo aumento da atividade da caspase 9, aumento dos níveis de AIF nuclear e aumento da expressão da proteína pró-apoptótica mitocondrial Bax. Em resposta a um certo estímulo apoptótico, proteínas pró-apoptóticas citossólicas e ligadas à membrana mitocondrial na forma de monômeros, como Bax e Bak, sofrem oligomerização formando poros que levam à permeabilização da membrana mitocondrial interna e liberação de proteínas, como

5. DISCUSSÃO GERAL

citocromo c e AIF. O citocromo c constituirá o complexo chamado apoptossomo, formado também pela caspase 9 e proteína Apaf-1, responsável pela ativação da caspase 3. O AIF liberado da mitocôndria transloca-se para o núcleo das células onde participará da condensação da cromatina e exposição de fosfaditil serina na camada externa da membrana plasmática.

Para uma célula entrar em apoptose, o equilíbrio entre eventos pró-apoptóticos e antiapoptóticos deve ser rompido através do aumento do estímulo apoptótico e/ou da inibição das vias de sobrevivência e proliferação. O ferruginol, além de ativar as vias de apoptose, consegue parar o ciclo celular e inibir vias de sobrevivência cruciais para o desenvolvimento do câncer.

O ferruginol mostrou-se eficiente na inibição de uma das principais vias de sobrevivência celular, a via da AKT. Este composto causou tanto a diminuição da expressão, quanto a diminuição da fosforilação (ativação) da AKT. Interessantemente, na concentração de 25 μM de ferruginol observou-se um aumento da quantidade de AKT fosforilada no resíduo serina 473; em contrapartida, na concentração de 50 μM , ocorreu diminuição. Como mencionado anteriormente, somente foi possível observar alterações metabólicas características da apoptose quando o ferruginol foi utilizado em concentrações maiores. Assim, sob baixas concentrações de ferruginol as células tendem a contornar os estímulos pró-apoptóticos através da ativação das proteínas de sobrevivência e proliferação celular. O mesmo se observa para a proteína MEK 1/2, cuja fosforilação nos resíduos de serina 217/221 teve um sutil aumento no tratamento com ferruginol. A via de sinalização da ERK, assim com a via da PI3K/AKT são responsáveis pela regulação de diversos eventos fisiológicos, como proliferação e diferenciação. MEK é ativador direto da ERK e como ferruginol levou à diminuição da expressão e fosforilação de ERK, seria possível que a célula “tentasse se recuperar” ativando a MEK.

Assim como a fisetina e apigenina, o ferruginol induziu a ativação da MAPK p38. O ferruginol também atuou sobre proteínas controladoras do ciclo celular. Diferentemente da apigenina, o ferruginol aumentou a expressão da proteína p21, um dos inibidores das quinases dependentes de ciclinas (CDKs). Observou-se também no trabalho uma diminuição da expressão das ciclinas D1 e D3, CDK4 e CDK6, dados que suportam a parada do ciclo celular na fase G1 pelo ferruginol. O complexo ciclina D/CDK4 fosforila a proteína Rb, o que leva à liberação do fator de transcrição E2F que ativa a expressão de

5. DISCUSSÃO GERAL

genes da fase G1/S. Nenhuma alteração na proteína cdc-2, responsável pela progressão do ciclo da fase G2 para M, foi observada, corroborando o efeito específico do ferruginol na fase G1.

O tratamento das células PC3 com ferruginol causou diminuição da fosforilação da Hsp27 e STAT3, indicando que a diminuição da atividade da STAT3 pode estar associada à diminuição da função da Hsp27. As STATs são proteínas latentes no citoplasma que exercem função de fatores de transcrição quando ativadas. A ativação das STATs se dá através da fosforilação de resíduos de tirosina, principalmente pela JAK e, em segundo plano, pela Src. As proteínas JAK são ativadas pelos receptores tirosina quinases que, por sua vez, foram ativados pela ligação de citocinas, como IL-3, IL-5 e fatores de transcrição (Turkson and Jove, 2000). Quando fosforilada a STAT dimeriza e se transloca ao núcleo, onde se liga ao DNA e ativa a transcrição de genes relacionados à proliferação celular. Atividade anormal de membros da família das STATs, particularmente STAT3 e STAT5, está associada a uma grande variedade de doenças, incluindo leucemias, câncer de mama, cabeça e próstata (Turkson and Jove, 2000). A STAT3 está envolvida com oncogênese o que a torna alvo de intervenções terapêuticas. Tan e colaboradores (2008) observaram que a STAT5 é constitutivamente ativa em câncer de próstata humano de alta escala, mas não em epitélio de próstata normal.

A Hsp27 é uma proteína de 27 kDa que está relacionada com o aumento da sobrevivência em resposta a vários fatores fisiológicos e ambientais como choque térmico, ROS e quimioterápicos. De fato, a análise de coimunoprecipitação mostra que Hsp27 é capaz de interagir com STAT3 e os níveis de STAT3 e Hsp27 estão diretamente relacionados. Muitos trabalhos têm mostrado que o câncer de próstata independente e androgênio apresenta níveis elevados de Hsp27 e a inibição desta proteína leva ao aumento de células apoptóticas na fase G0-G1, evento que pode estar associado à diminuição dos níveis de STAT3 (Rochi et al., 2005).

Outro importante resultado deste trabalho foi que o ferruginol induziu a translocação de NFκB para o núcleo. Este fato está de acordo com os dados publicados por Rodriguez e colaboradores (2006) sobre o efeito anti-inflamatório do ferruginol.

O ferruginol causou ainda diminuição da glutathiona reduzida (GSH) e aumento da glutathiona oxidada, características que indicam ambiente oxidante. De forma importante, muitas proteínas-chave no desenvolvimento e progressão do câncer são sensíveis e

5. DISCUSSÃO GERAL

inativadas por oxidação, como é o caso da LMWPTP. Essa fosfatase apresenta-se altamente expressa em diferentes tipos de tumores, inclusive em câncer de próstata. Observou-se o efeito direto do ferruginol sobre a atividade e expressão da LMWPTP. A oxidação da cisteína do sítio catalítico das PTPs, como da LMWPTP, leva à inibição da atividade pela incapacidade de formar intermediário cisteinil-fosfato durante o primeiro passo da catálise (den Hertog et al., 2005).

6.

CONCLUSÃO

Produtos naturais são fontes renováveis para o desenvolvimento de fármacos com diferentes mecanismos de ação. Nesse contexto, o estudo de transdução de sinal apresenta-se como ferramenta interessante para a identificação de alvos moleculares e, conseqüentemente, definição da especificidade e direcionamento terapêutico.

No presente trabalho, ficou evidente o potencial da fisetina, apigenina e ferruginol como antitumorais, apresentando algumas características interessantes:

- Fisetina, apigenina e ferruginol são potentes agentes indutores de apoptose em células tumorais. Todos eles afetam profundamente a função celular, alterando o estado de fosforilação de moléculas alvos e/ou modulando a expressão gênica.
- Fisetina e apigenina apresentam efeitos citotóxicos apenas em células tumorais, mostrando especificidade para células em divisão celular.
- Os efeitos citotóxicos da fisetina e ferruginol, em 24 h de tratamento, estão associados ao aumento da geração de ROS e à modulação de cascatas de sinalização controladas por proteínas quinases e fosfatases, fato que não foi observado no estudo com apigenina.
- Fisetina levou ao aumento na expressão da subunidade p65 do fator de transcrição NFκB, enquanto o ferruginol induziu translocação nuclear de NFκB.

6. CONCLUSÃO

- Os compostos estudados apresentaram efeito diferencial sobre a atividade de quinases. De modo geral, a fisetina pode ser considerada um indutor de fosforilação de proteínas em resíduos de tirosina e treonina. Apesar de a fisetina ter sido capaz de inibir a MAPK ERK, foi capaz de induzir a ativação da MAPK p38 e JNK, fato também observado no tratamento de células PC3 com ferruginol.
- Apigenina foi capaz tanto de ativar como inibir atividade de PTPs. A PTEN foi ativada por apigenina, evento importante para inibição da via de proliferação PI3K/AKT. Por outro lado, a atividade de LMWPTP foi inibida em 50% nas células tratadas, efeito que, em parte, pode ser resultado da interação direta da enzima com apigenina, pois o tratamento não alterou significativamente a expressão dessa PTP. Entretanto, o ferruginol foi capaz tanto de inibir a atividade quanto a expressão de LMWPTP.
- O ciclo celular foi afetado pela apigenina e ferruginol; interrupção do ciclo da fase G0/G1 foi observada pelo tratamento com ferruginol e interrupção do ciclo em G2/M, pela apigenina.

Resumindo, fisetina, apigenina e ferruginol mostraram-se atuantes sobre importantes alvos moleculares relacionados à proliferação, resistência e sobrevivência em células tumorais. Portanto, a propriedade de atuar como agentes moduladores de vias de sinalização sugere pelo menos três usos desses compostos naturais em câncer: como modelos no *design* de análogos mais potentes, como auxiliares no tratamento tradicional, potencializando a ação de quimioterápicos comerciais e na utilização direta em quimioterapia. Finalmente, este trabalho nos permite enfatizar a importância da alimentação na prevenção contra o câncer.

7.

REFERÊNCIAS

- Alison, M., John; N. Shaun B, Thomas; Ghulam J. Mufti and Rose Ann Padua. (2004) Targeted therapies in myeloid leukemia. *Semin. Cancer Biol.* 14, 41-62.
- Areche, C., Rodriguez, J.A., Razmilic, I., Yáñez, T., Theoduloz, C. (2007) Schmeda-Hirschmann, Gastroprotective and cytotoxic effect of semisynthetic ferruginol derivatives, *J. Pharm. Pharmacol.* 59, 289-300.
- Areche, C., Theoduloz, C., Yáñez, T., Souza-Brito, A.R., Barbastefano, V., de Paula, D., Ferreira, A.L., Schmeda-Hirschmann, G., Rodríguez, J.A. . (2008). Gastroprotective activity of ferruginol in mice and rats: effects on gastric secretion, endogenous prostaglandins and non-protein sulfhydryls. *J. Pharm. Pharmacol.* 60, 245-251.
- Balasubramanian, S., Eckert, R.L. (2007) Keratinocyte proliferation, differentiation, and apoptosis--differential mechanisms of regulation by curcumin, EGCG and apigenin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 224, 214-219.
- Balunas, M. J., Kinghorn, A. D. (2005) Drug discovery from medicinal plants. *Life Sci.* 78, 431-441.
- Beauchamp, C.O., Fridovich, I. (1973) Isozymes of superoxide dismutase from wheat germ. *Biochim Biophys. Acta* 317, 50-64.

7. REFERÊNCIAS

- Bernasconi, P., Boni, M., Cavigliano, P. M., Calatroni, S., Giardini, I., Rocca, B., Zappatore, R., Caresana M., Quarna, J. (2004) Molecularly targeted therapy in acute myeloid leukemia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1028, 409-422.
- 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, 85-91.
- Bloomfield, C.D., Marcucci, G., Döhner, K., Döhner, H. (2008) Introduction: Acute Myeloid Leukemia. *Semin. Oncol.* 35, 324-325
- Boik, John. *Natural Compound in Cancer Therapy*. Princeton, MN: Oregon Medical Press, 2001.
- Brusselmans, K., Vrolix, R., Verhoeven, G., Swinnen, J.V. (2005) Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity. *J. Biol. Chem.* 280, 5636-5645.
- Caltagirone, S., Rossi, C., Poggi, A., Ranelletti, F. O., Natali, P. G., Brunetti, M., Aiello, F.B., and Piantelli, M. (2000) Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential. *Int. J. Cancer* 87, 595-600.
- Cambie, R., Cox, R., Sidwell, D. (1984) Phenolic diterpenoids of *Podocarpus ferrugineus* and other podocarps. *Phytochemistry* 23, 333-336
- Cano, E. and Mahadevan, L. C. (1995) Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *Trends Biochem. Sci.* 20, 117-122.
- Cao, G., Sofic, E.; Prior, R. L. (1997) Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic. Biol. Med.* 22, 749-760.
- Carter, B.D., Kaltschmidt, C., Kaltschmidt, B., Offenhauser, N., Bohm, M.R., Baeuerle, P.A., Barde, Y.A. (1996) Selective activation of NF-kappaB by nerve growth factor through the neurotrophin receptor p75. *Science* 272, 542-545.
- Castedo, M., Perfettini, J.L., Roumier, T. et al. (2004) Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene* 23, 2825-2837.
- Chang, L., Karin, M. (2001) Mammalian Map kinase signalling cascades. *Nature* 410, 37-40.

7. REFERÊNCIAS

- Chen, Y.C., Shen, S.C., Lee, W.R., Lin, H.Y., Ko, C.H., Shih, C.M., Yang, L.L. (2002) Wogonin and fisetin induction of apoptosis through activation of caspase 3 cascade and alternative expression of p21 protein in hepatocellular carcinoma cells SK-HEP-1. *Arch Toxicol.* 76, 351–359.
- Choi, C., Benveniste, E.N. (2004) Fas ligand/Fas system in the brain: regulator of immune and apoptotic responses. *Brain Res. Rev.* 44, 65–81.
- Choi, E.J., Kim, G.H. (2008) Apigenin causes G(2)/M arrest associated with the modulation of p21(Cip1) and Cdc2 and activates p53-dependent apoptosis pathway in human breast cancer SK-BR-3 cells. *J. Nutr. Biochem.* [Epub ahead of print]
- Chaimovich, H., Nome, F. (1970) Purification and properties of an acid phosphatase from bovine brain. *Arch Biochem Biophys.* 139, 9-16.
- Cross, T. G., Toellner, D. S., Henriquez, N. V., Deacon, E., Salmon, M., Lord, J. M. (2000) Serine/threonine protein kinases and apoptosis. *Exp. Cell. Res.* 256, 34-41.
- Degterev, A., Boyce, M., Yuan, J. (2003) A decade of caspases. *Oncogene* 22, 8543-8567.
- den Hertog, J., Groen, A., van der Wijk, T. (2005) Redox regulation of protein tyrosine phosphatases, *Arch. Biochem. Biophys.* 434, 11-15.
- den Hertog, J., Ostman, A. and Böhmer, F. D. (2008) Protein tyrosine phosphatases: regulatory mechanisms. *FEBS J.* 275, 831-847.
- Diaz, M., Patterson, S. G. (2004) Management of androgen-independent prostate cancer. *Cancer Control.* 11, 364–373.
- Doepfner, K. T., D. Boller, et al. (2007). Targeting receptor tyrosine kinase signaling in acute myeloid leukemia. *Crit. Rev. Oncol./Hematol.* 63, 215-230.
- Donepudi, M., Grütter, M. (2002) Structure and zymogen activation of caspases. *Biophys. Chem.* 101/102, 145-153.
- Dumont, A., Hehner, S.P., Hofmann, T.G., Ueffing, M., Dröge, W., Schmitz, M.L. (1999) Hydrogen peroxide-induced apoptosis is CD95- independent, requires the release of mitochondria-derived reactive oxygen species and the activation of NF-kB. *Oncogene* 18, 747–757.

7. REFERÊNCIAS

- Espinoza, M., Santos, L.S., Theoduloz, C., Schmeda-Hirschmann, G., Rodríguez, J.A. (2008) New gastroprotective ferruginol derivatives with selective cytotoxicity against gastric cancer cells. *Planta Med.* 74, 802-808.
- Evans H. S., Moller, H. (2003) Recent trends in prostate cancer incidence and mortality in southeast England. *Eur. Urol.* 43, 337-341.
- Fang, J., Xia, C., Cao, Z., Zheng, J. Z., Reed, E., and Jiang, B. H. (2005) Apigenin inhibits VEGF and HIF-1 expression via PI3K/AKT/p70S6K1 and HDM2/p53 pathways. *FASEB J.* 19, 342-353.
- Fotsis, T., Pepper, M.S., Aktas, E., Breit, S., Rasku, S., Adlercreutz, H., Wahala, K., Montesano, R., Schweigerer, L. (1997) Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vivo angiogenesis. *Cancer Res.* 57, 2916-2921.
- Galluzzi, L., Maiuri, M.C., Vitale, Zischka, H., Castedo, M., Zitvogel, L., Kroemer, G. (2007) Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death. Differ.* 14, 1237-1243.
- Garcia, A., Cayla, X., Guernon, J., Dessauge, F., Hospital, V., Rebollo, M. P., Fleischer, A., Rebollo, A. (2003) Serine/threonine phosphatases PP1 and PP2A are key players in apoptosis. *Biochimie* 85, 721-726.
- Geraets, L., Moonen, H.J., Brauers, K., Wouters, E.F., Bast, A. (2007) Hageman GJ. Dietary flavones and flavonoles are inhibitors of poly(ADP-ribose)polymerase-1 in pulmonary epithelial cells. *J. Nutr.* 137, 2190-2195.
- Gershenzon, J., Dudareva, N. (2007) The function of terpene natural products in the natural world. *Nat. Chem. Biol.*, 3, 408-414.
- Graziani, Y., Erikson, E., Erikson, R.L. (1983) The effect of quercetin on the phosphorylation activity of the Rous sarcoma virus transforming gene product in vitro and in vivo. *Eur. J. Biochem.* 135(3):583-9.
- Grilli, M., Memo, M. (1999) Nuclear factor kappa B/Rel proteins: A point of convergence of signaling pathways relevant in neuronal function and dysfunction. *Biochem. Pharmacol.* 57, 1-7.

7. REFERÊNCIAS

- Gschwendt, M., Horn, F., Kittstein, W., Marks, F. (1983) Inhibition of the calcium- and phospholipid-dependent protein kinase activity from mouse brain cytosol by quercetin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 117(2): 444-7.
- Guharay J., Sengupta, B., Sengupta, P. K. (2001) Protein-flavonol interaction: fluorescence spectroscopic study, *proteins: structure.* *Proteins.* 43, 75-81.
- Haddad, A.Q., Venkateswaran, V., Viswanathan, L., Teahan, S.J., Fleshner, N.E., Klotz, L.H. (2006) Novel antiproliferative flavonoids induce cell cycle arrest in human prostate cancer cell lines. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 9, 68-76.
- Haneda, M., Sugimoto, T., Kikkawa, R. (1999) Mitogen-activated protein kinase phosphatase: a negative regulator of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Eur. J. Pharmacol.* 365, 1-7.
- Hartree, E.F. (1972) Determination of proteins: a modification of Lowry method that give a linear photometric response, *Anal. Biochem.* 48, 422-427.
- Haugh, J.M., Schneider, I.C., Lewis, J.M. (2004) On the cross-regulation of protein tyrosine phosphatases and receptor tyrosine kinases in intracellular signaling. *J. Theor. Biol.* 230, 119-132
- Havsteen, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. (2002) *Pharmacol. Ther.* 96, 67-202.
- Hu, W. and Kavanagh, J.J. (2003) Anticancer therapy targeting the apoptotic pathway. *The Lancet Oncology.* 4, 721- 729.
- Johnson, G.L., Lapadat, R. (2002) Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science.* 298, 1911-1912.
- Junttila, M. R., S.-P. Li, et al. (2008) Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *FASEB J.* 22, 954-965.
- Kachadourian, R., Day, J. (2006) Flavonoid-induced glutathione depletion: Potential implications for cancer treatment *Free Rad. Biol. Med.* 41, 65-76
- Kaufmann, S. H., Hengartner, M. O. (2001) Programmed cell death: alive and well in the new millenium. *Trends Cell. Biol.* 12, 526-534.

7. REFERÊNCIAS

- Khan, N., Afaq, F., Syed, D.N., Mukhtar, H. (2008) Fisetin, a novel dietary flavonoid, causes apoptosis and cell cycle arrest in human prostate cancer LNCaP cells. *Carcinogenesis*. 29, 1049-1056.
- Kim, D-H., Lee, J-T., Lee, I-K, Ha, J-H (2008) Comparative Anticancer Effects of Flavonoids and Diazepam in Cultured Cancer Cells. *Biol. Pharm. Bull.* 31, 255-259.
- Kim, M. H. (2003) Flavonoids inhibit VEGF/bFGF-induced angiogenesis in vitro by inhibiting the matrix-degrading proteases. *J. Cell. Biochem.* 89, 529-538
- Kolch, W., Calder, M., Gilbert, D. (2005) When kinases meet mathematics: the systems biology of MAPK signalling. *FEBS Lett.* 579, 1891-1895.
- Kornblau, S.M., Womble, M., Qiu, Y.H., Jackson, C.E., Chen, W., Konopleva, M., Estey, E.H., Andreeff, M. (2006) Simultaneous activation of multiple signal transduction pathways confers poor prognosis in acute myelogenous leukemia. *Blood* 108, 2358-2365.
- Kroemer, G., Zamzami, N., Susin, S.A. (1997) Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* 8, 45-51.
- Kuwabara, M., Asanuma, T., Niwa, K., Inanami, O. (2008) Regulation of Cell Survival and Death Signals Induced by Oxidative Stress. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 43, 51-57.
- Landis-Piwowar, K.R., Milacic, V., Dou, Q.P. (2008) Relationship between the methylation status of dietary flavonoids and their growth-inhibitory and apoptosis-inducing activities in human cancer cells. *J Cell Biochem.* 105, 514-523.
- Lawrence, R.A., Burk, R.F. (1976) Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71, 952-958.
- Lee, J.T., Lehmann, B.D., Terrian, D.M., Chappell, W.H., Stivala, F., Libra, M., Martelli, A.M., Steelman, L.S., McCubrey, J.A. (2008) Targeting prostate cancer based on signal transduction and cell cycle pathways. *Cell Cycle.* 7, 1745-1762.
- Lee, W.R., Shen, S.C., Lin, H.Y., Hou, W.C., Yang, L.L., Chen, Y.C. (2002) Wogonin and fisetin induce apoptosis in human promyeloleukemic cells, accompanied by a decrease of reactive oxygen species, and activation of caspase 3 and Ca²⁺-dependent endonuclease, *Biochem Pharmacol.* 63, 225-236.

7. REFERÊNCIAS

- Li, N., Oberley, T.D. (1998) Modulation of antioxidant enzymes, reactive oxygen species, and glutathione levels in manganese superoxide dismutase-overexpressing NIH/3T3 fibroblasts during the cell cycle, *J. Cell Physiol.* 177, 148-160.
- Lian, T.W., Wang, L., Lo, Y.H., Huang, I.J., Wu, M.J. (2008) Fisetin, morin and myricetin attenuate CD36 expression and oxLDL uptake in U937-derived macrophages. *Biochim. Biophys. Acta* 1781: 601-609.
- Liang, Y. C., Huang, Y. T., Tsai, S. H., Lin-Shiau, S. Y., Chen, C. F., and Lin, J. K. (1999) Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. *Carcinogenesis* 20, 1945–1952.
- Lin KI, Lee SH, Narayanan R, Baraban JM, Hardwick JM, Ratan RR. (1995) Thiol agents and Bcl-2 identify an alphavirusinduced apoptotic pathway that requires activation of the transcription factor NF-kB. *J. Cell. Biol.* 31, 1149–1161.
- Lin, B., Williams-Skipp, C., Tao, Y., Schleicher, M.S., Cano, L.L., Duke, R.C., Scheinman, R.I. (1999) NF-kB functions as both a proapoptotic and antiapoptotic regulatory factor within a single cell type. *Cell Death Diff.* 6, 570–582.
- Liston, P., Fong, W. G., Korneluk, R. G. (2003) The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl-2. *Oncogene* 22, 8568-8580.
- Liu, A.L., Liu, B., Qin, H.L., Lee, S.M., Wang, Y.T., Du, G.H. (2008) Anti-influenza virus activities of flavonoids from the medicinal plant *Elsholtzia rugulosa*. *Planta Med.* 74, 847-851.
- Long, X., Fan, M., Bigsby, R.M., Nephew, K.P. (2008) Apigenin inhibits antiestrogen-resistant breast cancer cell growth through estrogen receptor- α -dependent and estrogen receptor- α -independent mechanisms. *Mol. Cancer Ther.* 7, 2096-2108.
- Lowe, S. W., Cepero, E., Evan, G. (2004) Intrinsic tumour suppression. *Nature* 432, 307-315.
- Lu, H., Chang, D.J., Baratte, B., Meijer, L., Schulze-Gahmen, U. (2005) Crystal Structure of a Human Cyclin-Dependent Kinase 6 Complex with a Flavonol Inhibitor, Fisetin. *J. Med. Chem.* 48, 737 – 743.

7. REFERÊNCIAS

- Lu, X., Jung, J., Cho, H.J., Lim, D.Y., Lee, H.S., Chun, H.S., Kwon, D.Y., Park, J.H. (2005) Fisetin inhibits the activities of cyclin-dependent kinases leading to cell cycle arrest in HT-29 human colon cancer cells. *J. Nutr.* 135, 2884-2890.
- Ma, X., Li, Y.F., Gao, Q., Ye, Z.G., Lu, X.J., Wang, H.P., Jiang, H.D., Bruce, I.C., Xia, Q. (2008) Inhibition of superoxide anion-mediated impairment of endothelium by treatment with luteolin and apigenin in rat mesenteric artery. *Life Sci.* 83, 110-117.
- McCord JM, Fridovich I. (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244, 6049-6055.
- McKenzie, S. B. (2005) Advantages in understanding the biology and genetics of acute myelocytic leukemia. *Clin. Lab. Sci.* 28, 28-37.
- Moon, Y.J., Wang, X., Morris, M.E. (2006) Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicol. In Vitro* 20, 187-210.
- Morton, RL, Ikle, D., White, C.W. (1998) Loss of lung mitochondrial aconitase activity due to hyperoxia in bronchopulmonary dysplasia in primates. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 274, L127-L133.
- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Meth.* 65, 55-63.
- Navarro, D., Luzardo, O. P., Fernandez, L., Chesa, N., Diaz-Chico, B. N. (2002) Transition to androgen-independence in prostate cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 81, 191-201.
- Nebreda, A.R., Porras, A. (2000) p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends Biochem. Sci.* 25, 257-260.
- Nelson, D.P, Kiesow, L.A. (1972) Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 258C. *Anal. Biochem.* 49, 474-478.
- Nelson, W.G. (2004) Agents in development for prostate cancer prevention. *Expert Opin Investig Drugs.* 13, 1541-1554.
- Nelson, W.G., De Marzo, A.M., Isaacs, W.B. (2003). Prostate Cancer. *NEJM* 349, 366-381.
- Newman, D. J., Cragg, G. M., Snader, K.M., (2003) Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J. Nat. Prod.* 66, 1022-1037.

7. REFERÊNCIAS

- Nomura, M., Takahashi, T., Nagata, N., Tsutsumi, K., Kobayashi, S., Akiba, T., Yokogawa, K., Moritani, S., Miyamoto, K. (2008) Inhibitory mechanisms of flavonoids on insulin-stimulated glucose uptake in MC3T3-G2/PA6 adipose cells. *Biol. Pharm. Bull.* 31, 1403-1409.
- Olaharski, A. J., Mondrala, S. T., Eastmond, D. A. (2005). Chromosomal malsegregation and micronucleus induction in vitro by the DNA topoisomerase II inhibitor fisetin. *Mutat. Res.* 582, 79-86.
- Ono, M., Yamamoto, M., Masuoka, C., Ito, Y., Yamashita, M., Nohara, T. (1999) Diterpenes from the fruits of *Vitex rotundifolia*, *J. Nat. Prod.* 62, 1532-1537.
- Paez, J.G. and Sellers, W.R. (2002) PI3K/PTEN/AKT PATHWAY -A critical mediator of oncogenic signaling T.H.E. Editor(s) (ed.), Book title, 1—6.© Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.
http://research.dfc.harvard.edu/sellerslab/publications/Paez_bkchapter_2002.pdf
- Papatsoris, A.G., Papavassiliou, A.G. (2001) Prostate cancer: horizons in the development of novel anti-cancer strategies. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* 1, 47-70.
- Park, H. H., Lee, M. S., Oh, J. M., Lee, M. S., Yoon, K. W., Park, B. H., Kim, J. W., Song, H., Kim, S. H. (2006) Anti-inflammatory activity of fisetin in human mast cells (HMC-1). *Pharmacol. Res.* (no prelo).
- Park, J. B. (1999) Flavonoids are potential inhibitors of glucose uptake in U937 cells. *Biochem. Biophys Res Commun.* 260, 568-574.
- Park, J.A., Ha, S.K., Kang, T.H., Oh, M.S., Cho, M.H., Lee, S.Y., Park, J.H., Kim, S.Y. (2008) Protective effect of apigenin on ovariectomy-induced bone loss in rats. *Life Sci.* 82, 1217-1223.
- Pietta, P.G. (2000) Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* 63, 1035–1042.
- Pils B, Schultz J. (2004) Evolution of the multifunctional protein tyrosine phosphatase family. *Mol. Biol. Evol.* 21, 625-631.
- Plass, C., Oakes, C., Blum, W., Marcucci, G. (2008) Epigenetics in acute myeloid leukemia. *Semin. Oncol.* 35, 78-87.

7. REFERÊNCIAS

- Racker, E.(1950) Spectrophotometric measurements of the enzymatic formation of fumaric acid and cis-aconic acid. *Biochim. Biophys. Acta* 4, 211–214.
- Raugei, G., Ramponi, G., Chiarugi, P. (2002) Low molecular weight protein tyrosine phosphatases: small, but smart. *Cell Mol. Life Sci.* 6, 941-949.
- Ricci, M,S,, Zongm W,X. (2006) Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. *Oncologist.* 11, 342-357.
- Ricciardi, M.R., McQueen, T., Chism, D., Milella, M., Estey, E., Kaldjian, E. Sebolt-Leopold J, Konopleva, M., Andreeff, M. (2005) Quantitative single cell determination of ERK phosphorylation and regulation in relapsed and refractory primary acute myeloid leukemia. *Leukemia* 19, 1543–1549.
- Rocchi, P., Beraldi, E., Ettinger, S., Fazli, L., Vessella, R.L., Nelson, C., Gleave, M. (2005) Increased Hsp27 after androgen ablation facilitates androgen- independent progression in prostate cancer via signal transducers and activators of transcription 3-mediated suppression of apoptosis, *Cancer Res.* 65, 11083-11093.
- Rodriguez, J.A., Theoduloz, C., Yanez, T., Becerra, J., Schmeda-Hirschmann, G. (2006) Gastroprotective and ulcer healing effect of ferruginol in mice and rats: assessment of its mechanism of action using in vitro models, *Life Sci.* 78, 2503-2509.
- Roux, P. P., Blenis, J. (2004) ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 320-44.
- Rózalski, M., Kuź ma, L., Krajewska, U., Wysokiń ska, H. (2006) Cytotoxic and proapoptotic activity of diterpenoids from in vitro cultivated *Salvia sclarea* roots. Studies on the leukemia cell lines. *Z Naturforsch [C]*. 61, 483-488.
- Sarno, S., S. Moro, et al. (2002) Toward the rational design of protein kinase casein kinase-2 inhibitors. *Pharmacol. & Ther.* 93, 159-168.
- Schenk, P. W., Snaar-Jagalska, B. E. (1999) Signal perception and transduction: the role of protein kinases. *Biochim. Biophys. Acta* 1449, 1-24.
- Sengupta, B., Banerjee, A., Sengupta, P. K. (2005) Interactions of the plant flavonoid fisetin with macromolecular targets: Insights from fluorescence spectroscopic studies. *J. Photochem. Photobiol. B.* 80, 79–86

7. REFERÊNCIAS

- Sharp, H., Latif, Z., Bartholomew, B., Bright, C., Jones, C.D., Sarker, S.D., Nash, R.J. (2001) Totarol, totaradiol and ferruginol: three diterpenes from *Thuja plicata* (Cupressaceae). *Biochem Syst Ecol.* 29, 215-217.
- Shukla S, Gupta S. (2007) Apigenin-induced cell cycle arrest is mediated by modulation of MAPK, PI3K-Akt, and loss of cyclin D1 associated retinoblastoma dephosphorylation in human prostate cancer cells. *Cell Cycle* 6, 1102-1114.
- Shukla, S., Mishra, A., Fu, P., MacLennan, G.T., Resnick, M.I., Gupta, S. (2005) Up-regulation of insulin-like growth factor binding protein-3 by apigenin leads to growth inhibition and apoptosis of 22Rv1 xenograft in athymic nude mice. *FASEB J.* 19, 2042-2044.
- Smogorzewska, A., de Lange, T. (2002) Different telomere damage signaling pathways in human and mouse cells. *EMBO J.* 21, 4338-4348.
- Son, K.H., Oh, H.M., Choi, S.K., Han, D.C., Kwon, B.M. (2005) .Anti-tumor abietane diterpenes from the cones of *Sequoia sempervirens*. *Bioorg Med Chem Lett.* 15, 2019-2021.
- Srivastava, A.K. (1985) Inhibition of phosphorylase kinase, and tyrosine protein kinase activities by quercetin. *Biochem Biophys Res Commun.* 131:1-5.
- Steelman, L.S., Abrams, S.L., Whelan, J., Bertrand, F.E., Ludwig, D.E., Bäsecke, J., Libra, M., Stivala, F., Milella, M., Tafuri, A., Lunghi, P., Bonati, A., Martelli, A.M., McCubrey, J.A. (2008) Contributions of the Raf/MEK/ERK, PI3K/PTEN/Akt/mTOR and Jak/STAT pathways to leukemia. *Leukemia* 22, 686-707.
- Stone RM, O'Donnell MR, Sekeres MA. (2004) Acute myeloid leukemia. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program.* 98-117.
- Tabernero, L., Aricescu, A.R., Jones, E.Y., Szedlacsek, S.E. (2008) Protein tyrosine phosphatases: structure-function relationships. *FEBS J.* 275, 867-882.
- Tamura, S.; Hanada, M.; Ohnishi, M.; Katsura, K.; Sasaki, M., Kobayasu, K. (2002) Regulation of stress-activated protein kinase signaling pathways by protein phosphatases. *Eur. J. Biochem.* 269, 1060-1066.

7. REFERÊNCIAS

- Tan, S.H., Dagvadorj, A., Shen, F., Gu, L., Liao, Z., Abdulghani, J., Zhang, Y., Gelmann, E.P., Zellweger, T., Culig, Z., Visakorpi, T., Bubendorf, L., Kirken, R.A., Karras, J., Nevalainen, M.T. (2008) Transcription factor Stat5 synergizes with androgen receptor in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 68, 236-248.
- Thornberry, N.A., Lazebnik, Y.(1998) Caspases: enemies within. *Science* 281, 312–316.
- Tonks, N.K. (2006) Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 7, 833-846.
- Tu, W.C., Wang, S.Y., Chien, S.C., Lin, F.M., Chen, L.R., Chiu, C.Y., Hsiao, P.W. (2007) Diterpenes from *Cryptomeria japonica* inhibit androgen receptor transcriptional activity in prostate cancer cells. *Planta Med.* 73, 1407-1409.
- Turkson, J., Jove, R. (2000) STAT proteins: novel molecular targets for cancer drug discovery. *Oncogene* 19, 6613-6626.
- Ujiki, M.B., Ding, X.Z., Salabat, M.R., Bentrem, D.J., Golkar, L., Milam, B., Talamonti, M.S., Bell, R.H. Jr, Iwamura, T., Adrian, T.E. (2006) Apigenin inhibits pancreatic cancer cell proliferation through G2/M cell cycle arrest. *Mol Cancer.* 5, 76.
- Ulubelen, A., Birman, H., Oksuz, S., Topcu, G., Kolak, U., Barla, A., Voelter, W. (2002) Cardioactive diterpenes from the roots of *Salvia eriophora*, *Planta Med.* 68, 818-821.
- Ulubelen, A., Topcu, G. (1992) New abietane diterpenoids from *Salvia montbretii*. *J. Nat. Prod.* 55, 441–444.
- van Acker, F.A.A., Schouten, O., Haenen, G.R.M.M., van der Vijn, W.J.F., Bast, A. (2000) Flavonoids can replace alpha-tocopherol as an antioxidant. *FEBS Lett.* 473, 145-148.
- van Der Heijden, R., Jacobs, D.I., Snoeijer, W., Hallard, D., Verpoorte, R.2004. The *Catharanthus* alkaloids: pharmacognosy and biotechnology. *Curr. Med. Chem.* 11, 607–628.
- van Montfort, R.L., Congreve, M., Tisi, D., Carr, R., Jhoti, H. (2003) Oxidation state of the active-site cysteine in protein tyrosine phosphatase 1B. *Nature* 423, 773-777.

7. REFERÊNCIAS

- Vargo, M.A., Voss, O.H., Poustka, F., Cardounel, A.J., Grotewold, E., Doseff, A.I. (2006) Apigenin-induced-apoptosis is mediated by the activation of PKCdelta and caspases in leukemia cells. *Biochem Pharmacol.* 72, 681-692.
- Wada, T., Penninger, J. M. (2004) Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene* 23, 2838-2849.
- Wang, I. K., Lin-Shiau, S. Y., Lin, J. K. (1999) Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells. *Eur. J. Cancer* 35, 1517-1525
- Wang, S., El-Deiry, W. (2003) TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. *Oncogene* 22, 8628-8633.
- Wang, F. (2000) Cell cycle arrest at G2/M and growth inhibition by apigenin in human colon carcinoma cell lines. *Mol. Carcinog.* 28, 102-110.
- Way, T.D., Kao, M.C., Lin, J.K. (2004) Apigenin induces apoptosis through proteasomal degradation of HER2/neu in HER2/ neu-overexpressing breast cancer cells via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 279, 4479-4489.
- Williams, R. J.; Spencer, J. P.; Rice-Evans, C. (2004) Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radic. Biol. Med.* 36, 838-849.
- Yin, F., Giuliano, A.E., van Herle, A.J. (1999) Growth inhibitory effects of flavonoids in human thyroid cancer cell lines. *Thyroid* 9, 369-376.
- Youle, R. J., Karbowski, M. (2005) Mitochondrial fission in apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 657-663.
- Yuan, J., Lipinski, M., Degtrev, A. (2003) Diversity in the mechanisms of neuronal cell death. *Neuron.* 40, 401-413.
- Zhang, Z.Y. (2002) Protein tyrosine phosphatases: structure and function, substrate specificity, and inhibitor development. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 42, 209-234.
- Zong, W.X., Thompson, C.B. (2006) Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev.*, 20, 1-15.