

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



Cristiane Fernandes de Assis

**IMPORTÂNCIA DA PROTEÍNA TIROSINA FOSFATASE PARA A VIABILIDADE
DE CÉLULAS LEUCÊMICAS TRATADAS COM QUINONAS**

Este exemplar corresponde a redação final
da tese defendida pelo(a) candidato: (a)
Cristiane Fernandes de Assis
Ferreira
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientadora: Profa. Dra. Carmen Veríssima Ferreira

Co orientador: Prof. Dr. Hiroshi Aoyama

200331919

2003

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	A76i
V	EX
TOMBO BCI	56040
PROC.	16-127103
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	09/10/03
Nº CPD	

CM0019040B-4
Bbid/ 302480

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

A76i

Assis, Cristiane Fernandes de

Importância da proteína tirosina fosfatase para a viabilidade de células

leucêmicas tratadas com quinonas/ Cristiane Fernandes de Assis. --
Campinas, SP:[s.n.], 2003.

Orientadora: Carmen Veríssima Ferreira

Co-orientador: Hiroshi Aoyama

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia

1. Quinonas. 2. Apoptose. I. Ferreira, Carmen Veríssima. II. Aoyama, Hiroshi. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



Cristiane Fernandes de Assis

IMPORTÂNCIA DA PROTEÍNA TIROSINA FOSFATASE PARA A VIABILIDADE
DE CÉLULAS LEUCÊMICAS TRATADAS COM QUINONAS

Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Cristiane Fernandes de Assis e aprovada pela Cristiane Julgadora.

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

Orientadora: Profa. Dra. Carmen Veríssima Ferreira

Co orientador: Prof. Dr. Hiroshi Aoyama

20033.1919

2003

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE	BCG
Nº CHAMADA	II UNICAMP
	A2161
V	EX
TOMBO BCI	560410
PROC.	16-127103
	DVI
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	08/10/03
Nº CPD	

CM00190408-A

9/bid/ 302.860

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

A76i

Assis, Cristiane Fernandes de

Importância da proteína tirosina fosfatase para a viabilidade de células leucêmicas tratadas com quinonas/ Cristiane Fernandes de Assis. -- Campinas, SP:[s.n.], 2003.

Orientadora: Carmen Veríssima Ferreira
Co-orientador: Hiroshi Aoyama
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia

1. Quinonas. 2. Apoptose. 1. Ferreira, Carmen Veríssima. II. Aoyama, Hiroshi. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Data da Defesa: 27 / 02 / 2003.

BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

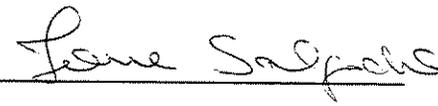
Profa. Dra. Carmen Veríssima Ferreira (Orientadora)
UNICAMP - Instituto de Biologia - Dep. Bioquímica


Assinatura

Prof. Dr. Paulo Afonso Granjeiro
CREUPI – Centro Regional Universitário do Espírito
Santo do Pinhal


Assinatura

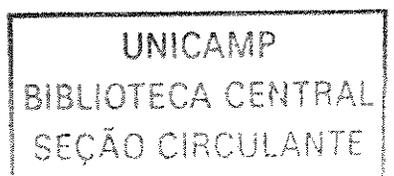
Profa. Dra. Ione Salgado
UNICAMP - Instituto de Biologia - Dep. Bioquímica


Assinatura

SUPLENTE:

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

Assinatura



DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Vânia e Juvenal, que são as pessoas mais importantes na minha vida e que não mediram esforços para que eu conseguisse alcançar meus objetivos. Muito obrigada pela força, pelas palavras de incentivo nos momentos difíceis, pelos momentos de alegria e apesar da distância sinto a presença de vocês em todos os momentos da minha vida. Às minhas queridas irmãs, Alessandra, Camila e minha avó, pelo carinho, atenção e amizade e por sempre estarem torcendo por mim. Obrigada por tudo!

À Carmen, antes de tudo quero lhe agradecer por toda assistência, apoio e incentivo dados no momento em que mais precisei. Os seus ensinamentos foram muito importantes para mim e quero que saiba que guardarei comigo todos eles, com a certeza de que todo esforço é válido quando se quer vencer. Sua orientação desde a iniciação científica foi a base para minha formação profissional e por isso dedico a você esta tese.

Ao professor Hiroshi, por sempre ter uma palavra de conforto para dizer nos momentos de dificuldade, mostrando que sempre somos capazes de superar os maiores obstáculos. Admiro sua generosidade e o carinho com que trata todos em sua volta, que o torna a pessoa tão especial que você é.

AGRADECIMENTOS

A Deus, sempre presente na minha vida dando a força necessária para superar todos os obstáculos.

Aos professores membros da banca de qualificação (Dra. Ione Salgado, Dra. Denise Vaz de Macedo e Dr. José Camillo Novello), pelas críticas e sugestões que muito enriqueceram o meu trabalho.

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

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

À CAPES, pela concessão de bolsa de estudo.

A todos os docentes, funcionários e pós-graduandos do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da UNICAMP que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

À Andréia e a Marina, secretárias do Departamento de Bioquímica, pela convivência agradável e por estarem sempre dispostas a ajudar.

A todos do Laboratório de Enzimologia, pelos momentos agradáveis compartilhados durante esta jornada.

Ao Neto (Laboratório de Cultura de Células e Biofármacos) por estar sempre disposto a ajudar e pelos momentos descontraídos.

À Ana Claudia (Anita), sempre me apoiando, orientando e incentivando a superar as dificuldades e a vencer cada desafio. Aprendi com você que as pessoas para serem felizes, não precisam ter as melhores coisas e sim saber aproveitar as melhores oportunidades. Obrigada pela confiança, pela amizade e por fazer parte da minha vida!

À Paty, por sua preciosa amizade e companheirismo, dividindo as alegrias e tristezas do dia a dia. Todo esse tempo que passamos juntas foi muito importante para mim. Você estará sempre num lugar especial dentro do meu coração.

À Karina, por sua atenção, carinho e estímulo constante durante este período. Sou muito feliz por ter sua amizade, por ter passado tantos momentos alegres ao seu lado e poder contar sempre com você.

À Marilena (Maris), pelo seu jeito alegre e pela confiança depositada. Uma pessoa que sempre esta disposta a ajudar sem medir esforços. Muito obrigada por tudo!

Ao meu grande amigo Jeová, pelo ser humano que é e por tudo o que representa para mim. Apesar da distância a nossa amizade continua a mesma. Como é bom saber que existem pessoas como você, que se preocupam em me fazer feliz. Divido com você essa imensa alegria.

À Karla, pela permanência em minha vida e por todo o apoio. As verdadeiras amizades são como as estrelas, não as vemos todas as horas, mas sabemos que elas existem.

Ao Daniel por ter me apoiado em todos os momentos (mesmo distante), sempre me dando força para não desistir do meu objetivo. Obrigada pelo carinho!

À Dani (Japinha), por ter me ajudado sempre que precisei.

À Erika, pela pelos momentos alegres e descontraídos que passamos juntas, pela ajuda no designer das apresentações e na correção da tese, obrigada pela ajuda.

À Fernanda (Fê) uma pessoa maravilhosa que participou de muitos momentos importantes, me aconselhando e ajudando.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Fosfatases	1
Características gerais	1
Proteínas fosfatases	1
Proteínas tirosina fosfatases	2
1.2. Leucemia promielocítica humana e indução da diferenciação	4
Ciclo celular e Cdc25	6
Proteínas fosfatase presentes nas células HL60	8
Modulação da atividade das PTPs	9
1.3. Estresse oxidativo e antioxidantes	10
1.4. Participação dos radicais livres em vias de transdução de sinal	12
1.5. Características gerais dos compostos utilizados neste trabalho	13
Tetrahidroquinona	14
Hidroquinona	15
1.6. Citotoxicidade	16
1.7. Apoptose	18
2. OBJETIVOS	20
3. METODOLOGIA	21
3.1. Materiais	21
3.2. Métodos	21
3.2.1. Cultura das células HL60	21
3.2.2. Ensaio de citotoxicidade	21
a) Avaliação da Função Mitocondrial	21
b) Indicação do número de células	22
c) Determinação da Atividade Fosfatásica	22

3.2.3. Determinação da glutathiona reduzida	23
3.2.4. Determinação da diferenciação celular	24
3.2.5. Avaliação da ocorrência de apoptose	24
Método da difenilanina modificado por Zhu (1998)	24
3.2.6. Efeito das quinonas na atividade fosfatásica	25
3.2.7. Análise estatística	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1. Efeito da hidroquinona na atividade das fosfatases das células HL60	28
4.2. Avaliação da citotoxicidade e do estado estado redox das células HL60 tratadas com hidroquinona	33
4.3. Efeito da tetrahidroquinona na atividade das fosfatases das células HL60	39
4.4. Avaliação da citotoxicidade e do estado estado redox das células HL60 tratadas com tetrahidroquinona.	43
4.5. Avaliação da diferenciação e apoptose induzidas pelas quinonas nas células HL60	48
5. CONCLUSÕES	54
6. PERSPECTIVAS	56
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

ÍNDICE DE FIGURAS

- 01 Efeito da hidroquinona na proteína tirosina fosfatase de membrana e citosol das células HL60.
- 02 Efeito de antioxidantes na inibição da proteína tirosina fosfatase citosólica e de membrana das células HL60 pela hidroquinona.
- 03 Efeito da hidroquinona na viabilidade das células HL60.
- 04 Determinação da glutathiona reduzida nas células HL60 tratadas com a hidroquinona.
- 05 Estado de transição para a transferência fosforil inicial do substrato para o resíduo de cisteína do sítio ativo PTP.
- 06 Efeito da tetrahydroquinona na atividade da proteína tirosina fosfatase de citosol e de membrana das células HL60.
- 07 Efeito de antioxidantes na inibição da proteína tirosina fosfatase citosólica e de membrana das células HL60 pela tetrahydroquinona.
- 08 Efeito da tetrahydroquinona na viabilidade das células HL60
- 09 Conteúdo da glutathiona reduzida nas células HL60 tratadas com a tetrahydroquinona.
- 10 Diferenciação das células HL60 tratadas com dimetilsulfóxido, tetrahydroquinona e hidroquinona.
- 11 Efeito das quinonas na fragmentação do DNA das células HL60.

ABREVIATURAS

BMr	Baixa massa molecular relativa
CD45	Antígeno comum de leucócito
Cdc25	Controle da divisão celular (Proteína tirosina fosfatase dual)
Cdks	Quinase dependente de ciclinas
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTNB	Ácido 5,5 ditio-bis (2-nitrobenzóico)
DTT	Ditiotreitol
EROS	Espécies reativas de oxigênio
GSH	Glutathiona reduzida
GSSG	Glutathiona oxidada
HL60	Células da leucemia promielocítica humana
HQ	Hidroquinona
IC₅₀	Concentração que inibe 50% da atividade enzimática ou viabilidade celular
MAPK(s)	Proteína(s) quinase(s) ativada(s) por mitógeno(s)
MPO	Mieloperoxidase
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NBT	Nitroblue tetrazolium
NFAT	Fator de transcrição nuclear de células T ativadas
NFκB	Fator Nuclear Kappa B
pCMB	p-cloromercuribenzoato

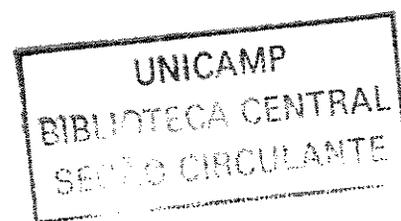
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
Pi	Fosfato inorgânico
pNP	p-nitrofenol
pNPP	p-nitrofenilfosfato
pRb	Proteína Retinoblastoma
pSer	Fosfoserina
pThr	Fosfotreonina
PTP(s)	Proteína(s) tirosina fosfatase(s)
pTyr	Fosfotirosina
RA	Ácido Retinóico
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Culture Medium)
SQH·	Radical semiquinona
THQ	Tetrahidroxiquinona
TNF	Fator de necrose tumoral
TPA	12- <i>o</i> -tetradecanoilforbol 13-acetato

RESUMO

O objetivo geral deste trabalho foi correlacionar o efeito citotóxico da hidroquinona (HQ) e da tetrahydroquinona (THQ) sobre as células HL60 com alteração da atividade de PTPs. As quinonas apresentaram efeito inibitório sobre fosfatases de membrana e citosol das células HL60. A viabilidade das células HL60 foi avaliada através de 3 parâmetros: redução do MTT, atividade fosfatásica e conteúdo de proteínas. Para a HQ foram obtidos os seguintes valores de IC₅₀: 20 e 50µM para fosfatase e MTT, respectivamente. Quando as células foram tratadas em presença da GSH os valores de IC₅₀ para HQ foram 80µM para fosfatase e 50µM para MTT. Em relação à função mitocondrial e atividade fosfatásica, as células quando tratadas com THQ apresentaram um IC₅₀ 50µM. Entretanto, a THQ em presença da GSH foi menos tóxica como revelado pelos valores de IC₅₀ encontrados (240µM para fosfatase e 160µM para o MTT). As células HL60 tratadas com HQ e THQ reduziram o NBT, indicando positividade na diferenciação de 103 e 89%, respectivamente. A fragmentação do DNA observada na presença da HQ (35%) e THQ (24%) indica indução de apoptose. Nossos resultados mostram que o efeito citotóxico das quinonas sobre as células HL60 foi inespecífico e dependente da metabolização das mesmas, com produção de compostos mais reativos. Portanto, o estresse oxidativo causado pela HQ e THQ pode inicialmente alterar vias de sinalização que têm a participação de proteínas tirosina fosfatases, já que estas enzimas respondem negativamente a baixos níveis de agentes oxidantes.

ABSTRACT

The aim of this work was to correlate the cytotoxic effect of hydroquinone (HQ) and tetrahydroquinone (THQ) on HL60 cells with protein tyrosine phosphatases activities changing. The quinones presented inhibitory effect in the phosphatases isolated from HL60 cells (membrane and cytosol). The cell viability was evaluated through 3 parameters: MTT reduction, phosphatase activity and protein content. For the HQ the following IC_{50} values were obtained: 20 and $50\mu\text{M}$ for phosphatase and MTT, respectively. When these cells were treated in presence of GSH the IC_{50} values for HQ were $80\mu\text{M}$ for phosphatase and $50\mu\text{M}$ for MTT. In relation to the mitochondrial function and phosphatase activity, when the cells were treated with THQ, the IC_{50} was $50\mu\text{M}$ for both parameters. However, THQ in presence of GSH was less toxic as revealed through to IC_{50} values of ($240\mu\text{M}$ for phosphatase and $160\mu\text{M}$ for MTT). HL60 cells treated with HQ and THQ reduced NBT, indicating differentiation positivity of 103 and 89%, respectively. DNA fragmentation was observed in the presence of HQ (35%) and THQ (24%) revealing apoptose induction. Ours results showed that cytotoxic effect of quinones on HL60 cells was inespecific and depended on the compounds metabolization, producing more toxic metabolites. Finally, the oxidative stress caused by HQ and THQ could initially changes signaling pathways which PTPs are involved, because these enzymes are negatively regulated by low level of oxidant agents.



1. INTRODUÇÃO

1.1. Fosfatases

Características gerais

As fosfatases pertencem ao grupo das hidrolases que utilizam como substrato fosfatomonoésteres. Estas enzimas podem ser classificadas como fosfatase ácida, fosfatase alcalina e proteínas fosfatases (Jia, 1997).

Proteínas fosfatases

Durante a última década, um considerável progresso tem sido feito na elucidação do controle do crescimento e regulação das células eucarióticas. O balanço entre a fosforilação e a desfosforilação de proteínas é a base para o controle de diversos eventos biológicos disparados por efetores extracelulares, como hormônios, mitógenos, carcinógenos, citocinas, neurotransmissores e substâncias ou metabólicos tóxicos (Harrison *et al.*, 1999). Estima-se que 30% das proteínas intracelulares são fosfoproteínas e que cerca de 4% do genoma eucariótico codifique proteínas quinases e proteínas fosfatases (Hunter, 1995).

Em particular, a fosforilação e desfosforilação de resíduos de treonina, serina e tirosina em proteínas, têm emergido como eventos chaves na regulação da divisão, diferenciação e desenvolvimento celular, regulação do metabolismo e expressão gênica, contração, transporte, locomoção celular, aprendizado e memória (Cohen, 1988; Johnson and Barford, 1993; Trowbridge, 1991; Denu *et al.*, 1996).

As atividades de proteínas quinases e fosfatases são cuidadosa e fortemente reguladas *in vivo*. Mudanças anormais na atividade dessas enzimas podem proporcionar conseqüências graves, que incluem neoplasias, diabetes, inflamação e doenças resultantes de defeitos imunológicos (Harrison *et al.*, 1999; Alexander, 2000).

Com base na função, estrutura, seqüência, especificidade, sensibilidade a ativadores e inibidores, as proteínas fosfatases podem ser agrupadas em duas grandes famílias: proteínas tirosina fosfatases e proteínas serina/treonina fosfatases (Jia, 1997).

Proteínas tirosina fosfatases

Estas fosfatases podem ser divididas em três subfamílias: proteínas tirosina específicas (tipo receptor e citoplasmática), proteínas fosfatases com dupla especificidade (dual) e fosfatases de baixa massa molecular (*BMr*) - (Fauman and Saper, 1996; Jia, 1997; Zhang, 2001).

Diferentemente da PTP específica e de baixa massa molecular relativa, as quais atuam estritamente sobre resíduos pTyr alvos, fosfatases duais específicas utilizam como substratos proteínas que contêm pTyr assim como pSer e pThr (Zhang, 2001).

Todas as proteínas tirosina fosfatases apresentam no sítio ativo a seqüência Cys-X₅-Arg (X = qualquer aminoácido) altamente conservada. A presença da cisteína no sítio ativo é responsável pela característica comum das

proteínas tirosina fosfatases de serem inibidas pelo vanadato, pervanadato, p-cloromercuribenzoato e outros agentes oxidantes (Tonks and Neel, 1996).

PTPs específicas podem ser divididas em dois grupos: PTPs tipo receptores (RPTPs) e intracelulares (Neel and Tonks, 1997; Li and Dixon, 2000; Zhang, 2001). PTPs tipo receptores, exemplificadas pelas CD45 e PTP, geralmente apresentam um domínio extracelular (semelhante à moléculas de adesão - fibronectina), que se liga a efetores extracelulares; uma única região transmembrana, e um ou dois domínios PTP citoplasmáticos. Portanto, estas fosfatases estão envolvidas na comunicação célula-célula e transdução de sinal (Hertog, 1999; Alexander, 2000).

As proteínas intracelulares exemplificadas por PTP1B e SHP-2 participam de vários eventos celulares, tais como antagonistas da ação oncogênica das proteínas quinases Src e Neu, controle da ação da insulina e proliferação das células hematopoéticas (Brown-Shimer *et al.*, 1992; Kenner *et al.*, 1993).

Proteínas tirosina fosfatases duais (tipo VH1; Cdc25; MAP-1) utilizam como substratos proteínas que apresentam aminoácidos tirosina, como também serina e treonina fosforilados. Algumas ainda, hidrolisam outros substratos além de fosfoproteínas tais como flavina mononucleotídeo e açúcares fosforilados. No entanto, a especificidade desta fosfatase por resíduos de aminoácidos é maior (Granjeiro *et al.*, 1997; Takagi *et al.*, 1997; Maehama and Dixon, 1998; Zhang, 2001). Estas fosfatases apresentam importante papel na regulação da transdução de sinal mitogênico e controlam o ciclo celular (Wu and Sun, 1999).

Proteínas tirosina fosfatases de baixa massa molecular relativa desempenham importante papel na regulação da proliferação celular, uma vez que a alta expressão destas enzimas inibe a proliferação de células normais e transformadas (Harrison *et al.*, 1999).

1.2. Leucemia Promielocítica Humana e Indução da Diferenciação Celular

A leucemia mielóide aguda é uma doença de natureza maligna, caracterizada pela proliferação anômala dos precursores granulocíticos na medula óssea. Durante o processo de diferenciação das células pluripotentes na medula óssea, ocorre interrupção ou alteração das vias de maturação, de modo que se acumulam células jovens (blastos) - (Sham, 1997).

As linhagens de células mielóides humanas constituem modelos úteis para o estudo da regulação da proliferação e diferenciação celular (Collins *et al.*, 1978). A linhagem de células de leucemia promielocítica humana (HL60), representa um sistema experimental para o estudo *in vitro* da diferenciação destas células, sendo também utilizada como alvo no estudo de possíveis drogas que poderão ser usadas na prevenção e no tratamento dos diferentes tipos de leucemias (Sokoloski and Sortorelli, 1997; Uzunoglu *et al.*, 1999). As células HL60 foram isoladas do sangue periférico de um paciente com leucemia promielocítica aguda e posteriormente modificadas para proliferarem continuamente em cultura. O tipo celular predominante desta linhagem consiste de promielócitos (Newburger *et al.*, 1979; Breitman, 1990).

As células hematopoiéticas maduras são originadas de uma célula pluripotente que atinge maturação e diferenciação após estímulos específicos pelos fatores estimuladores de colônias, os quais são responsáveis pelas diferentes funções dessas células e bloqueio da proliferação. Em células neoplásicas o bloqueio no processo de diferenciação constitui possível causa da proliferação celular descontrolada (Uzunoglu *et al.*, 1999).

Células da leucemia mielóide humana podem ser induzidas à diferenciação *in vitro* em granulócitos e monócitos pelo tratamento com vários agentes químicos, citocinas e contato intercelular (Verlinden *et al.*, 1997; Shin *et al.*, 1999). Este processo de diferenciação envolve a expressão de vários genes através da ativação de fatores de transcrição por quinases pertencentes à família das proteínas quinases ativadas por mitógenos (Behringer *et al.*, 2001; Kang *et al.*, 2001).

As células HL60 podem ser diferenciadas em neutrófilos quando tratadas com ácido retinóico (RA) e 1,25-dihidroxitamina D₃ (Wallington *et al.*, 1996). Vitaminas lipossolúveis interagem com receptores nucleares e o complexo formado se liga à sequências específicas do DNA (regiões regulatórias), ativando a expressão de diferentes genes envolvidos na diferenciação. A expressão desses genes é responsável pela aquisição de características de células maduras, tais como: fagocitose, liberação de enzimas lisossomais, quimiotaxia, receptores de fatores do complemento e geração de ânion superóxido (Collins *et al.*, 1978; Newburger *et al.*, 1979; Breitman *et al.*, 1980).

Fabian e colaboradores (1999), demonstraram a ocorrência da alteração na organização da actina e de sua ligação com proteínas durante a diferenciação das células HL60. Esta alteração no citoesqueleto é fundamental para várias funções como: fagocitose, locomoção e maturação.

Ciclo celular e Cdc25

O ciclo celular é dividido em 5 fases, sendo elas: G0, G1, S, G2 e M.

G0-G1 – fatores de crescimento são responsáveis pela saída da célula da fase G0.

G1 - a fase G1 é preparatória para a síntese do DNA, portanto, proteínas que irão participar da replicação do DNA são sintetizadas nesta fase.

G1-S – a passagem da célula da fase G1 para a fase S, depende de um sinal interno que é gerado pela célula, o qual marca um ponto no ciclo celular denominado ponto de restrição, que constitui um ponto sem retorno, uma vez que a partir do momento que é desencadeado, a célula não pode voltar para fase G0. Na progressão do ciclo da fase G1 para S ocorre ativação da cdk que fosforila a proteína retinoblastoma (Rb). A proteína Rb fosforilada se dissocia do fator de transcrição EF2, o qual ativa a transcrição de proteínas envolvidas na síntese do DNA e da ciclina E (participa da fase S). A degradação da ciclina E, faz com que a célula passe para a fase G2 (BanKer *et al.*, 1998).

G2-M – a transição do ciclo celular da fase G2 para fase M, requer a formação do complexo cdk-ciclina mitótica (fator promotor da mitose - MPF). No entanto, após formação deste complexo, a ciclina ainda se encontra inativa. A

ativação do complexo se dá após fosforilação da cdk em dois sítios e em seguida desfosforilação do sítio inibitório pela Cdc25 (proteína fosfatase) - (O' Connell *et al.*, 2000).

Em algumas condições, como dano celular, a proteína Cdc25 é fosforilada pela proteína quinase (cdk) ficando inativa, e conseqüentemente o MPF também fica inativa, causando inibição da progressão do ciclo celular (Draetta and Eckstein, 1997).

Regulação do ciclo celular

A progressão do ciclo celular é controlada por quinases dependentes de ciclinas (cdk), as quais são positivamente reguladas por associação com ciclinas e negativamente reguladas por subunidades inibitórias. As quinases dependentes de ciclinas são também inibidas por fosforilação inibitórias do local de ligação da Cdk ao ATP pela proteína quinase e ativada por desfosforilação do complexo Cdk/ciclina pela fosfatase Cdc25 (Ayete *et al.*, 2001).

As células humanas contêm três genes *Cdc25*: *Cdc25A*, *Cdc25B*, *Cdc25C*, que expressam proteínas tirosina fosfatases específicas duais, as quais possuem uma alta conservação do resíduo de cisteína em seus sítios ativos. Estas proteínas fosfatases atuam no complexo ciclina-cdc2. A *Cdc25A* e *Cdc25B* são expressas durante o ciclo celular com picos de expressão da *Cdc25A* na fase G1 e da *Cdc25B* nas fases G1/S e G2 (Nagata *et al.*, 1991). A *Cdc25C* é predominantemente expressa na fase G2 e regula o tempo das células para entrar em mitose (Draetta *et al.*, 1997).

Alguns autores sugerem que as Cdc25 podem ser potentes pro-oncogenes humanos. Cdc25A e Cdc25B são significativamente expressas em certos tipos de cânceres e, portanto, representam potentes alvos para drogas antitumorais. Especialmente a Cdc25A e a Cdc25B são importantes no desenvolvimento do câncer de cabeça, pescoço e mama (Galaktionov *et al.*, 1995).

Proteínas fosfatases presentes em células HL60

As células HL60 apresentam pelo menos 5 tipos de proteínas fosfatases: proteína serina/treonina fosfatase tipo PP1 e PP2A, proteína tirosina fosfatase CD45, SHP-1 e Cdc25.

A modulação da atividade da CD45 apresenta importante papel na diferenciação e/ou manutenção de várias linhagens de células leucêmicas num estado antiproliferativo (Buzzi *et al.*, 1992).

A proteína tirosina fosfatase SHP-1 também está envolvida na regulação da diferenciação destas células (Uesugi *et al.*, 1999).

A proteína tirosina nuclear controla a progressão do ciclo celular da fase G1 para S e a expressão desta fosfatase está associada com um aumento da quantidade da proteína c-myc (Ganapati *et al.*, 2001).

A PP1 está envolvida na indução de apoptose pela desfosforilação da proteína retinoblastoma (Rb). A proteína Rb fosforilada é responsável pela progressão do ciclo celular da fase G1 para fase S, através da indução da expressão de ciclinas e liberação do fator EF2 (Wang *et al.*, 2001). A PP2A participa na regulação do metabolismo, transcrição, processamento do RNAm

("splicing"), tradução, diferenciação, ciclo celular, transformação oncogênica e transdução de sinal. A atividade desta enzima pode ser modulada por fosforilação e metilação do C-terminal. A regulação direta da atividade da PP2A está associada com a integridade do citoesqueleto, e tanto esta enzima como a PP1 participam na modulação da motilidade celular, diferenciação e citocinese. As proteínas serina/treonina PP1 e PP2A participam da regulação da proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina (Harrison *et al.*, 1999; Toivola and Eriksson, 1999).

Modulação da atividade das PTPs

Fosforilação - um mecanismo geral da regulação da atividade PTP é através da fosforilação. A fosforilação de resíduos de serina/treonina específicos pode regular as PTPs de modo negativo ou positivo. Para várias PTPs, incluindo PTP-1B e SHP-1, a ativação pela fosforilação tem sido descrita (Östman and Böhmer, 2001).

Oxidação transiente - a oxidação reversível da PTP é um mecanismo de regulação da atividade desta enzima. A inibição *in vitro* ocorre por vários oxidantes, incluindo H₂O₂, o qual atua como modulador oxidativo do resíduo de cisteína presente no sítio catalítico, causando alteração deste resíduo com produção do ácido sulfênico. Novas oxidações deste produto formado leva à produção do ácido sulfínico e ácido sulfônico, os quais são produtos da oxidação irreversível (Barrett *et al.*, 1999; Thomas and Mallis, 2001).

1.3. Estresse oxidativo e antioxidantes

O estresse oxidativo resultante do metabolismo normal (cerca de 2% do oxigênio na mitocôndria se converte em radical livre), da alteração da resposta antioxidante celular ou da ação de xenobióticos, representa significativo papel na etiologia de pelo menos 50 tipos de doenças, incluindo o câncer (Martinez, 1995). A alteração do estado redox celular provoca aumento na mutagênese e apoptose (Matés and Sánchez-Jiménez, 2000; Fréchet *et al.*, 2001). Os principais produtos do estresse oxidativo incluem o NO^{*} (óxido nítrico) , radical hidroxil (OH^{*}) e o oxigênio singlet (O¹), bem como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e superóxido (O₂^{*-}) que, na presença de ferro, resultam na produção do radical hidroxil.

Embora várias macromoléculas estejam sujeitas ao ataque dos radicais livres, o ataque a nucleotídeos livres ou ao DNA, pode ser a causa primária dos efeitos deletérios dos radicais livres (Allen and Tresini, 2000; Fréchet *et al.*, 2001). Os efeitos resultantes do ataque inespecífico dos radicais livres e agentes oxidantes são perda da integridade celular, função de enzimas e estabilidade do genoma. Portanto, vários mecanismos antioxidantes estão envolvidos na proteção contra estes agentes agressores (Hensley *et al.*, 2000).

Em condições fisiológicas existem vários mecanismos de defesa contra a ação dos oxidantes, tais como: enzimas (superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione reductase), moléculas contendo tióis (GSH e tioredoxina) e vitaminas (Gaté *et al.*, 1999).

Na célula, a glutathiona apresenta importante papel na síntese de proteínas, transporte de aminoácidos, síntese de DNA e RNA, balanço do estado redox, controle da permeabilidade de íons na membrana plasmática e detoxificação de xenobióticos pela reação de conjugação catalisada pela glutathiona transferase. A glutathiona (γ -L-glutamil-L-cisteína-glicina) é o mais abundante antioxidante intracelular presente em todas as células metabolicamente ativas. Este tripeptídeo existe no organismo em suas formas: reduzida (GSH) e oxidada (GSSG); atuando direta ou indiretamente em muitos processos biológicos importantes, incluindo síntese de proteínas, metabolismo e proteção celular (Meister, 1991). Em relação às células tumorais, a concentração de GSH pode ser responsável pela resistência ou sensibilidade destas células, frente a agentes antineoplásicos (Chen *et al.*, 1998).

A tioredoxina pertence a uma grande família de proteínas, cujo "sítio catalítico" é altamente conservado (Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-Lys), sendo que os dois resíduos de cisteína apresentam importante papel na função biológica desta proteína como antioxidante. A tioredoxina é oxidada (Trx-S_2) através da transferência de equivalentes redutores a substratos contendo pontes dissulfeto (X-S_2), desta forma, voltando ao estado reduzido [Trx-(SH)_2] pela ação da tioredoxina redutase dependente de NADPH (Powis *et al.*, 2000). A tioredoxina pode ser encontrada no citoplasma, núcleo e mitocôndrias, locais onde desempenha diferentes funções além da ação antioxidante, como por exemplo: fator de crescimento, cofator, regulação de fatores de transcrição, inibição da

apoptose e resistência de células tumorais a quimioterápicos (Spector *et al.*, 1988; Bjornstedt *et al.*, 1994; Powis *et al.*, 2000).

1.4. Participação dos Radicais Livres em Vias de Transdução de Sinal

Recentemente, vários autores têm demonstrado que as espécies reativas de oxigênio (EROS) apresentam importante função biológica na transdução de sinal celular (Lander, 1997). Na literatura, há relatos da sensibilidade de várias macromoléculas e conseqüentemente de vias de sinalização frente a estas espécies. Esta ação pode ser mediada diretamente pelas EROS ou através da geração de mediadores bioativos (Kehrer, 2000). As EROS também afetam a sinalização via cálcio, atividade de enzimas antioxidantes, transportadores de íons, genes relacionados com o crescimento celular e várias quinases da família das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs). Os efeitos das EROS numa via de sinalização podem ser negativos ou positivos.

Meyer e colaboradores (1993), mostraram que fatores de transcrição relacionados com a família do NF κ B podiam ser ativados não somente pela interação ligante-receptor específico, mas também, por agentes oxidantes. Outros autores demonstraram que, cascatas envolvendo proteínas quinases e outros fatores de transcrição possuem elementos sensíveis à alteração redox (Charest *et al.*, 1993; Kyriakis *et al.*, 1994; Mertens *et al.*, 1996; Allen and Tresini, 2000).

Hensley e colaboradores (2000), demonstraram que o H₂O₂ podia ser sintetizado endogenamente em certos tipos celulares em resposta às citocinas ou

fatores de crescimento. Assim, o H_2O_2 atuaria como segundo mensageiro estimulando cascatas de proteínas quinases acopladas com a expressão de genes envolvidos em processos inflamatórios ou no controle do ciclo celular.

Sunderesan e colaboradores (1995), demonstraram que a ligação do fator derivado de plaquetas (PDGF) ao seu receptor levou à produção de peróxido, a qual foi inibida pela expressão intracelular da catalase.

Estudos subseqüentes, mostraram também que o H_2O_2 atua de forma transiente, por inibir proteínas tirosina fosfatases (PTPs), as quais são altamente sensíveis a oxidantes (Monteiro and Stern, 1996; Denu and Tanner, 1998; Allen and Tresini, 2000; Thomas and Mallis, 2001). Este efeito é transiente porque em presença de antioxidantes como GSH e tioredoxina, a atividade da PTP foi restaurada.

As quinonas conhecidas como indutores de estresse oxidativo, foram utilizadas neste trabalho com o objetivo de correlacionar a atividade das PTPs com o controle de proliferação celular (Tonks and Neel, 1996).

1.5. Características Gerais dos Compostos Utilizados neste Trabalho

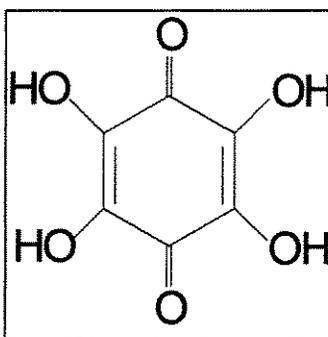
O mecanismo de ação de fármacos antineoplásicos, na maioria das vezes, envolve alteração do estado redox celular. As quinonas de modo geral, por apresentarem esta característica, têm sido utilizadas no desenvolvimento de novos fármacos e no estudo das vias envolvidas na citotoxicidade destes compostos, incluindo a regulação da expressão gênica (Allen and Tresini, 2000).

As quinonas apresentam importante papel em vários processos biológicos, como transporte de elétrons e produção de energia (ubiquinona), ação bactericida, fungicida e antitumoral (O'Brien, 1991). A ação citotóxica das quinonas é devido à redução metabólica ou ligação direta a grupos essenciais de macromoléculas. Portanto, a toxicidade das quinonas está normalmente relacionada com alteração do estado redox celular (Nohl, *et al.*, 1986).

TETRAHIDROXIQUINONA

A tetrahidroxiquinona (THQ) é um pró-oxidante similar aos polifenóis fisiológicos como catecóis e catecolaminas. Apesar dos seus papéis fisiológicos e farmacológicos, esses compostos podem apresentar propriedades toxicológicas por induzirem a produção de espécies reativas de oxigênio e quinonas (Souza-Pinto *et al.*, 1995).

A THQ apresenta grupamentos -OH no anel benzoquinona na posição *para*, os quais podem funcionar como doadores de prótons, e conferirem capacidade para auto-oxidação gerando o ânion superóxido e radicais semiquinona (SQH^{*}) - (Souza-Pinto *et al.*, 1995).

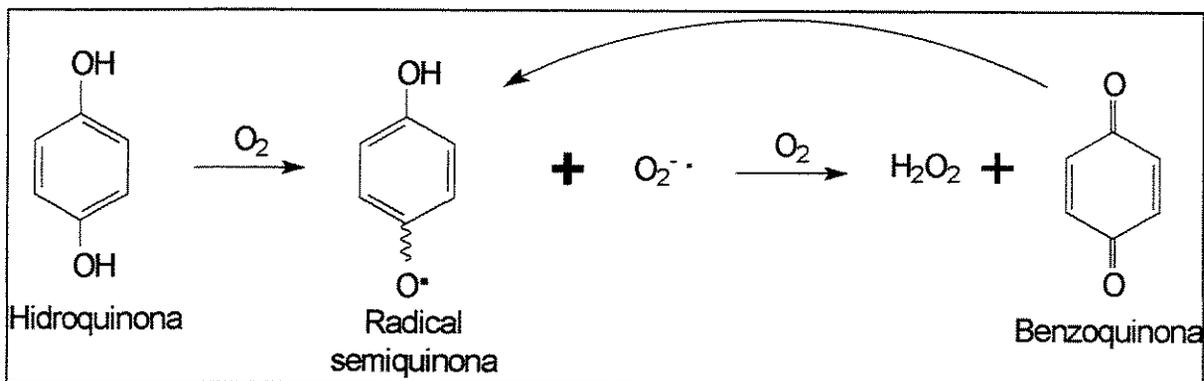


Estrutura da tetrahidroxiquinona

HIDROQUINONA

A hidroquinona (HQ), um metabólito reativo do benzeno, produz através da auto-oxidação o radical semiquinona seguido da benzoquinona.

Em presença de oxigênio, a HQ converte-se no radical semiquinona e gera o ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$), que em seguida, podem dar origem ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e benzoquinona (Hoffmann *et al.*, 1987, O'Brien, 1991). O ânion superóxido pode, juntamente com o H_2O_2 , produzir o radical hidroxil ($^{\bullet}OH$) através da reação de Haber-Weiss. O radical hidroxil também pode ser formado pela reação de Fenton que ocorre quando o peróxido está na presença de metais como ferro (Fe^{2+}).



1.6. Citotoxicidade

O possível uso terapêutico de uma droga está condicionado além da verificação de sua atividade biológica, ao estudo de sua toxicidade, da biodisponibilidade corporal e de sua excreção (Fricker, 1995). A legislação atual exige que novas drogas sejam testadas *in vitro* e *in vivo* antes de serem liberadas para uso farmacológico ou alimentício, onde a toxicidade é um fator importante e limitante para a liberação e consumo (Freshney, 1994). A possibilidade de identificação dos riscos na utilização de substâncias químicas levou ao uso maciço de animais experimentais, que atualmente tem sido preterido, devido a questões éticas e de conscientização. Desta forma, ensaios de citotoxicidade têm sido incentivados pela comunidade científica. No entanto, torna-se evidente que um experimento de citotoxicidade apropriado permite uma interpretação limitada em relação ao mecanismo de toxicidade do composto testado, porém, isso serve como base para a avaliação das características toxicológicas de novos compostos, bem como auxilia na escolha dos experimentos *in vivo* a serem realizados e quais são os órgãos ou organelas mais afetados (Stark *et al.*, 1986).

Procedimentos comparativos baseados nos resultados dos estudos *in vitro* são fundamentais para a seleção racional de testes com a intenção de reduzir e/ou até substituir o uso de animais em avaliações de risco. Neste caso, a relevância dos ensaios *in vitro* deve ser avaliada através de comparações apropriadas com dados *in vivo*. Essas comparações devem considerar as diferenças entre fatores toxicocinéticos operando *in vitro* e *in vivo* (Seibert *et al.*, 1994).

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

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

Estudos de citotoxicidade são realizados para avaliar a viabilidade celular, os quais podem avaliar a função celular através da integridade da membrana e de organelas, conteúdo celular (metabólito ou macromolécula) e atividade enzimática (Loveland *et al.*, 1992; Repetto and Sanz, 1993; Olivier *et al.*, 1995). Neste trabalho foram empregados as seguintes técnicas:

- Exclusão do azul de tripan - avalia a integridade da membrana celular, pois células viáveis excluem este corante (Renzi *et al.*, 1993).
- Redução do MTT [brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio] - avalia a função mitocondrial através da atividade de enzimas como a succinato desidrogenase (Mosmann, 1983).
- Atividade das fosfatases - dá indicação do metabolismo celular em relação ao metabolismo de fosfato (Aoyama *et al.*, 2000).

1.7. Apoptose

Apoptose pode ser definida como morte celular geneticamente programada, processo importante na manutenção da homeostasia do tecido e órgão, a qual pode ser induzida via receptor de morte (receptores da família do fator de necrose tumoral - TNF) ou por estimulação genotóxica provocada por xenobióticos, radicais livres, radiação UV e indisponibilidade de fatores de crescimento (Uren and Vaux, 1996).

A morte celular pode ocorrer por apoptose ou necrose, dependendo do estímulo, intensidade e tipos celulares (Melo *et al.*, 2000). No entanto, a necrose está associada à injúria celular ou tecidual (Martin, 1993), seguida de uma falha geral da regulação homeostásica. Enquanto células que morrem por necrose, (lesão física, mecânica, congelamento, calor ou agentes químicos) expressam, de início, edema celular seguido de um padrão de desintegração estrutural que se espalha pela matriz extracelular, provocando reação inflamatória. As células que morrem através de morte celular programada e/ou os corpos apoptóticos são rapidamente fagocitados pelas células vizinhas ou macrófagos, sem deixar resquícios. A exposição da fosfatidilserina tem importantes implicações funcionais, este lipídeo que normalmente se encontra na parte interna da membrana plasmática, é translocado para a parte externa da membrana (perda da assimetria) e apresenta importante papel no reconhecimento da célula apoptótica por células vizinhas ou macrófagos. No entanto, neste processo não ocorre extravasamento do conteúdo intracelular e conseqüente resposta inflamatória (Allen *et al.*, 1997).

As células que morrem por apoptose, usualmente sofrem outras mudanças morfológicas além da perda da assimetria, incluindo condensação nuclear, alteração citoplasmática e fragmentação do DNA (Wang *et al.*, 1999). Em vista disso, a apoptose é comumente o objeto de intensas pesquisas devido a sua ocorrência durante neoplasias em resposta a quimioterapia contra o câncer e radiação (Melo *et al.*, 2000).

Um das mudanças mais tardias que denotam um comprometimento irreversível da morte celular, é a ativação de endonucleases dependente de cálcio associado à fragmentação do DNA (Wyllie, 1980). Sabe-se que a translocação da fosfatidilserina ocorre antes da fragmentação do DNA, mas não se sabe o tempo exato.

O marcador bioquímico da apoptose é mediado por endonuclease que cliva regiões do DNA e esta enzima gera inicialmente fragmentos subcromossomais de 50-300kbp, e subsequente fragmentos de DNA mono ou oligo-nucleossomais que são múltiplos de 200pb (Allen *et al.*, 1997; Dwall and Wyllie, 1986).

2. OBJETIVOS

As quinonas normalmente podem alterar o estado redox celular. O objetivo geral deste trabalho, foi verificar a possível relação entre a inibição das proteínas tirosina fosfatases, a ação citotóxica e a indução da diferenciação das células HL60 por estes compostos. Para isto, foram traçados os seguintes objetivos:

1. Avaliar a citotoxicidade da hidroquinona e tetrahidroquinona sobre células HL60, utilizando diferentes parâmetros de viabilidade celular;
2. Correlacionar a citotoxicidade das quinonas com a atividade das proteínas tirosina fosfatases;
3. Verificar a capacidade de indução da diferenciação das células HL60 pelas quinonas;
4. Analisar o estado redox das células HL60 tratadas com quinonas;
5. Avaliar a fragmentação do DNA.

3. METODOLOGIA

3.1. Materiais

A linhagem de células de leucemia promielocítica humana (HL60), foi gentilmente cedida pelos Prof^{es}. Rui Curi e Valdemir Colleone, da Universidade de São Paulo (USP).

Tetrahydroquinona e hidroquinona foram adquiridas da Sigma Co.

3.2. Métodos

3.2.1. Cultura das células HL60

As células HL60 foram mantidas em cultura contínua, através de repiques periódicos, após atingirem uma densidade de aproximadamente 1×10^6 células/mL. O cultivo foi realizado em meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute), suplementado contendo glutamina 0,200g/L, antibióticos (100UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina) e 10% de soro fetal bovino.

As células foram incubadas em estufa à 37°C sob atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após o tratamento das células HL60 com as quinonas ou em combinação das mesmas com a glutathione reduzida, foram realizados os ensaios de citotoxicidade como descrito a seguir.

3.2.1. Ensaio de citotoxicidade

A) Função mitocondrial

Após o tratamento das células por 24h, o meio foi removido e trocado por outro, não suplementado, contendo o corante MTT (1mg/mL) e, logo após, as

células foram incubadas à 37°C durante 4 h, (tempo necessário para que houvesse a redução do corante). Em seguida, o meio foi retirado cuidadosamente e, então foi adicionado 1 mL de etanol para solubilização do formazan. As placas foram agitadas por 10 minutos e a absorbância medida no espectrofotômetro à 570 nm (Denizot and Lang, 1986).

B) Indicação do número de células (dosagem de proteínas)

A proteína foi quantificada pelo método de Lowry, como descrito por Hartree (1972), utilizando a albumina de soro bovino (BSA) como padrão. A reação foi iniciada pela adição de 2mL do reagente C a 0,2mL da amostra (após lise das células com o tampão acetato 1 mM, pH 5,5). Após 10 minutos, adicionou-se 0,2mL do reagente Folin-Ciocalteau (fosfomolibdato/fosfotungstato) diluído 1:1 em água deionizada. A leitura da absorbância foi realizada à 660nm após 30 min. da adição do reagente Folin-Ciocalteau.

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

C) Determinação da atividade fosfatásica

O meio de cultura foi retirado cuidadosamente das placas (24 cavidades), e as células foram lisadas com tampão acetato 1 mM, pH 5.5. A placa foi mantida

sob agitação por 20 min. e em seguida adicionado o p-nitrofenilfosfato (pNPP) 5mM como substrato. A reação foi processada sob agitação, durante 30 minutos e então paralisada com a adição de NaOH 1M. A leitura da absorbância (p-nitrofenol) foi medida à 405nm.

3.2.3. Determinação da glutatona reduzida

A concentração de glutatona reduzida (GSH) das células HL60 foi determinada após o tratamento dessas células por 24 horas. As células (2×10^6) foram lavadas com solução fisiológica e lisadas com 2mL de água deionizada.

Aos 2mL do lisado foram adicionados 3mL da solução precipitante [1,67g de ácido metafosfórico glacial, 0,2g de ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) e 30g de NaCl em 100mL de água deionizada]. Após 5 min. à temperatura ambiente, a mistura foi centrifugada e o sobrenadante utilizado para a dosagem da GSH.

O meio de reação continha 1,6mL de tampão Na_2HPO_4 0,2M / pH 8,0, 0,2mL de DTNB 0,5mM [5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzóico)], (2mg em 10 mL de citrato de sódio 1%) e 0,4mL de extrato em um volume final de 2mL. Após 5 minutos, a absorbância foi medida à 412nm. O coeficiente de extinção molar para o cálculo da concentração de GSH reduzida foi de $13,6\text{mM}^{-1}$ (Torsoni and Ogo, 1998; Beutler, 2000).

3.2.4. Determinação da diferenciação celular

As células HL60 tratadas com quinonas foram centrifugadas e ressuspendidas com 100µL de NBT (nitroblue tetrazolium - 4mg/mL) e 100µL de acetato de tetradecanoilforbol (2µg/mL). Após incubação por 20 min. à 37°C, a reação foi paralisada com 200µL de HCl 1M. A mistura foi centrifugada e o formazan (produto de redução do NBT) presente no precipitado, solubilizado com 600µL de dimetilsufóxido. A absorbância medida à 570 nm (Kohroki *et al.*, 1998).

3.2.5. Determinação da fragmentação do DNA

Método da difenilamina modificado por Zhu et al., (1998)

As células (5×10^6 /mL) foram coletadas e lisadas em 250µL de tampão de lise (Tris-HCl - 5mM; triton X 100 - 0,5% e EDTA - 20mM). O lisado foi centrifugado a 5000rpm por 10 minutos para a separação do DNA fragmentado (sobrenadante) da cromatina intacta (precipitado), o sobrenadante foi transferido para um outro tubo e adicionado 20µL de ácido perclórico 6M.

O precipitado contendo o DNA intacto foi dissolvido em 500µL de tampão TE (Tris HCl - 10mM; EDTA - 0,1mM) e tratado com igual volume de ácido tricloro acético 10% e foi centrifugado a 5.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em 250 µL de ácido tricloro acético 5% e a amostra fervida por 15min. e logo após foram adicionados 20µL de ácido perclórico 6 M.

Em todas as amostras foram adicionados 500 µL da seguinte solução: difenilamina (15mg/mL), ácido sulfúrico concentrado (15µL/mL) e acetaldeído

(15µg/mL), esta mistura foi incubada à 37°C por 18h. Após este período a absorbância foi medida à 595 nm.

A porcentagem de DNA fragmentado foi calculada pela fórmula abaixo:

$$\% \text{DNA fragmentado} = \frac{100 \times \text{DNA fragmentado no sobrenadante}}{\text{DNA fragmentado no sobrenadante} + \text{DNA no precipitado}}$$

3.2.6. Efeito das quinonas na atividade fosfatásica

As células (1×10^6 células/mL) foram lavadas duas vezes com solução fisiológica (NaCl 0,9%) em seguida lisadas com tampão acetato 1mM, pH 5,0. O lisado foi centrifugado por 25 min. à 25.000rpm. O sobrenadante foi utilizado para dosagem da fosfatase citoplasmática. O precipitado obtido (membrana) foi ressuspenso no mesmo tampão (1mM), pH 5,0 contendo 0,2% de triton X-100.

As fosfatases obtidas foram utilizadas no ensaio do efeito das quinonas, sendo este experimento realizado com e sem pré-incubação. Também foi verificado o efeito de DTT e GSH na presença e na ausência das quinonas. A atividade enzimática foi determinada utilizando-se p-nitrofenilfosfato (pNPP) 5 mM e tampão acetato 100mM, pH 5,0. A reação foi paralisada com NaOH 1M após 40 minutos e, a absorbância do produto (p-nitrofenol) medida à 405nm (Aoyama *et al.*, 2000).

3.2.7. Análise Estatística

Todos os dados apresentados foram expressos em média \pm desvio padrão. Os níveis de significância entre as amostras, foram analisados segundo a 'Análise de Variância' (ANOVA), através do software SAS utilizando como base $p < 0,05$ indicando significância. Correlações entre as diversas variáveis analisadas foram obtidas através do Teste de Dunnett's e Teste Tukey's Studentized Range (HSD).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo de inibição enzimática é uma ferramenta útil para se determinar o principal tipo de uma enzima específica presente em um extrato celular (MacKintosh and MacKintosh, 1994; Bernier and Wang, 1996).

A caracterização cinética das fosfatases realizada previamente por nosso grupo de pesquisa, demonstrou que a proteína fosfatase predominante nas células HL60 se classifica como uma proteína tirosina fosfatase. A fosfatase obtida das células HL60 hidrolisou eficientemente a tirosina fosfato (80%), indicando portanto, que esta enzima pode ser uma PTP (Cuncic *et al*, 1999).

Segundo Freire (2002), a fosfatase obtida das células HL60 foi significativamente inibida pelo vanadato e pelo pCMB. A inibição apresentada pelo pCMB, sugere que esta fosfatase é dependente do grupamento SH para catalisar a reação, pois este composto se liga ao referido grupamento, impedindo-o de participar da catálise (Laidler *et al.*, 1982; Tracey, 2000). A inibição da fosfatase pelo cobre reforça a existência de grupamentos SH essenciais para a catálise (Cuncic *et al*, 1999; Tracey, 2000). O fluoreto inibiu somente 40% da atividade enzimática. A fosfatase das células HL60 foi completamente inibida pelo m-vanadato e pervanadato, o que reforça a possibilidade desta fosfatase ser uma PTP, uma vez que estes inibidores são praticamente específicos desta classe de fosfatases (Swarup *et al.*, 1982; Enz and Pombo Villar, 1997).

4.1. Efeito da *hidroquinona* na atividade das fosfatases das células HL60

O efeito da hidroquinona foi avaliado sobre as fosfatases isoladas do citosol e de membrana. A HQ não apresentou efeito na atividade da fosfatase citosólica após pré-incubação de 20 minutos. No entanto, foi observado inibição de aproximadamente 25% ($p=0,039$) da atividade enzimática, quando o experimento foi realizado sem pré-incubação (Figura 1A). Estes resultados sugerem que a HQ interage com o complexo enzima-substrato ou em outra região da enzima, que não o sítio ativo, comprometendo a catálise.

Na fração de membrana, a atividade fosfatásica foi reduzida em 30 ($p<.0001$) e 15% ($p=0,159$) quando a enzima foi pré-incubada e sem pré-incubação com a HQ (500 μ M), respectivamente (Figura 1B).

De acordo com Rao (1995) para que a HQ exerça efeito tóxico, a mesma precisa ser metabolizada, *in vivo*, produzindo espécies reativas de oxigênio e a benzoquinona que podem alterar a função de macromoléculas e consequentemente, a função celular.

Estes resultados reforçam a hipótese que o efeito da HQ depende do sistema biológico para sua metabolização e assim seus produtos atuarem sobre macromoléculas incluindo as proteínas tirosina fosfatases. Freire (2002) demonstrou a prevalência das PTPs no extrato das células HL60, e também que compostos que podem formar adutos de Michael ou alteram o estado redox celular direta ou indiretamente afetam a atividade destas fosfatases. Todas as PTP apresentam resíduos SH no sítio ativo e, por isso, agentes oxidantes e alquilantes

destes grupos (sulfidrilas) são inibidores irreversíveis desta família de proteínas fosfatases (Zhang and Dixon, 1993; Cuncic *et al*, 1999).

Como as fosfatases predominantes nas células HL60 são proteínas tirosina fosfatases, esperava-se uma acentuada inibição pela HQ, uma vez que estas enzimas são altamente sensíveis a agentes que causam estresse oxidativo. Portanto, podemos hipotetizar que o referido composto precisa ser transformado em um metabólito tóxico, para então, inibir de forma significativa as fosfatases presentes no extrato celular.

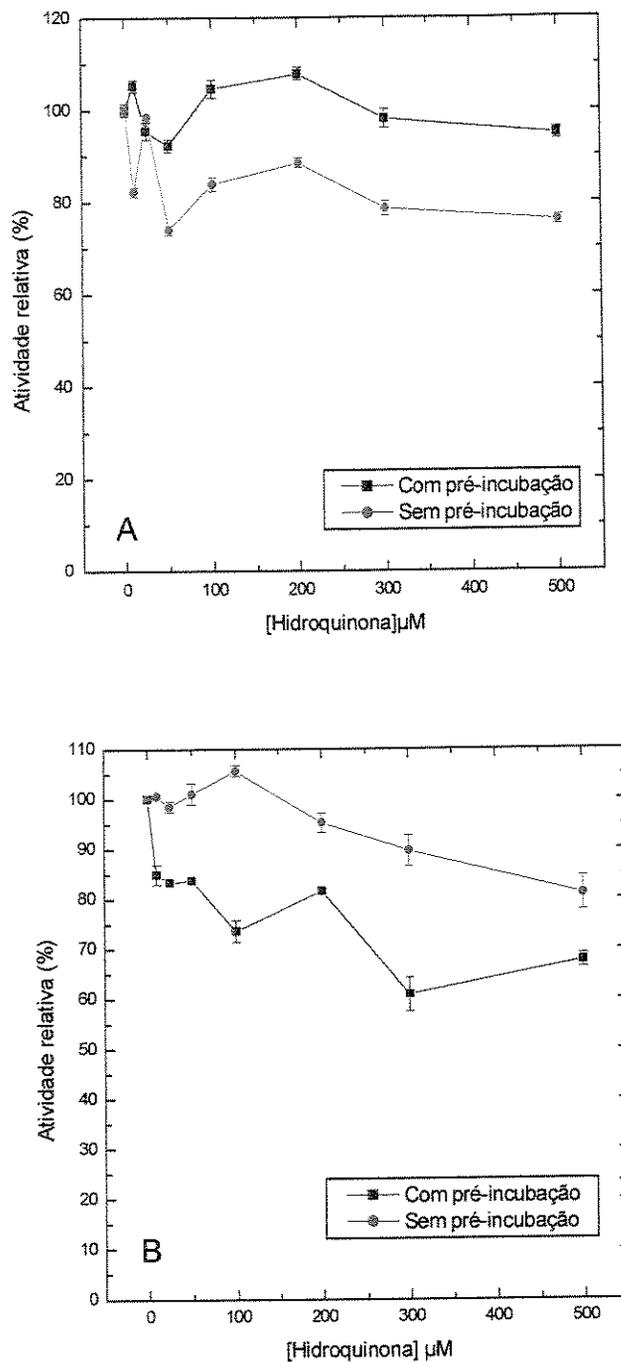


Figura 1. Efeito da hidroquinona na proteína tirosina fosfatase de citosol (A) e membrana (B) das células HL60. A concentração da HQ foi variada de 0–500 μM. A atividade da enzima foi determinada com e sem pré-incubação por 20 minutos com a HQ e determinada como descrito no método 3.2.6.. O experimento foi realizado três vezes em triplicata e os resultados nos gráficos representam as suas médias e os desvios padrões ($p < 0.05$ comparados com o controle).

Na presença da concentração máxima (500 μM) da HQ utilizada no experimento anterior, foi verificado o efeito de agentes redutores (GSH e DTT) na inibição das enzimas por esta quinona. Estes agentes redutores não apresentaram efeito significativo na atividade da fosfatase citosólica. No entanto, preveniram parcialmente a inibição da fosfatase pela HQ (Figura 2A). Isto pode estar relacionado com a dependência da atividade da glutathione S-transferase na formação do aduto quinona-SG. Nas condições experimentais, provavelmente a transferase não exibiu atividade, uma vez que, se a mesma estivesse ativa, a fosfatase exibiria uma atividade de 100%.

A Figura 2B mostra que a inibição da fosfatase de membrana pela HQ foi prevenida na presença da GSH e do DTT.

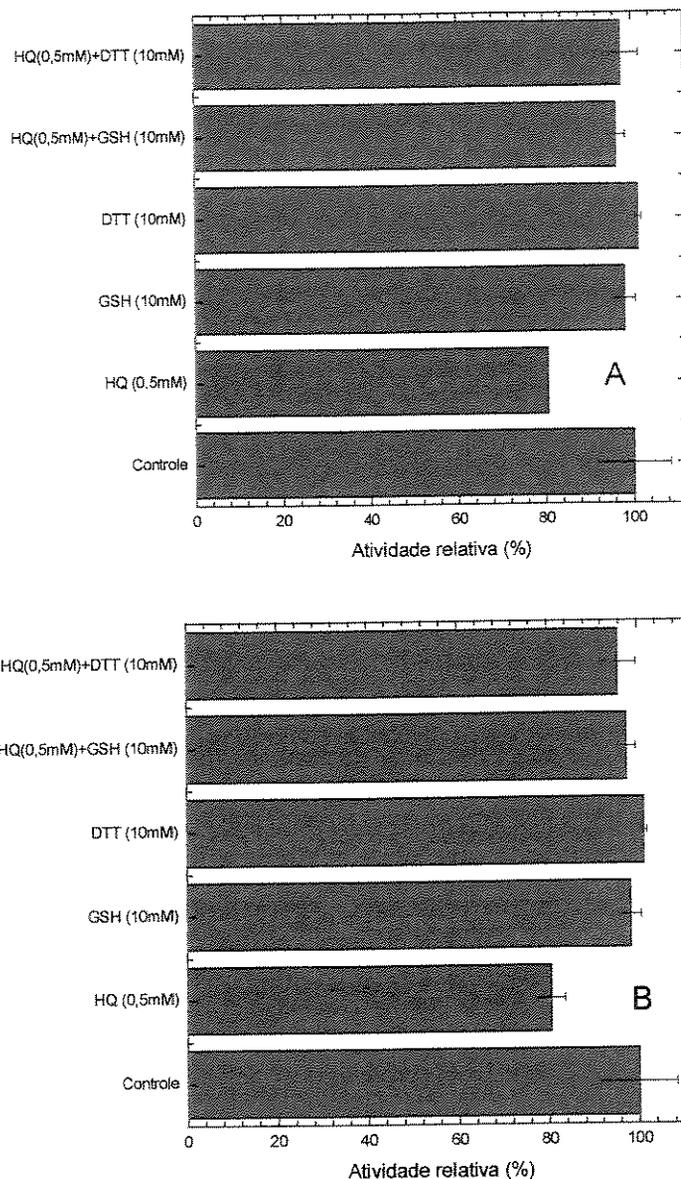


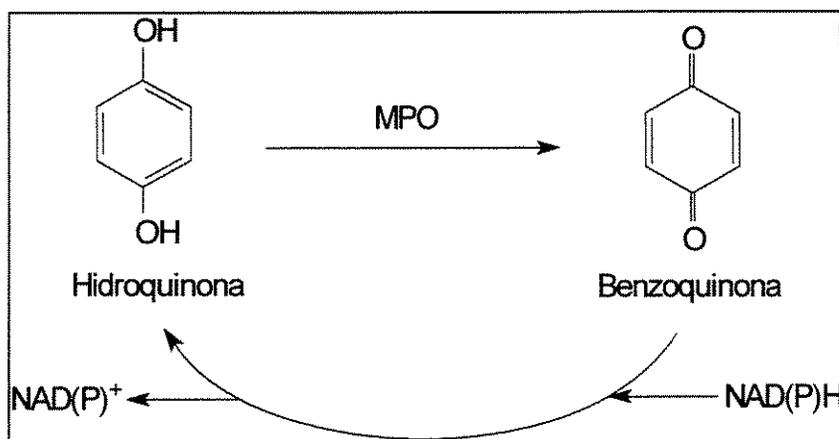
Figura 2. Efeito de antioxidantes na inibição da proteína tirosina fosfatase citosólica (A) e de membrana (B) das células HL60 pela HQ. A enzima foi incubada juntamente com GSH ou DTT e suas combinações com a HQ. A atividade enzimática foi determinada de acordo com métodos 3.2.6.. O experimento foi realizado três vezes em triplicata e os resultados nos gráficos representam as suas médias e os desvios padrões $p < 0.05$ comparados com o controle.

4.2. Avaliação da citotoxicidade e do estado redox das células HL60 tratadas com *hidroquinona*

A citotoxicidade das quinonas foi avaliada através de três parâmetros de viabilidade celular: redução do MTT, conteúdo de proteína total e atividade fosfatásica. Foram obtidos os seguintes valores de IC₅₀: 20µM e 50µM, para a atividade fosfatásica e redução do MTT, respectivamente (Figura 3A). Analisando em conjunto este resultado como mostrado na Figura 1A e 1B, o qual mostrou o efeito da HQ diretamente na fosfatase, torna-se evidente a importância da metabolização da HQ para sua ação inibitória. O mesmo também ocorre para alteração da função mitocondrial, pois a produção de espécies reativas de oxigênio causam alteração do fluxo de elétrons na cadeia respiratória, o qual foi claramente mostrado pela diminuição da redução do MTT.

Quando as células foram tratadas com a HQ em presença do GSH (10 mM), a toxicidade da droga diminuiu quando analisamos o parâmetro fosfatase, o IC₅₀ foi 80µM para fosfatase e para redução do MTT foi o mesmo 50µM (Figura 3B). Este resultado mostra que a HQ causa uma grande alteração redox celular, após ser metabolizada, que não é revertida mesmo com a presença da glutathione reduzida na concentração de 10 mM.

Alguns autores têm demonstrado que a hidroquinona após metabolizada, causa depleção da GSH e pode servir como acceptor de Michael provocando alteração de várias macromoléculas (Eckert *et al.*, 1990; O'Brien, 1991; Bolton *et al.*, 2000).



Hachiya e colaboradores (1999), demonstraram que as células HL60 têm altos níveis de mieloperoxidase (MPO), essa enzima converte a hidroquinona em benzoquinona como mostrado na reação acima.

A benzoquinona inibe a replicação do DNA e causa dano à molécula do DNA por alquilar a guanina (O'Brien, 1991; Soucek *et al.*, 2000). Portanto, o efeito citotóxico da HQ sobre as células HL60 é devido à sua ação inespecífica sobre macromoléculas, a qual é dependente de metabolização.

Outro ponto que deve ser ressaltado é que a hidroquinona em células aeróbicas pode sofrer auto-oxidação em presença do O_2 , tendo como produtos a semiquinona e superóxido. Estes produtos sofrem reações em cadeia que culminam na produção da benzoquinona e radical hidroxil (Rao, 1995; Sun, 1996; Soucek *et al.*, 2000).

A progressão do ciclo celular é controlada por quinases dependentes de ciclinas (cdks), as quais são moduladas covalentemente por fosforilação e desfosforilação. A fosfatase Cdc25 desfosforila essas enzimas tornando-as ativas,

desta forma ocorrendo progressão do ciclo celular (Ham *et al.*, 1998). Como *in vitro* foi observada uma diminuição do número de células e inibição da fosfatase, pode-se sugerir que a morte das células HL60 também foi devido à interrupção do ciclo celular pela inibição da Cdc25 (proteína tirosina fosfatase dual) pelos produtos do metabolismo/oxidação da hidroquinona, já que esta enzima depende do grupamento -SH para catálise. Alguns autores demonstraram que as quinonas podem inativar a fosfatase Cdc25 e conseqüentemente afetar a progressão do ciclo celular (Wu and Sun, 1999).

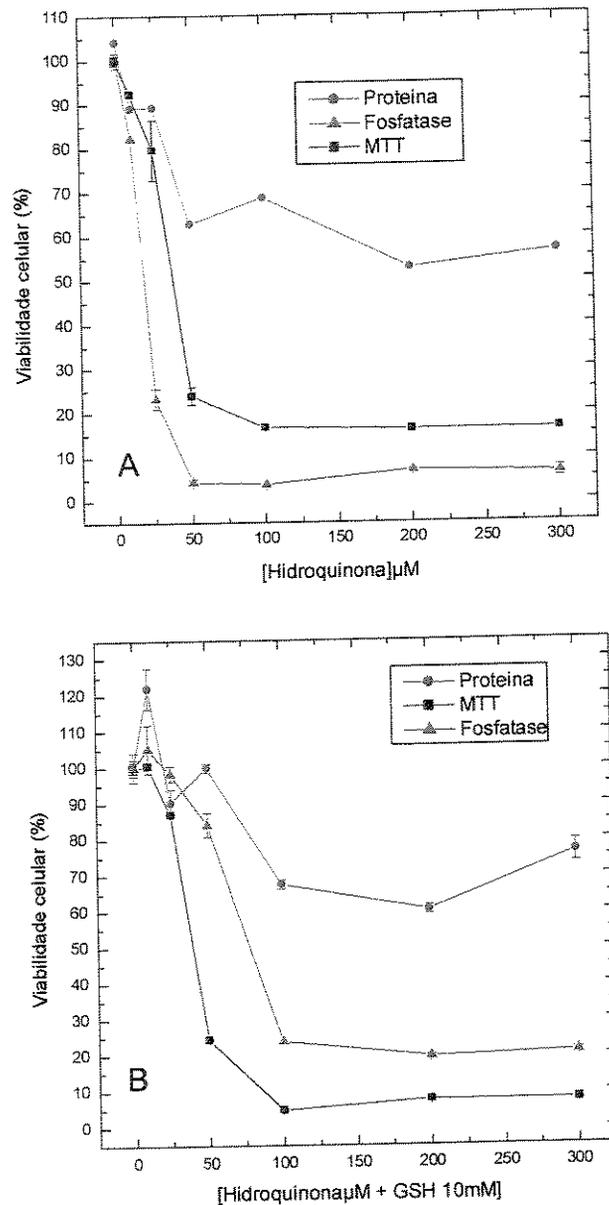


Figura 3. Efeito da hidroquinona na viabilidade das células HL60. A viabilidade das células HL60 foi avaliada através dos seguintes parâmetros: dosagem da atividade fosfatásica (405nm), quantificação de proteína (660nm) e redução do MTT (570nm). As figuras A e B mostram a viabilidade das células tratadas com HQ e HQ em presença de GSH, respectivamente, por 24 horas. Na ausência do composto, os parâmetros foram considerados como 100%. Os experimentos foram realizados em placa de 24 poços três vezes em triplicata e os pontos mostrados nos gráficos representam a média e desvio padrão ($p < 0.05$ comparados com o controle).

A determinação do conteúdo de GSH nas células HL60 tratadas com HQ mostrou uma diminuição da concentração deste antioxidante, mesmo quando as células foram tratadas com a HQ juntamente com GSH (Figura 4). Este resultado corroborou os dados da literatura que mostram que quinonas em geral causam depleção de GSH (Li *et al.*, 1994).

Segundo Wu e colaboradores (1999), o estresse oxidativo gerado pelas quinonas geram espécies reativas de oxigênio e direta arilação de tióis celulares resultando na depleção de GSH e inibindo proteínas dependentes de grupamentos sulfidrilas. A diminuição do conteúdo de GSH poderia ser devido à oxidação dos grupos sulfidrilas ou inibição da glutathiona redutase. A concentração de GSH das células HL60 foi $1,4 \text{ nM} \pm 0,018/\text{célula}$ estando de acordo com os dados encontrados na literatura (Li *et al.*, 1994; Xu and Thornalley, 2001).

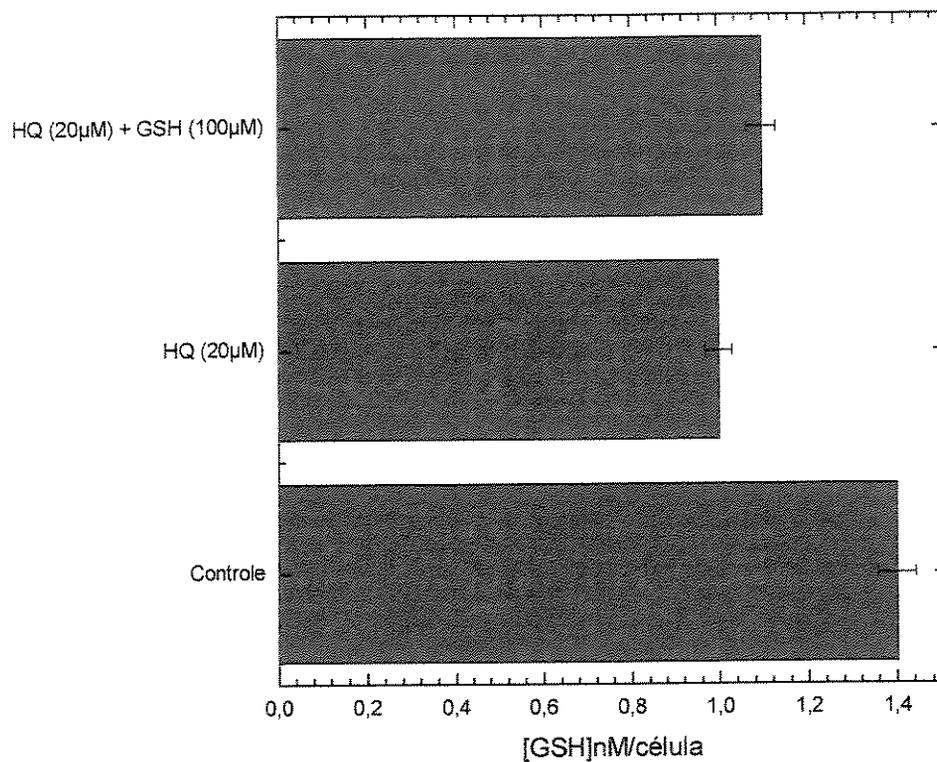


Figura 4. Determinação da glutatona reduzida nas células HL60 tratadas com a HQ. A concentração de glutatona foi determinada de acordo com o método 3.2.3 utilizando como controle células não tratadas. As concentrações de HQ e GSH exógeno foram iguais a 20µM e 100µM, respectivamente. Os experimentos foram realizados em triplicata e os pontos mostrados nos gráficos representam a média e desvio padrão e $p < 0.05$ comparados com o controle.

4.3. Efeito da *Tetrahidroxiquinona* na atividade das fosfatases das células HL60

As PTPs do citosol das células HL60 foram inibidas pela THQ em 55% e 45% ($p < .0001$) com e sem pré-incubação, respectivamente. As fosfatases da membrana tiveram inibição de 40% ($p < .0001$) quando foram pré-incubadas e de 50% ($p < .0001$) sem-pré incubação (Figura 6A e B). A tetrahidroxiquinona, diferentemente da hidroquinona, apresentou maior efeito inibitório sobre estas fosfatases.

Brinkworth and Fairlie (1995) demonstraram que a tetrahidroxiquinona apresentou efeito inibitório sobre a proteinase do vírus da imunodeficiência humana com valor de IC_{50} igual a 575 μ M. Segundo estes autores, a inibição da proteinase pela THQ foi devido à formação de pontes de hidrogênio da mesma (devido aos grupamentos hidroxilas) com resíduos de ácido aspártico.

A família das proteínas tirosina fosfatases apresentam na sítio catalítico uma sequencia assinatura que contém aminoácidos essenciais para catálise, dentre os quais, o ácido aspártico desempenha importante função para a interação enzima substrato de forma favorável ao mecanismo catalítico como mostrado na esquema. Portanto, a inibição das proteínas tirosina fosfatases pela THQ, pode ter sido devido à interação deste composto com o resíduo de ácido aspártico presente no sítio ativo, que é essencial para catálise (Zhang, 2001), como mostrado na figura 5.

Quando a THQ foi utilizada juntamente com agentes redutores (GSH e DTT) a atividade da enzima foi mantida (Figura 7A). Como ambos são agentes redutores estão mantendo o estado redox da enzima aumentando. A THQ juntamente com o DTT ativou 60% a atividade enzimática, essa interação pode estar modificando a conformação da enzima facilitando a ligação com o substrato. No entanto, de acordo com o resultado anterior podemos sugerir que neste caso, a prevenção da inibição da enzima pelo DTT e GSH não foi devido à ação redutora e sim, por permitir a formação de pontes de hidrogênio entre grupamentos específicos destes agentes redutores (carboxílicos e hidroxilas) e a THQ. Se compararmos os resultados da atividade da fosfatase do extrato celular quando utilizamos as quinonas podemos notar que a THQ teve um maior efeito inibitório da fosfatase do que a HQ. Para HQ é necessário haver metabolização para que ela possa ter efeito inibitório sobre as fosfatases (Hachiya et al., 1999).

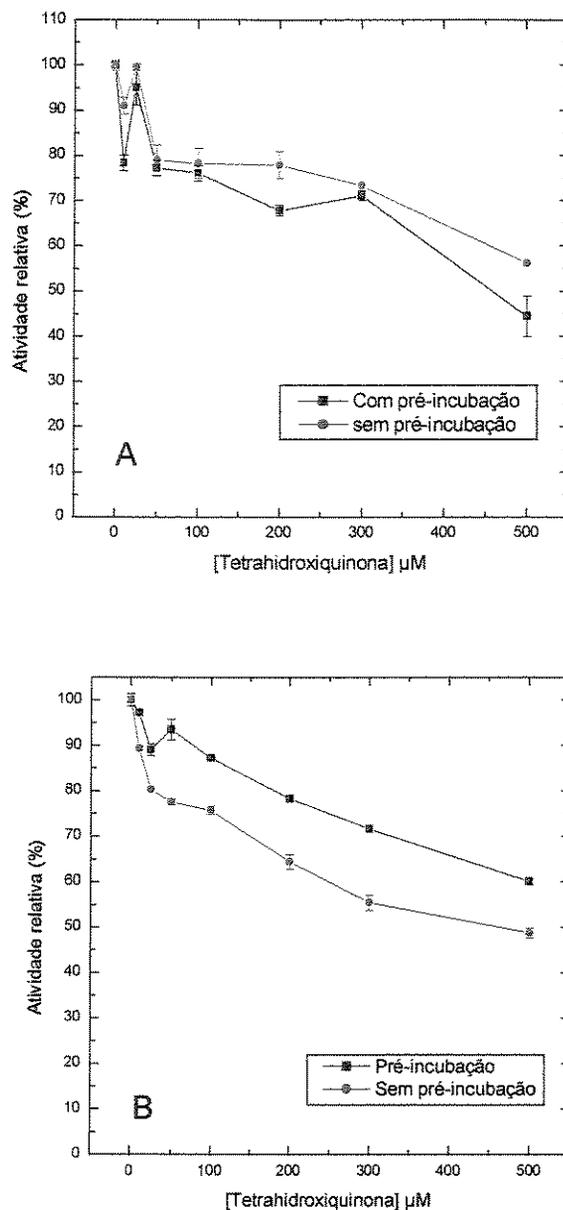


Figura 6. Efeito da tetrahydroxiquinona na atividade da proteína tirosina fosfatase das células HL60 de citosol (A) e membrana (B). A concentração da THQ foi variada de 0-500μM e atividade foi determinada para as fosfatases do citosol e membrana sem e com pré-incubação (20 minutos). A atividade da enzima foi determinada como descrito no método 3.2.6.. O experimento foi realizado três vezes em triplicata e os resultados nos gráficos representam as suas médias e os desvios padrões ($p < 0.05$ comparados com o controle).

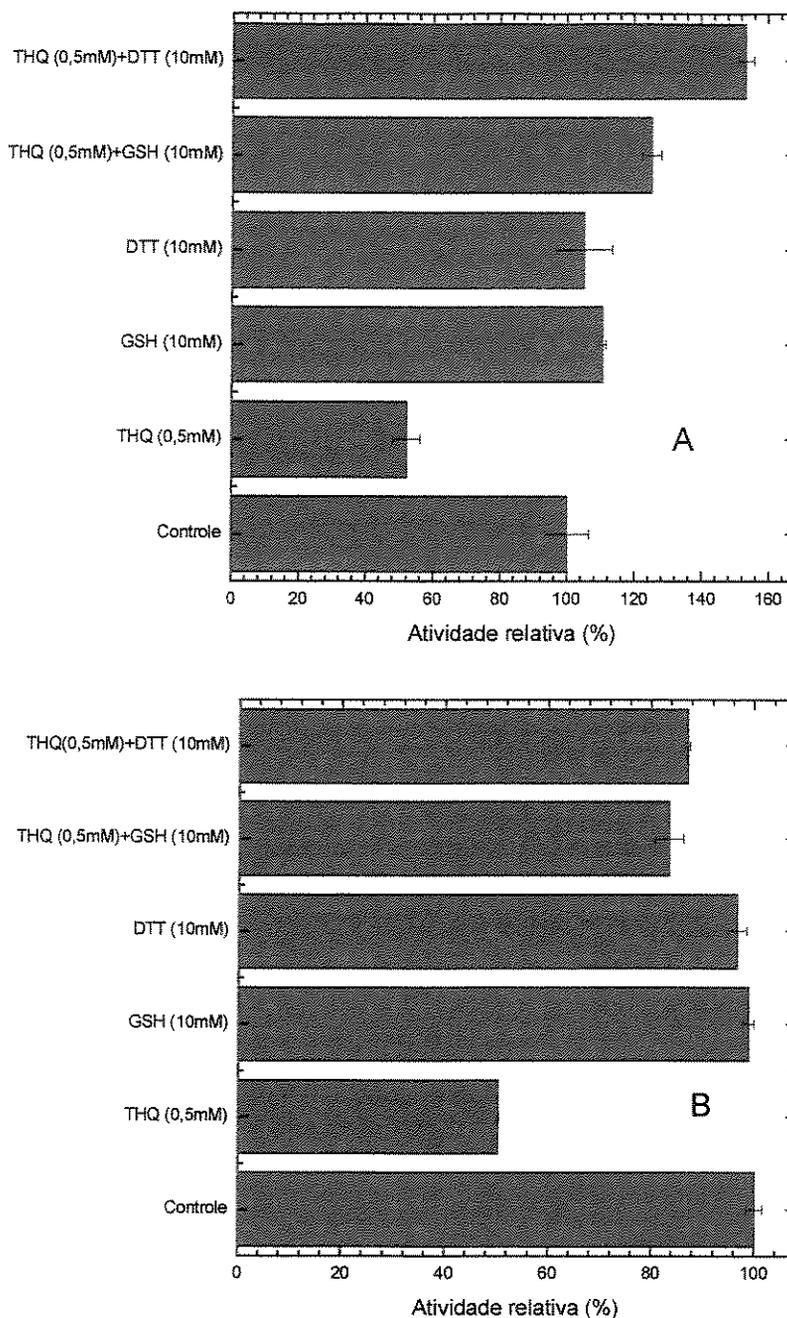
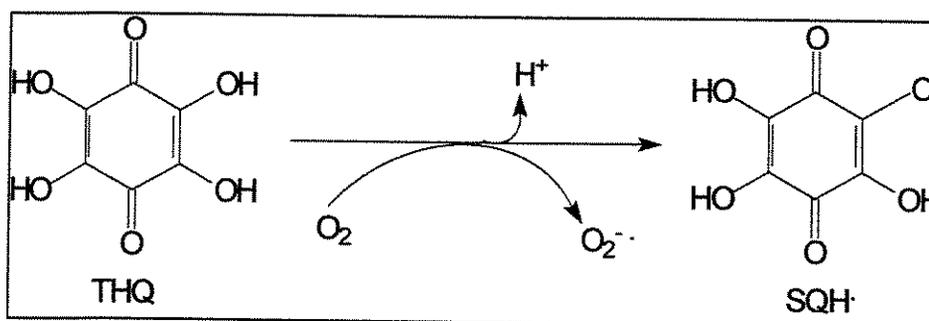


Figura 7. Efeito de antioxidantes na inibição da proteína tirosina fosfatase citosólica (A) e de membrana (B) das células HL60 pela THQ. A enzima foi incubada juntamente com GSH e DTT foi determinada de acordo com métodos 3.2.6.. O experimento foi realizado três vezes em triplicata e os resultados mostrados nos gráficos representam as suas médias e os desvios padrões ($p < 0.05$ comparados com o controle).

4.4. Avaliação da citotoxicidade e do estado redox das células HL60 tratadas com *Tetrahidroquinona*

Os resultados de citotoxicidade apresentados pela THQ sobre as células HL60 foram similares aos encontrados para a HQ. De acordo com o perfil das curvas da redução do MTT e produção do pNP, foi obtido o mesmo valor de IC₅₀ (50µM) - Figura 8A.

A maior toxicidade da THQ observada no sistema biológico é devido a sua auto-oxidação, gerando intermediários como ânion superóxido e radical semiquinona, como mostrada na reação abaixo:



O efeito inibitório significativo da THQ sobre a atividade da fosfatase, sugere que a ação antitumoral das quinonas pode ser devido à inibição das proteínas tirosina fosfatases, as quais são importantes para a progressão do ciclo celular.

A diminuição do conteúdo de proteínas como mostrado na Figura 8A, indica decréscimo do número de células. Este resultado mostra que houve inibição da

proliferação celular, reforçando mais uma vez a importância das proteínas tirosina fosfatases na proliferação das células HL60.

Nossos resultados mostraram que a THQ também apresenta efeito citotóxico na função mitocondrial, provavelmente devido à inibição das desidrogenases e alteração da integridade mitocondrial.

Na presença do GSH houve um aumento nos valores de IC₅₀: 160µM e 240µM para redução MTT e atividade fosfatase, respectivamente. Esses resultados confirmam o efeito protetor que o GSH exerce contra o efeito oxidante da THQ.

De acordo com os resultados do estudo da citotoxicidade das quinonas sobre as células HL60, a THQ foi menos tóxica que a HQ; isto foi devido à diversos fatores tais como: produção de EROS, após metabolização da HQ, formação de adutos com macromoléculas ou conjugação com a GSH reduzida. A GSH reduzida apresentou efeito diferenciado quando na presença das quinonas. Quando as células foram tratadas com a HQ em presença da GSH reduzida, não houve alteração dos valores do IC₅₀, ao passo que, quando tratadas com a THQ e GSH reduzida houve um aumento dos valores de IC₅₀.

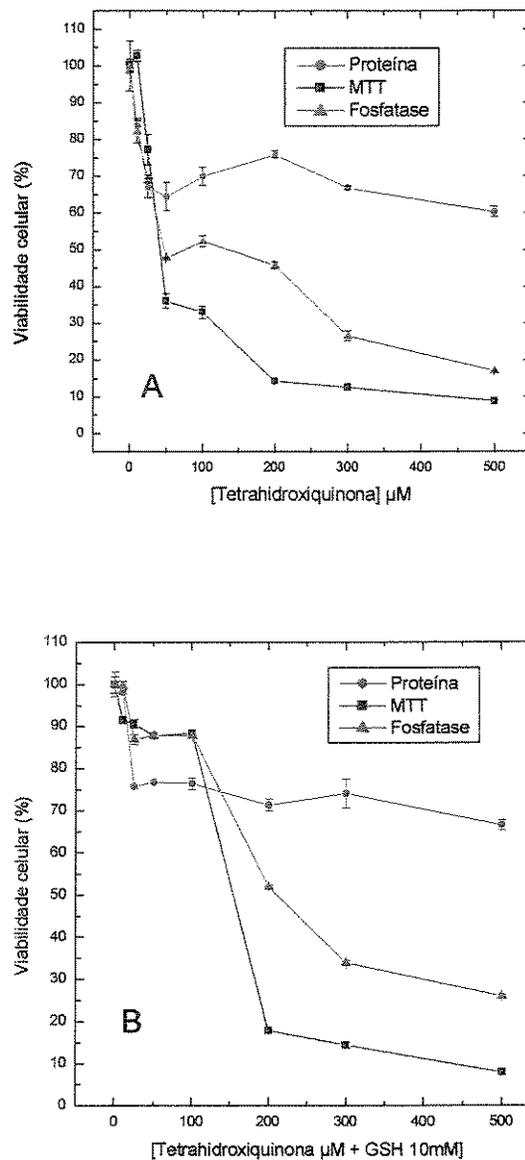


Figura 8. Efeito da tetrahydroxiquinona na viabilidade das células HL60. A viabilidade das células HL60 foi avaliada através dos seguintes parâmetros: dosagem da atividade fosfatásica (405nm), quantificação de proteína (660nm) e redução do MTT (570nm). Na ausência do composto, os parâmetros foram considerados como 100%. Os experimentos foram realizados em placas de 24 poços, três vezes em triplicata e os pontos mostrados nos gráficos, representam a média e desvio padrão ($p < 0.05$ comparados com o controle).

A determinação do conteúdo de GSH nas células tratadas com THQ, mostrou que houve estímulo na produção deste antioxidante, o qual foi prevenido quando as células foram tratadas com THQ em conjunto com a GSH (Figura 9).

A elevação do conteúdo de GSH pode resultar de uma resposta da célula aos níveis de oxidantes que estão causando injúria (Choi *et al.*, 1997). Portanto, nossos resultados reforçam que células tratadas com THQ apresentam como resposta metabólica aumento da síntese de GSH. Isto indica que o ciclo redox da THQ, causa elevação dos níveis intracelulares de GSH, como nas células L2 um estresse oxidativo subletal, exercidos por quinonas parece servir como um sinal para elevar os níveis intracelulares de GSH (Choi *et al.*, 1997).

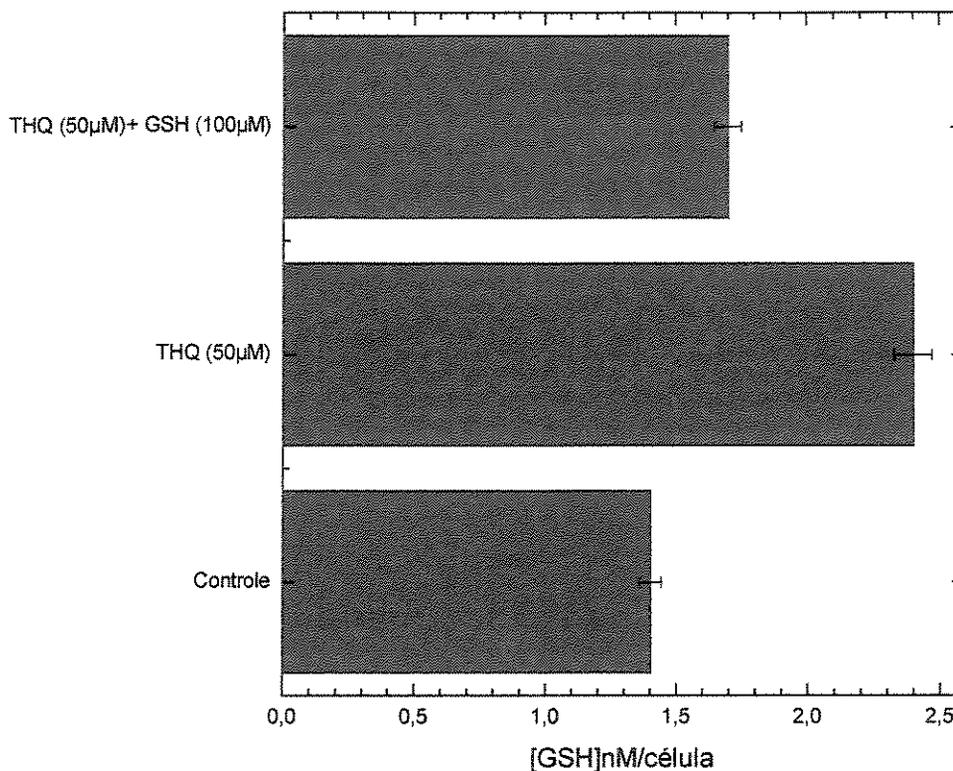


Figura 9. Determinação da glutatona nas células HL60 tratadas com tetrahidroxiquinona. A concentração de glutatona foi determinada de acordo com o método 3.2.3., utilizando como controle células não tratadas. As concentrações de THQ e GSH exógeno foram iguais a 50µM e 100µM, respectivamente. Os experimentos foram realizados em três vezes em triplicata. Os pontos mostrados nos gráficos representam a média e desvio padrão ($p < 0.05$ comparados com o controle).

4.5. Avaliação da diferenciação e apoptose induzida pelas quinonas nas células HL60

Chenáis e colaboradores (2000) demonstraram que algumas drogas antitumorais pertencentes a família das quinonas, além de exercerem seus efeitos citotóxicos através da alteração da função e estrutura mitocondrial e produção de radicais livres, são potentes indutores da diferenciação de células da leucemia. Estudos mostraram também que os radicais livres estão envolvidos na indução irreversível da diferenciação, seja por uma parada do crescimento celular ou por estarem envolvidos na via de sinalização responsável pela diferenciação.

Células HL60 quando diferenciadas em monócitos e neutrófilos produzem superóxido, o qual reduz o corante NBT a formazan quando estimuladas pelo TPA, este parâmetro é utilizado para avaliar a capacidade funcional das células diferenciadas.

A atividade de redução do NBT foi observada após 6, 24 e 31 horas após incubação das células HL60 com as quinonas e o máximo de atividade foi observado após 24 horas de tratamento. A capacidade de redução do NBT (positividade de diferenciação) foi 83 e 103% ($p < .0001$) para THQ e HQ, respectivamente. Este resultado mostra que estas quinonas são equivalentes ao DMSO na capacidade de indução da diferenciação.

Após 31 horas de tratamento não foi observada diferenciação significativa, isto pode ser explicado pela necessidade da síntese de diversas proteínas envolvidas na via de diferenciação e conseqüentemente necessidade de um tempo específico para que isto ocorra. Recentemente, vários autores têm

demonstrado que muitos fatores de transcrição são ativados na presença de compostos que são capazes de induzir diferenciação (Shin *et al.*, 1999; Das *et al.*, 2000; Kang *et al.*, 2001).

A ausência de diferenciação significativa após 31 horas pode ser devido à morte celular expressiva, pois células que estão metabolicamente inviáveis são incapazes de reduzir o corante NBT, pois na presença do TPA ocorre um “burst” respiratório com grande produção de superóxido (Breitman, 1990). No entanto, concomitantemente ao “burst” respiratório, a via das pentoses está expressivamente ativa. Portanto, há necessidade que as células estejam viáveis.

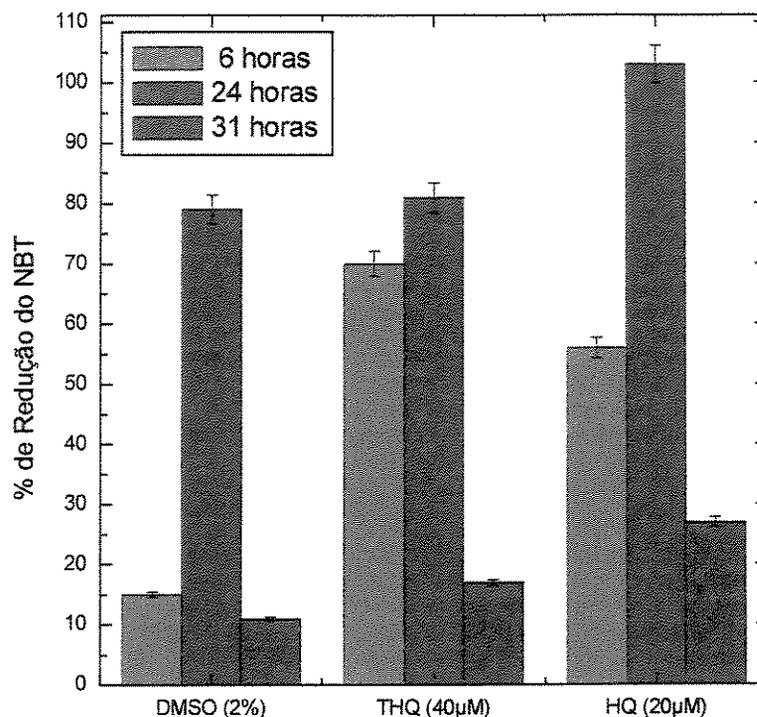


Figura 10. Diferenciação celular nas células HL60 tratadas com DMSO, THQ e HQ. As células foram tratadas com DMSO, THQ, HQ por 24, 31 e 65 horas de acordo com o método descrito 3.2.4.. O controle foi considerado 0% de diferenciação (dados não mostrados) e o DMSO controle positivo. As células foram tratadas com 40 e 20 μM de THQ e de HQ, respectivamente. Os experimentos foram realizados em três vezes em triplicata. Os pontos mostrados nos gráficos representam a média e desvio padrão ($p < 0.05$ comparados com o controle).

A análise quantitativa da fragmentação do DNA das células HL60 pelas quinonas foi realizada após tratamento por 24 horas na ausência e presença da glutathiona reduzida. As células não tratadas apresentaram aproximadamente 9% de fragmentação do DNA. Na presença da HQ e THQ foi observada fragmentação do DNA de 35 ($p < .0001$) e 24% ($p = 0,0123$), respectivamente.

As EROS podem causar fragmentação do DNA por duas vias dependendo da concentração. Quando estas espécies são produzidas em altas concentrações ocorre reação das mesmas com as ligações fosfodiésteres e com as bases, principalmente com a guanina do DNA e, quando estas espécies são produzidas em baixa quantidade, ocorre sinalização da apoptose, que culmina na ativação de endonucleases e consequente fragmentação do DNA (Allen and Tresini, 2000; Lopaczynski and Zeisel, 2000).

O tratamento das células com as quinonas juntamente com a GSH, causou inibição da fragmentação do DNA. Este resultado reforça a importância do estado redox celular na resposta frente ao estresse causado pelas quinonas após metabolização ou auto-oxidação. Segundo Verhaegen e colaboradores (1995), os antioxidantes são potentes inibidores de apoptose e são capazes de interferir em processos apoptóticos.

Fischer-Nielsen e colaboradores (1995), demonstraram que a exposição de hepatócitos de rato a menandiona causou fragmentação internucleossomal no DNA pela presença do radical OH^{\bullet} .

5. CONCLUSÕES

As quinonas utilizadas neste trabalho (HQ e THQ) tiveram efeito inibitório sobre as fosfatases isoladas de membrana e citosol das células HL60, no entanto, o efeito da HQ foi menor do que o esperado. Porém, este resultado confirmou que a HQ necessita do metabolismo celular para apresentar seu efeito citotóxico e também indução do estresse oxidativo. A THQ apresentou maior efeito inibitório devido à sua característica química de poder formar pontes de hidrogênio com o resíduo do ácido aspártico essencial para a catálise da enzima e, não pela ação oxidante.

As quinonas apresentaram efeito tóxico sobre as células HL60 com valores de IC₅₀ diferentes para MTT e atividade fosfatásica. A GSH não diminuiu o efeito citotóxico da HQ, no entanto, na presença da THQ foi observada diminuição do efeito citotóxico.

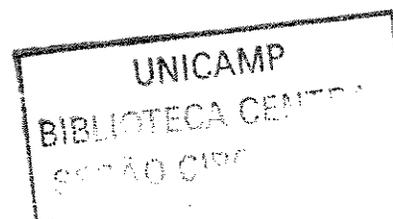
As quinonas induziram a diferenciação celular equivalentemente ao DMSO, composto usualmente utilizado como controle positivo nestes estudos. Além disto, foi observada fragmentação do DNA quando as células HL60 foram tratadas com as duas quinonas. Este resultado indicou a capacidade de indução da apoptose das células HL60 por estes compostos.

Como conclusão final deste trabalho, o efeito citotóxico das quinonas sobre as células HL60 foi inespecífico:

- alteração do estado redox celular;
- alteração da função mitocondrial;

- inibição de enzimas como fosfatases.

Para finalizar, vale ressaltar que as PTPs são alvo para estudo do tratamento do câncer por participarem de vários eventos biológicos. Portanto, o estudo de inibidores dessas proteínas tem despertado interesse. Além disto, nossos resultados mostraram que as quinonas podem ter potencial uso no tratamento da leucemia, já que induziram diferenciação e morte celular por apoptose. A indução da diferenciação de células neoplásicas é uma característica desejável para fármacos com atividade antitumoral, uma vez que a célula diferenciada apresenta características morfológicas e funcionais tipo células normais.



6. PERSPECTIVAS

O presente trabalho gerou várias perspectivas interessantes para um melhor entendimento das vias de sinalização envolvidas na citotoxicidade, diferenciação e apoptose causada pelas quinonas, tendo como principal parâmetro a atividade das proteínas fosfatases que, sabe-se, estão envolvidas nestes processos. Além disso, o estresse oxidativo causado pelas quinonas deve ser mais amplamente estudado, uma vez que, é o mecanismo mais comum de toxicidade gerado pelas quinonas, além de estar envolvidos em processos de diferenciação e apoptose. Como as células tumorais tem uma defesa antioxidante maior que células não transformadas, as enzimas antioxidantes também devem ter atenção especial sendo um dos alvos para aumentar a toxicidade das quinonas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexander, A. (2000). **The CD45 tyrosine phosphatase: a positive and negative regulator of immune cell function.** *Sem. Immunol.* 12: 349-359.
- Allen, R. T., Hunter III, W. J. and Agrawal, D. K. (1997). **Morphological and Biochemical Characterization and analysis of apoptosis.** *J. Pharm. Toxic. Method.* 37: 215-228.
- Allen, R.G. and Tresini, M. (2000). **Oxidative stress and gene regulation.** *Free Radic. Biol. Med.* 28: 463-499.
- Aoyama, H., Melo, P. S., Granjeiro, P. A., Haun, M. and Ferreira, C. V. (2000). **Cytotoxicity of okadaic acid and kinetic characterization of protein tyrosine phosphatase activity in V79 fibroblasts.** *Pharm. Pharmacol. Comm.* 6: 331-334.
- Ayete, J., Schweitzer, C., Zarzov, P., Nurse, P., DeCaprio, J. A (2001). **Feedback regulation of the MBF transcriptional factor by cyclin Cig2.** *Nature Cell Biol.* 3 (12): 1043-1050.
- Banker, D. E., Groucline, M., Willman, C. L., Norwood, T. and Appelbaum, F. K. (1998). **Cell cycle perturbations in acute myeloid leukemia samples following in vitro exposures to therapeutic agents.** *Leukemia Res.* 22 (3): 221-239.
- Barrett, W.C.; DeGnore, J.P.; Keng, Y.J.; Keng, Y.F.; Zhang, Z.Y.; Yim, M.B. and Chock, P.B. (1999). **Roles of superoxide radical anion in signal transduction mediated by reversible regulation of protein-tyrosine phosphatase 1B.** *J. Biol. Chem.* 274: 34543-34546.
- Behringer, D., Schaufler, J., Kresin, V., Lubbert, M. and Lindemann, A (2001). **Differentiation associated modulation of cytokine and chemokine expression pattern in human myeloid cell lines.** *Leukemia Res.* 25: 141-149.
- Bernier, L. and Wang, E. (1996). **A prospective view on phosphatase and replicative senescence.** *Experimen. Gerontol.* 31: 13-19.

- Beutler, J. A., McCall, K.L., Herbert, K., Johnson, T., Shoemaker, R. H. and Boyd, M. R. (2000). **Cytotoxic clerodane diterpene esters from *Laetia corymbulosa***. *Phytochem.* 55: 233-236.
- Bjornstedt, M., Xue, J., Huang, W., Akesson, B., and Holmgren, A (1994). **The thioredoxin and glutaredoxin systems are efficient electron donors to human plasma glutathione peroxidase**. *J. Biol. Chem.*, 269: 29382-29384.
- Bolton, J., L., Trush, M. A, Penning, T. M., Dryhurst, G., Monks, T. J. (2000). **Role Of Quinones In Toxicology**. *Chemical Research In Toxicology*, 13: 135-160.
- Breitman, T. R., Selonich, S. E., Collins, S. J., (1980). **Induction of differentiation of the human promyelocitic leukemia cell line (HL60) by retinoic acid**. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* (77) 2986.
- Breitman, T. R.(1990). **Growth and differentiation of human myeloid leukemia cell line HL60**. *Method. In Enzymol.* 190: 118-130.
- Brinkworth, R. I. and Fairlie, D. P. (1995). **Hydroxiquinones are competitive non-peptide inhibitors of HIV-1 proteinase**. *Biochim. et Bioph. Acta* 1253 :5-8.
- Brown-Shimer, S., Johnson, K. A., Hill, D. E. and Bruskin, A. M. (1992). **Effect of protein tyrosine phosphatase 1B expression on transformation by the human neu oncogene**. *Cancer Res.* 52: 478-482.
- Buzzi, M., Lu, L., Lombardi, A. J., Posner, M. R., Brautigan, D. L., Fast, L. D. and Frackelton, A. R. (1992). **Differentiation-Induced Changes in Protein-Tyrosine Phosphatase-Activity and Commensurate Expression of CD45 in Human Leukemia-Cell Lines**. *Cancer Res.* 52: (14) 4027-4035.
- Charest, D.L., Mordret, G., Harder, K.W., Jirik, F.and Pelech, F. (1993). **Molecular cloning, expression, and characterization of human mitogen-activated protein kinase p44^{LRK1}**. *Mol. Cell Biol.*, 13: 4679-4690.
- Chen, X., Carystions, G.D. and Batist, G. (1998). **Potential for selective modulation of glutathione in cancer chemotherapy**. *Chem-Biol. Interac.*, 111-112: 263-275.

- Chénais, B., Andriollo, M., Guiraud, P., Belhoussine, R. and Jeannesson P. (2000). **Oxidative stress involvement in chemically induced differentiation of K562 cells.** *Free Rad. Biol. & Med.*, 28 (1) 18-27
- Choi, J., Liu, R-M., Forman, H. J. (1997). **Adaptation to oxidative stress: Quinone-mediated protection of signaling in rat lung epithelial L2 cells.** *Biochem. Pharm.* 53: 987-993.
- Cohen, P. (1988). **The structure and regulation of protein phosphatases.** *Ann. Rev. Biochem.*, 58:453-508.
- Collins, S. J., Ruscetti, F. W.; Gallagher, R. E. and Gallo, R. C. (1978). **Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75: 2458-2462.
- Cuncic, C., Desmarais, S., Detich, N. and Tracey, A. S. (1999). **Bis(N,N-dimethylhydroxamido)hydroxooxovanadate Inhibition of Protein Tyrosine Phosphatase Activity in Intact Cells.** *Biochem. Pharmacol.* 58: 1859-1867.
- Das, D., Pintucci, G. and Stern, A. (2000). **MAPK-dependent expression of p21^{waf} and p27^{kip1} in PMA-induced differentiation of HL60 cells.** *Febs Lett* 472: 50-52.
- Denizot, F. and Lang, R. (1986). **Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability.** *J. Immunol. Meth.* 89: 271-277.
- Denu, J. M., Stuckey, J. A. and Dixon, J. E. (1996) **Form and function in protein dephosphorylation.** *Cell*, 87: 361-364.
- Denu, J.M. and Tanner, K.G. (1998) **Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation.** *Biochem.* 37: 5633-5642.

- Draetta, G. and Eckstein, J. (1997). **Cdc25 protein phosphatase in cell proliferation.** *Biochim. et Bioph. Acta* 1332: 53-63.
- Dwall, E. and Wyllie, A. H. (1996). **Death and the cell.** *Immunol. Today* 7: 115-119.
- Eckert, K. G., Eyer, P., Sonnenbichler, J. and Zelt, I. (1990). **Activation and detoxification of aminophenols III. Synthesis and structural elucidation of various glutathione addition products to 1,4-benzoquinone.** *Xenobiotica* 20: 351-361.
- Enz, A. and Pombo Villar, E. (1997). **Class II pyrethroids: noninhibitors calcineurin.** *Biochem. Pharmacol.* 54: 321-323.
- Fabian, I., Halperin, D., Lefter, S., Mittelman, L., Alstock, R. T., Seaton, O and Tsaraty I. (1999). **Alteration of actin organization by jaspamide inhibits ruffling, but not phagocytosis or oxidative burst, in HL60 cells and human monocytes.** *Blood* 93: 3994-4005
- Fauman, E. B. and Saper, M. A. (1996). **Structure and function of the protein phosphatases.** *Trends Biochem. Sci.*, 21: 413-417.
- Fisher-Nielsen, A, Corcoran, G. B., Poulsen, H. E., Kamendulis, L. M. and Loft, S. (1995). **Menadione-Induced DNA fragmentation without 8-oxo-2'-deoxyguanosine formation in isolated rat hepatocytes.** *Biochem. Pharmac.* 49 (10): 1469-1474.
- Fréchet, M.; Canitrot, Y.; Cazaux, C. and Hoffmann, J. (2001). **DNA polymerase beta imbalance increases apoptosis and mutagenesis induced by oxidative stress.** *Febs Lett.* 505: 229-232.
- Freire, A.G., (2002). **Tese de Doutorado em andamento**, FAPESP, proc. nº 00/09400-1 – UNICAMP.
- Fricker, S.P. (1995). **Ruthenium, nitric oxide and diase. A novel inorganic chemistry approach to drug design.** *Plant. Metals Rev.*, v.39,n.4,p.150-159,
- Freshney, R.I. (1994). **In: Culture of Animal Cells: A manual of basic technique.** 3rd. Ed. Wiley-Liss.

- Galaktionov, K., Lee, A.K., Eckstein, J., Draetta, G., Meckler, J., Loda, M. and Beach, D., (1995). **Cdc25 phosphatases as potential human oncogenes.** *Science* 269: 1575-1577.
- Ganapati, U., Gupta, S., Radha, V., Sudhakar, C., Manogaran, P.S. and Swarup, G. (2001). **A nuclear protein tyrosine phosphatase induces shortening of G1 phase and increase in c-myc protein level.** *Exp. Cell Res.* 265: 1-10.
- Gaté, L., Paul, J., Nguyen Ba, G., Tew, K.D. and Tapiero, H. (1999). **Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants.** *Biomed. Pharmacother.*, 53: 169-180.
- Granjeiro J. M, Ferreira C. V., Juca, M. B., Taga, E. M., Aoyama H. (1997) **Bovine kidney low molecular weight acid phosphatase: FMN-dependent kinetics.** *Biochem. and Mol. Biol. Inter.* 41 (6): 1201-1208.
- Hachiya, M., Yoshiaki, O and Akashi, M., (1999). **Role TNF α in regulation of myeloperoxidase expression in irradiated HL60 promyelocytic cells.** *Biochem. et Bioph. Acta* 1495: 237-249.
- Ham, S. W., Park, J., Lee, S.J., Kim, K. K. and Choi, K. H. (1998). **Naphthoquinone analogs as inactivators of cdc25 phosphatase.** *Bioorganic & Med. Chemistry Letters* 8: 2507-2510.
- Harrison, S., Page, C. P. and Spina, D. (1999). **Airway nerves and protein phosphatases.** *Gen. Pharmacol.* 32: 287-298.
- Hartree, E. F. (1972). **Determination of proteins: a modification of the Lowry method that give a linear photometric response.** *Anal. Biochem.* 48: 422-427.
- Hensley, K., Robinson, K.A, Gabbita, S.P., Salsman, S. and Floyd, R.A (2000). **Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury.** *Free Rad. Biol. Med.*, 28: 1456-1462.
- Hertog, J. D.(1999) **Protein-tyrosine phosphatases in development.** *Mecham. Development* 85: 3-14.

- Hoffman, M. E., Ciampi, D. B., Duran, N. (1987). **The autooxidation of 2,3,5,6-tetrahydroxy-2,5-cyclohexadiene-1,4-dione under physiological conditions.** *Experientia* 43: 217-220.
- Hunter, T. (1995). **Protein kinases e phosphatases: the yin e yang of protein phosphorylation e signaling.** *Cell*. 80: 225-236.
- Jia, Z. (1997). **Protein phosphatase: structure and implications.** *Biochem. Cell Biol.* 75: 17-26.
- Johnson, L.N. and Barford, D. (1993). **The effect of phosphorylation on the structure and function of proteins.** *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 22: 199-232.
- Kang, S. N., Lee, M. H., Kim, K. M., Cho, D. and Kim T. S. (2001). **Induction of human promyelocytic leukemia HL60 cell differentiation into monocytes by silibinin: involvement of protein kinase C.** *Biochem. Pharmac.* 61: 1487-1495.
- Kehrer, J.P. (2000). **The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity** *Toxicology* 149 (1): 43-50.
- Kenner, K. A., Hill, D. E., Olefsky, J. M. and Kuasri, J. (1993). **Regulation of protein tyrosine phosphatases by insulin and insulin-like growth factor I.** *J. Biol. Chem.* 268: 25455-25462.
- Kohroki, J., Muto, N., Tanaka, T., Itoh, N., Inada, A. and Tanaka, K. (1998). **Induction of differentiation and apoptosis by dithizone in human myeloid leukaemia cell lines.** *Leukemia Res.* 22: 405-412.
- Kyriakis, J.M., Banerjee, P., Nikolakaki, E., Daí, T., Rubie, E.A, Ahmad, M.F., Avruch, J. and Woodgett, J.R. (1994) **The stress-activated protein kinase subfamily of c-jun kinases** *Nature*, 369: 156-160.
- Laidler, P.M.; Taga, E.M. and Van Etten, R.L. (1982). **Human liver acid phosphatases: Cysteine residues of the low-molecular-weight enzyme.** *Arch. Biochem. Biophys.* 216: 512-521.

- Lander, H.M. (1997). **An essential role for free radicals and derived species in signal transduction.** *Faseb Journal* 11 (2): 118-124.
- Li, L. and, Dixon, J. E. (2000). **Form, function, and regulation of protein tyrosine phosphatase and their involvement in human diseases.** *Semin. Immunol.* 12: 75-84.
- Li, Y., Lafuente, A. and Trush, M. A. (1994). **Characterization of quinone reductase, glutathione and glutathione S-transferase in human myeloid cell lines: induction by 1,2-dithiole-3-thione and effects on hydroquinone-induced cytotoxicity.** *Life Sciences.* 54: 901-916.
- Lopaczynski, W and Zeisel, S. H. (2000). **Antioxidants, programmed cell death, and cancer.** *Nutrition Reserch* 21: 295-307.
- Loveland, B. E., Johns, T. G., Mackay, I. R., Vaillant, F., Wang, Z. X. and Hertzog, P. J. (1992). **Validation of the MTT dye assay for enumeration of cells in proliferative and antiproliferative assays.** *Biochem. Int.* 27: 501-510.
- Mackintosh, C. and MacKintosh, R. W. (1994). **Inhibition of protein kinases and phosphatases.** *Trends Biochem. Sci.* 17: 444-447.
- Maehama, T. and Dixon, J. E. (1998). **The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate.** *J. Biol. Chem.* 273: 13375-13378.
- Martin, S. J. (1993). **Apoptosis: suicide, execution or murder?** *Trends. Cell Biol.* 3: 141-144.
- Martinez, C.M. (1995). **Oxygen free radicals and human disease** *Biochimie*, 77: 147-161.
- Matés, J.M. and Sánchez-Jiménez, F.M. (2000). **Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy.** *Inter. J. Biochem. Cell Biol.*, 32: 157-170.
- Meister, A (1991). **Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal -applications in research and therapy** *Pharmacology & Therapeutics* 51 (2): 155-194.

- Melo, P. S., Maria, S. S., Vidal, B. C., Haun, M. and Duran, N. (2000). **Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells.** *In vitro animal* 36:
- Mertens, S., Craxton, M. and Goedert, M. (1996). **SAP kinase-3 a new member of the family of mammalian stress-activated protein kinases.** *FEBS Lett.*, 383: 273-276.
- Meyer, M., Schreck, R., Baeuerle, P.A. (1993). **H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF-kappa-B and AP-1 in intact-cells - AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor.** *EMBO JOURNAL* 12 (5): 2005-2015.
- Monteiro, H.P. and Stern, A. (1996). **Redox modulation of tyrosine phosphorylation-dependent signal transduction pathways.** *Free Radic. Biol. Med.* 21: 323-333.
- Mosmann, T. (1983). **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.** *J. Immunol. Meth.* 65: 55-63.
- Nagata A., Igarashi M., Jinno, S., Suto, K. and Okayama H.(1991). **An additional homolog of the fission yeast cdc25+ gene occurs in humans and is highly expressed in some cancer-cells** *New Biologist* 3 (10): 959-968.
- Neel, B.G., and Tonks, N.K. (1997). **Protein tyrosine phosphatase in signal transduction.** *Curr.Opin.Cell.Biol.*, 9:193-204.
- Newburger, P. E., Chovoniec, M. E., Greenberger, J. S. and Cohen, H. J. (1979). **Functional changes in human leukemic cell line HL-60.** *J. Cell Biol.* 82: 315-322.
- Nohl, H., Jordan, W., Youngman, R.J., (1986). **Quinone in biology: Functions in eletron transfer and oxygen activation.** *Adv. Free Radical Biol. Med.* 2: 211-279.
- O' Brien, P. J. (1991). **Molecular mechanisms of quinones cytotoxicity.** *Chem. Biol. Interactions.*, 80: 1-41.
- O' Connell, M. J., Walworth, N. C.and Carr, A M., (2000). **The G2-phase DNA-damage checkpoint.** *Cell Biol.*10: 296-303.

- Östman, A and Böhmer, D.F. (2001). **Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatases.** *Trends Cell Biol.* 11: 258-266.
- Olivier, P., Testard, P., Marzin, D. and Abbott, D. (1995) **Effect of high polyol concentrations on the neutral red absorption assay and tetrazolium-MTT test of rat hepatocytes in primary culture.** *Toxicon. Vitro.* 9: 133-138.
- Powis, G., Mustacich, D. and Coon, A (2000). **The role of the redox protein thioredoxin in cell growth and cancer.** *Free Rad. Biol. Med.*, 29: 312-322.
- Rao, G. S. (1995). **Glutathionyl hydroquinone: a potent pro-oxidant and a possible toxic metabolite of benzene.** *Toxicology* 106: 49-54
- Renzi, D.; Valtonila, M. and Foster, R. (1993). **The evaluation of a multi-endpoint cytotoxicity assay system.** *ATLA.* 21: 89-96.
- Repetto, G. and Sanz, P. (1993). **Neutral red uptake, cellular growth and lysosomal function: in vitro effect of 24 metals.** *ATLA.* 21: 501-507.
- Seibert, H., Gulden, M. and Voss, J.U. (1994). **Comparative cell toxicology : the basis for *in vitro* toxicity testing.** *ATLA*, 22: 168-174.
- Sham, R. L. (1997). **Acute promyelocytic leukemia-from the bench to the bedside.** *Leukemia Res.* 21 (4) 295-297.
- Shin, H. M., Seoh, J. Y., Chung, H. Y., Choi, S. J., Hahn, M. J., Kang, J. S., Choi, M. S., Han, T. H. (1999). **Requirement of MEF2D in the induced differentiation of HL60 promyeloid cells.** *Molecular Immunology* 36: 1209-1214.
- SoKoloski, J. A. and Sortorelli, A. C. (1997). **Induction of the differentiation of HL-60 promyelocytic leukemia cells by nonsteroidal anti-inflammatory agents in combination with low levels of vitamin D₃.** *Leukemia. Res.*, 22: 153-161.
- Soucek, P., Ivan, G., Pavel, S. (2000). **Effect of the microsomal system on interconversions between hydroquinone, benzoquinone, oxygen activation, and lipid peroxidation.** *Chemico-Biological Interactions* 126: 45-61.
- Souza-Pinto, N. C., Vercesi, A. E., Hoffman M. E. (1995). **Mechanism of tetrahydroxi-1,4-quinone cytotoxicity: involvement of Ca⁺² and H₂O₂ in the**

- impairment of DNA replication and mitochondrial function.** *Free Radical Biology & Medicine* 20 (5): 657-666.
- Spector, A, Yan, G-Z, Huang, R., McDermott, M.J., Gascoyne, P.R.C. and Pigiet, V. (1988). **The effect of H₂O₂ upon thioredoxin-enriched lens epithelial cells** *J. Biol. Chem.*, 263: 4984-4990.
- Stark, D.M., Shopsis, C., Borenfreud, E. and Babich, H. (1986). **Progress and problems in evaluating and validating alternative assay in toxicology.** *Fd. Chem. Toxic.* 24(6-7): 449-455.
- Sun, X. and Ross, D. (1996). **Quinone-induced apoptosis in human colon adenocarcinoma cells via DT-diaphorase mediated bioactivation.** *Chemico-Biological Interactions* 100: 267-276.
- Sundaresan, M.; Yu, Z.X.; Ferrans, V.J.; Irani, K. and Finkel, T. (1995). **Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction.** *Science.* 270: 296-299.
- Swarup, G., Cohen, S. and Garbers, D. L. (1982). **Inhibition of membrane phosphotyrosil-protein phosphatase activity by vanadate.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107: 1104-1109.
- Takagi, T., Moore, C. R., Diehn, F. and Buratowski, S. (1997). **An RNA 5'-triphosphatase related to the protein tyrosine phosphatase.** *Cell.*, 89: 867-873.
- Thomas, J.A. and Mallis, R.J. (2001). **Aging and oxidation of reactive protein sulfhydryls.** *Experimen. Gerontol.* 36: 1519-1526.
- Toivola, D. M. and Eriksson, J. E. (1999). **Toxins affecting cell signaling and alteration of cytoskeletal structure.** *Toxicol. Vitro.* 13: 521-530.
- Tonks, N. K. and Neel, B. G. (1996). **From form to function: signaling by protein tyrosine phosphatases.** *Cell.* 87: 365-368.
- Torsoni, M. A., Viana, R. I. and Ogo, S. H. (1998). **Sulphydryl groups and their relation to the antioxidant enzymes of chelonian red blood cells.** *Biochem. Mol. Biol. Int.* 46: 147-156.

- Tracey, A. S. (2000). **Hydroxamino vanadates: aqueous chemistry and function in protein tyrosine phosphatase and cell cultures.** *J. Inorg. Biochem.* 80: 11-16.
- Trowbridge, I. S. (1991). **A prototype for transmembrane protein tyrosine phosphatases.** *J. Biol. Chem.*, 266: 23517-23520.
- Uesugi, Y., Fuse, I., Toba, K., Kishi, K., Furukawa, T., Koike, T. and Aizawa, Y. (1999). **Involvement of SHP-1, a phosphotyrosine phosphatase, during myeloid cell differentiation in acute promyelocytic leukemia cell lines.** *Eur. J. Haematol.* 62: (4) 239-245.
- Uren, A.G. and Vaux, D.L. (1996). **Molecular and Clinical Aspects of Apoptosis** *Pharmacol. Ther.*, 1: 37-50.
- Uzunoglu, S., Uslu, R., Tobu, M., Saydam, G., Terzioglu, E., Buyukkececi, F. and Omay, S. B. (1999). **Augmentation of methylprednisolone-induced differentiation of myeloid leukemia cells by serine/threonine protein phosphatase inhibitors.** *Leukemia. Res.* 23: 507-512.
- Verhaegen, S., MCGowan, A J., Brophy, A R., Fernandes, R. S. and Cotter, T. G. (1995). **Inhibition of apoptosis by antioxidants in the human HL60 leukemia cell line.** *Biochem. Pharmacol.* 50 (7): 1021-1029.
- Verlinden, L., Verstuyf, A, Mathieu, C., Tan, B. K. and Bovillon, R. (1997). **Differentiation of HL60 cells by 1,25 (OH)₂ D₃, all trans retinoic acid, r TGF-β₂ and their combinations.** *F. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 60(1-2): 87-97.
- Xu, K. and Thornalley, P. J. (2001). **Involvement of glutathione metabolism in the cytotoxicity of the phenethyl isothiocyanate and its cysteine conjugate to human leukaemia cells *in vitro*.** *Biochem. Pharmacol.* 61: 165-177.
- Wallington, L. A., Durham, J., Bunce, C. M. and Brown, G. (1996). **Growth of single HL60 cells in liquid culture: analysis of the influences of differentiative agents.** *Leukemia Res.* 20 (10) 821-829.
- Wang, I.-K., Lin-Shiau, S.-Y. and Lin, J.-K. (1999). **Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and**

- activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL60 cells.** *Eur. J. Cancer.* 35: (10) 1517-1525.
- Wang, R. H., Liu, C. W. Y., Avramis, V. I. and Berndt, N. (2001). **Protein phosphatase 1 alpha-mediated stimulation of apoptosis is associated with dephosphorylation of the retinoblastoma protein.** *Oncogene.* 20: 6111-6122.
- Wu, F. Y. –H., Sun, T. –P. (1999). **Vitamin K3 induces cell cycle arrest and cell death by inhibiting cdc25 phosphatase.** *European Journal of Cancer* 35 (9): 1388-1393.
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F. and Currie, A. R. (1980). **Cell death: The significance of apoptosis.** *Intl. Rev. Cytol.* 68: 251-306.
- Zhang, Z. Y. and Dixon, J. E. (1993). **Active site labeling of the *Yersinia* protein tyrosine phosphatase: The determination of the pK_a of the active site cysteine and the function of the conserved histidine 402.** *Biochemistry.* 32: 9340-9345.
- Zhang, Zhong-Yin. (2001). **Protein tyrosine phosphatases: prospects for therapeutics.** *Current Opinion in Chemical Biology.* 5: 416-423.
- Zhu, W-H., Majluf-Cruz, A. and Omburo, G. A. (1998). **Cyclic AMP-specific phosphodiesterase inhibitor rolipram and RO-20-1724 promoted apoptosis in HL-60 promyelocytic leukemic cells via cyclic AMP-independent mechanism.** *Life sci.* 63: (4) 265-274.