

Márcio André Miranda

1



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

**EFEITO DE FLAVONÓIDES NA FOSFOPROTEÍNA TIROSINA
FOSFATASE. MECANISMOS CINÉTICOS E RELAÇÕES ESTRUTURA-
ATIVIDADE**

Este exemplar correspondendo à redação final
da tese, defendida em 22/08/2000 (apêndice a)
*Márcio André
Miranda*
e aprovada para a obtenção do título de Mestre em
Biologia Funcional e Molecular na Área de Bioquímica

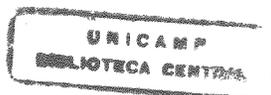
22/08/2000 - Hiroshi Aoyama

Tese de Mestrado apresentada ao
Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do
título de Mestre em Biologia
Funcional e Molecular na Área
de Bioquímica

ORIENTADOR
Prof. Dr. HIROSHI AOYAMA
Depto. de Bioquímica - IB
UNICAMP

200016137

Campinas - SP
2000



UNIDADE 02
N.º CHAMADA:
T/UNICAMP
M672e
V. _____ Ex. _____
TOMBO BC/42818
PROC. 16/278100
C D
PREÇO R\$11,00
DATA 20/10/00
N.º CPD _____

CM-0014702B-9

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

M672e **Miranda, Márcio André**
Efeito de flavonóides na fosfoproteína tirosina fosfatase, mecanismos cinéticos e relações estrutura-atividade / Márcio André Miranda. --- Campinas, SP. [s.n.], 2000
67f: illus.

Orientador: Hiroshi Aoyama
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

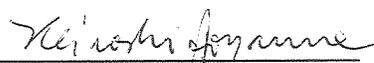
1. Enzima. 2. Flavonóides. I. Aoyama, Hiroshi. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 22 de Agosto de 2000.

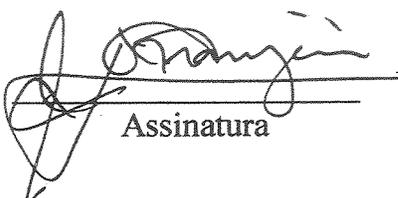
2

Banca Examinadora:

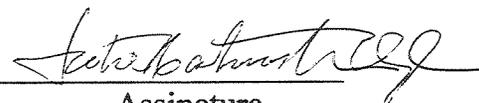
Prof. Dr. Hiroshi Aoyama (Orientador)
(Dep. de Bioquímica - IB - UNICAMP)


Assinatura

Prof. Dr. José Mauro Granjeiro
(Dep. de Ciências Biológicas - FOB - USP)


Assinatura

Profa. Dra. Satie Hatsushika Ogo
(Dep. de Bioquímica - IB - UNICAMP)


Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Marangoni
(Dep. de Bioquímica - IB - UNICAMP)

Assinatura

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Há um tempo determinado para todas as coisas....

Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do céu.

Há tempo de nascer, e tempo de morrer; tempo de plantar , e tempo de arrancar o que se plantou;

Tempo de matar, e tempo de curar; tempo de derrubar e tempo de edificar;

Tempo de chorar, e tempo de rir; tempo de prantear e tempo de dançar;

Tempo de espalhar pedras, e tempo de ajuntar pedras; tempo de abraçar, e tempo de afastar-se de abraçar;

Tempo de buscar, e tempo de perder; tempo de guardar, e tempo de lançar fora;

Tempo de rasgar, e tempo de costurar; tempo de estar calado, e tempo de falar;

Tempo de amar, e tempo de odiar, tempo de guerra, e tempo de paz.

Eclesiastes, 3: 1-8.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Hiroshi Aoyama, pela orientação e companherismo demonstrados desde a iniciação científica.

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

Aos professores do Departamento de Bioquímica pelos auxílios prestados.

Às secretárias do Departamento de Bioquímica pela atenção e disponibilidade.

Aos meus grandes amigos desde a graduação, que posso chamá-los de irmãos Alexandre e André.

Aos meus companheiros de laboratório e também amigos: Profa. Dra. Carmem, Paulo, Patrícia, Erika, Silvia, Telma, Marilena, os estagiários que aqui passaram (Sílvio, Daniela, Andreza) e demais amigos do Departamento de Bioquímica .

Aos meus pais, **D. Cida e Sr. Jaime**, por ser seu filho. Pelo apoio, dedicação, paciência, amor, amizade e constante presença em todos os momentos.

À **Rose**, esposa e grande companheira. Pelos momentos de paciência, dedicação, amor e compreensão.

A minhas irmãs: **Elaine**, que sinto muito falta, e **Elizabeth**.

Aos meus sogros, **Leonildo e Ana Virgínia** (*in memorian*) e meus cunhados Beatriz e Reginaldo e à minha sobrinha Giovanna.

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

ÍNDICE

ABREVIATURAS	6
RESUMO	7
SUMMARY	8
1- INTRODUÇÃO	9
FOSFOPROTEÍNA TIROSINA FOSFATASE DE BMr	10
EVOLUÇÃO DO ESTUDO DAS PROTEÍNAS TIROSINA FOSFATASES	11
ESTRUTURA E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DAS PROTEÍNAS TIROSINA FOSFATASES DE BMr	12
FLAVONÓIDES	16
PAPEL BIOLÓGICO DOS FLAVONÓIDES	19
2- OBJETIVOS	22
3- MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1- Material	23
3.1.1- PTP de BMr de rim bovino	23
3.1.2- Soluções e Reagentes	23
3.2- Métodos	23
3.2.1- Determinação da Atividade Enzimática.	23
3.2.2- Determinação da Atividade Enzimática na presença de Ditiotreitól.	24
3.2.3- Efeito de flavonóides na atividade da enzima.	24
3.2.4- Determinação dos parâmetros cinéticos: Km, Vmax, Vmax/Km	24
3.2.5- Determinação do Energia de Ativação	24
3.2.6- Determinação do efeito do pH	25
3.2.7- Efeito dos flavonóides na estabilidade e na desnaturação térmica	25
3.2.8- Efeito dos flavonóides em função da força iônica	25
4- RESULTADOS	26
5- DISCUSSÃO	48
6- PERSPECTIVAS	52
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

ABREVIATURAS

Ans	Asparagina
Arg	Arginina
Asp	Aspartato
BMr	Baixa Mr
Cys	Cisteína
DMSO	dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
Ea	Energia de ativação
EGF	Fator de crescimento epidermal
FMN	Flavina mononucleotídeo
His	Histidina
k_{cat}	Constante catalítica
Ki	Constante de inibição
Km	Constante de Michaelis
LMrPTP	Proteína tirosina fosfatase de baixa massa molecular
Mr	Massa molecular relativa
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
p-NPP	p-Nitrofenil fosfato
PTK	Proteína tirosina quinase
PTP	Proteína tirosina fosfatase
Ser	Serina
Tyr-P	Tirosina fosfato
Vmax	Velocidade máxima

RESUMO

Enzimas importantes em muitos sistemas celulares são inibidas ou ativadas por flavonóides. No entanto, não existe nenhum dado literário referente ao efeito dos flavonóides sobre as fosfoproteínas tirosina fosfatase (PTP). Este trabalho propõe o estudo dos flavonóides sobre a atividade da fosfoproteína tirosina fosfatase de baixa massa molecular relativa (LMrPTP) de rim bovino relacionando a sua estrutura com o seu efeito sobre a atividade enzimática.

A atividade enzimática foi determinada em pH 5,0 utilizando p-nitrofenilfosfato (p-NPP), flavina mononucleotídeo (FMN) e tirosina fosfato (Tyr-P) como substratos, a 37°C, por 20 minutos. Quercetina mostrou ser um ativador da enzima na concentração de 400 μ M, da ordem de 260, 20 e 10% para p-NPP, FMN e Tyr-P respectivamente. Já a murina mostrou ser um excelente inibidor competitivo da atividade enzimática, com constantes de inibição da ordem de 58, 56,5 e 55 μ M/ L para p-NPP, FMN e Tyr-P respectivamente. Diferentemente do efeito ativador da quercetina, o efeito inibidor da murina foi dependente do pH. Estudos de estabilidade térmica na ausência e presença de agentes protetores ou redutores indicam que os flavonóides interagem com o sítio ativo mas não afetam as cisteínas. A interação entre a enzima e os flavonóides envolve fortemente um componente eletrostático, uma vez que na presença de NaCl houve a perda do efeito ativador da quercetina e a ativação por murina em concentrações superiores a 125mM. Para as mesmas condições, outros flavonóides foram testados, mas não apresentaram efeito significativos na atividade da LMrPTP, como a rutina e o kaempferol.

Estes resultados sugerem a importância da posição dos grupos -OH dos flavonóides (nas posições 3' e 4' para a quercetina, 2' e 4' para a murina) para os distintos efeitos dos flavonóides. A ausência do grupo -OH na posição 3' (para o kaempferol) e a presença de um glicosídeo (rutinose) no grupo -OH na posição 3 (para a rutina) promovem a supressão do efeito ativador do flavonóide sobre a atividade da enzima.

SUMMARY

Important enzymes in many cellular systems may be inhibited or activated by flavonoids. However, there are no references concerning to the effect of flavonoids on phosphoprotein tyrosine phosphatases. This work aims to study the relationship between flavonoids structure and their effects on the bovine kidney low molecular weight phosphoprotein tyrosine phosphatase (LMrPTP).

Enzyme activity was determined at pH 5.0 with p-nitrophenylphosphate (p-NPP), flavin mononucleotide (FMN), and tyrosine phosphate (Tyr-P) as substrate, at 37°C, for 20 min. Quercetin was found to be an activator, at 400 μ M, for p-NPP, FMN, and Tyr-P in the following order: 2.6-, 0.2-, and 0.1-fold. Morin was a strong competitive inhibitor, which inhibition constant values were determined to be 58, 56.5, and 55 μ M for p-NPP, FMN, and Tyr-P, respectively. In contrast to the enzyme activation by quercetin, the inhibition by morin was pH-dependent. Preincubation and ionic strength did not significantly alter the effect of the flavonoids on the enzyme activity. At the same conditions, other related flavonoids, such as rutin and kaempferol had no effect on the LMrPTP.

Our results suggest the importance of the -OH groups positions (3' and 4' for quercetin, and 2' and 4' for morin) for the distinct flavonoids effects. The absence of the 3'-OH (kaempferol) and the presence of rutinoside at the 3-OH (rutin) suppress the effect of quercetin.

1- INTRODUÇÃO

Durante a última década, considerável progresso tem sido feito na elucidação do controle e coordenação do crescimento em células eucarióticas. O balanço entre a fosforilação e desfosforilação de proteínas é a base para o controle de diversos eventos biológicos disparados por efetores extracelulares como hormônios mitógenos, oncogenes, citocinas e neurotransmissores.

Particularmente, a fosforilação e desfosforilação em resíduos de tirosina de proteínas emergiram como um elemento chave na regulação da divisão, diferenciação e desenvolvimento celular, regulação do metabolismo e expressão gênica, contração, transporte, locomoção celular, aprendizado e memória (Cohen, 1992; Johnson e Barford, 1993; Lenburg e O'Shea, 1996; Tonks e Neel, 1996; Fauman e Saper, 1996; Jia, 1997; Burke e Zhang, 1998; Roknabadi *et al.*, 1999; Zhou e Van Etten, 1999).

A maioria dos receptores dos fatores de crescimento e muitos produtos de oncogenes possuem domínios com atividade proteína tirosina quinase (PTK). Além disso, mudanças no nível de fosforilação em tirosina são associadas com alterações na atividade de receptores (Yarden e Ullrich, 1988) e a ativação das PTKs parece ser requisito básico para o estímulo do crescimento celular. Receptores de PDGF e EGF têm sido descritos como um alvo *in vivo* de fosfoproteína tirosina fosfatase de baixa massa molecular relativa (BMr) (Ramponi *et al.*, 1989; Berti *et al.*, 1994; Chiarugi *et al.*, 1995; Rigacci *et al.*, 1998).

Um componente importante da rede de fosforilação de proteínas em tirosina é a família das fosfotirosina proteína fosfatases (PTP), capazes de desfosforilar proteínas contendo fosfotirosinas. O nível geral, nas células, de proteínas fosforiladas em tirosinas, depende do balanço entre as atividades quinase e fosfatase. Dessa forma, as PTPs têm sido evidenciadas como reguladoras chave do controle e crescimento celular (Hunter, 1989).

São conhecidas muitas enzimas capazes de hidrolizar proteínas fosforiladas em tirosina. Bioquimicamente, estas fosfatases podem ser identificadas pela sensibilidade ao vanadato, insensibilidade ao ácido ocadáico, independência de íons metálicos, habilidade em desfosforilar p-NPP e total perda de atividade após mutação da cisteína do sítio ativo por serina. Outras mutações, como da serina 19 para a alanina, resultam em uma enzima com alterações nas propriedades cinéticas, incluindo uma variação em seu pKa (Tabernerero *et al.*, 1999). Todas estas fosfatases parecem preferir peptídios contendo fosfotirosina, apesar de um subgrupo apresentar uma atividade dupla, também hidrolisando fosfotreonina e fosfoserina. Com base na função, estrutura e seqüência, estas fosfatases podem ser agrupadas em quatro famílias principais: *i*) as proteínas fosfatases específicas; *ii*) as fosfatases com dupla especificidade tipo VH1; *iii*) as cdc25 e *iv*) as fosfatases ácidas de BMr (Fauman e Saper, 1996; Jia, 1997).

FOSFOPROTEÍNA TIROSINA FOSFATASE DE BMr

Estudos recentes levaram à identificação de um grupo de PTPs citossólicas denominadas PTPs de BMr, com massa molecular próxima de 18 kDa. Estas enzimas não compartilham homologia de seqüência com as PTPs transmembrana ou não-transmembrana, mas exibem a seqüência do sítio ativo existente em todas as PTPs e o mesmo mecanismo catalítico e uma grande homologia na seqüência CX₅R(S/T), uma parte estrutural que forma um sítio de ligação com fosfato equivalente a alça de ligação de fosfato da PTP de baixa massa molecular relativa (Tabernerero *et al.*, 1999).

As PTPs de BMr distinguem-se das fosfatases ácidas clássicas quanto a sua sensibilidade ao vanadato ao invés do tartarato e pelo mecanismo catalítico que procede via formação de um fosfo-intermediário envolvendo um resíduo de cisteína altamente conservado. As PTPs de BMr são encontradas em procariotos, leveduras e

em todos os tecidos de mamíferos, embora os genes para as outras PTPs não tenham sido encontrados em procariotos (Ramponi e Stefani, 1997).

EVOLUÇÃO DO ESTUDO DAS PROTEÍNAS TIROSINA FOSFATASES

Ramponi e Stefani (1997) e Burke e Zhang (1998) publicaram uma revisão bastante completa sobre a PTP de BMr onde resumiram as informações mais recentes sobre a evolução, estrutura, cinética e características biológicas desta família de tirosina fosfatases.

Inicialmente, a PTP de BMr (E.C. 3.1.3.48.) foi estudada como uma fosfatase ácida solúvel de baixa Mr (E.C. 3.1.3.2.) em função da marcante atividade sobre o p-NPP. Posteriormente, a presença desta enzima foi descrita em mamíferos por Henrikson (1969) e Chaimovich e Nome (1970), tendo sido realizadas purificações e caracterizações das fosfatases ácidas de BMr de eritrócitos (Dissing *et al.*, 1979); fígado bovino (Lawrence e Van Etten, 1981); fígado humano (Taga e Van Etten, 1982); coração bovino (Chernoff e Li, 1985; Zhang e Van Etten, 1990); placenta humana (Waheed *et al.*, 1988); fígado de rato (Fujimoto *et al.*, 1988; Manao *et al.*, 1992); de fígado de porco (Caselli *et al.*, 1994a); e de rim bovino (Granjeiro *et al.*, 1997a).

Várias isoenzimas foram isoladas (Dissing e Svensmark, 1990) e seqüenciadas (Dissing *et al.*, 1991; Dissing e Johnsen, 1992) a partir de eritrócitos humanos. Três alelos foram identificados para esta enzima, cada um gerando duas isoenzimas, denominadas rápidas e lentas com base na mobilidade eletroforética. Do fígado de rato também foram identificadas duas isoformas denominadas de AcP1 e AcP2 (Manao *et al.*, 1992). Os genes para duas isoformas do coração bovino (HCPTF-A e HCPTF-B) foram clonadas, seqüenciadas e expressas (Wo *et al.*, 1992a). Outras duas isoenzimas foram seqüenciadas através de clonagem molecular (Shekels *et al.*,

1992) a partir de células 3T3-L1 capazes de hidrolizar a fosfotirosina de uma proteína ligadora de lipídios de adipócito.

PTP de BMr (17,4 kDa) tem sido também identificada, purificada e caracterizada de vários microorganismos como *Schizosaccharomyces pombe* (Mondesert *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1995; Mondesti *et al.*, 1995; Hengge *et al.*, 1997), *Saccharomyces cerevisiae* (Ostanin *et al.*, 1995), *Streptomyces coelicolor* (Li e Strohl, 1996). Outras PTPs de BMr, estruturalmente relacionadas com procariotos e leveduras, têm sido purificadas e caracterizadas tanto em mamíferos como em microorganismos (Keyse, 1995). Essas enzimas possuem uma dupla especificidade, apesar de apresentarem uma atividade muito mais intensa sobre a fosfotirosina. Zhang *et al.* (1995) propuseram que estas enzimas seriam, na verdade, PTPs de dupla especificidade envolvidas no controle celular.

ESTRUTURA E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DAS PROTEÍNAS TIROSINA FOSFATASES DE BMr

Estruturalmente, as PTPs de BMr têm sido extensamente estudadas com relação ao mecanismo catalítico (Davis *et al.*, 1994a; Chiarugi *et al.*, 1994; Taberero *et al.*, 1999), homologia (Dissing e Johnsen, 1992) e estrutura conformacional (Logan *et al.*, 1994; Su *et al.*, 1994; Taberero *et al.*, 1999).

A primeira enzima seqüenciada, a do fígado bovino (Camici *et al.*, 1989), possui um domínio simples com 157 resíduos de aminoácidos (17.953 Da) contendo 8 cisteínas, todas na forma reduzida, e o resíduo N-terminal acetilado. Não há homologia entre esta enzima e as fosfatases ácidas de alta e intermediária Mr, fosfatases alcalinas, a fosfotreonina/serina fosfatases, ou ainda com outras PTPs, exceto pela seqüência do sítio ativo altamente conservado, comum a todas as PTPs (Hiraga e Tzuiki, 1991; Cirri *et al.*, 1993b).

As seqüências das PTPs de BMr de procariotos e de leveduras têm sido determinadas por vários laboratórios; todas possuem de 156-166 resíduos de aminoácidos e uma seqüência altamente conservada, especialmente na região dos resíduos de 10-28 que contém o sítio ativo. A análise por raios X permitiu, recentemente, elucidar a estrutura terciária, com resolução de 2,1Å, da enzima do fígado e coração bovino (Su *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1994). A proteína possui dimensões relativas de 34x42x48 Å, sendo constituída de um domínio simples $\beta\alpha\beta$, contendo 4 folhas β centrais, paralelas e torcidas, envolvidas por α -hélices de conexão dos dois lados (Taberner *et al.*, 1999). Os resíduos de 13-17 do sítio ativo formam uma alça (alça fosfato) que conecta a primeira folha β com a primeira α -hélice. O sítio ativo é localizado na base de uma depressão formada pelo lado C-terminal de uma folha- β paralela; a borda desta depressão é margeada por resíduos hidrofóbicos divididos em três grupos: resíduos de 46-58, de 90-95 e de 128-132, os quais podem interagir com a estrutura aromática dos substratos que contém fosfotirosina ou os outros resíduos de aminoácidos vizinhos. Estes resíduos hidrofóbicos estão presentes também nas enzimas de leveduras e em algumas de procariotos (Mondesert *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1995; Modesti *et al.*, 1995; Li e Strohl, 1996), o que também reforça a importância destes, possivelmente, no reconhecimento do substrato.

Estudos cinéticos, mutação sítio dirigida e a determinação da estrutura terciária da PTP de BMr permitiram identificar a Cys-12, Arg-18 e Asp-129 como resíduos de aminoácidos essenciais para a catálise enzimática, sendo que os resíduos de Cys e Arg estão próximos e constituem a alça fosfato; atuando indiretamente, a His-72, Ser-43, Ser-19 e Asn-15 constituem e estabilizam o sítio ativo.

O mecanismo da reação enzimática está bem determinado (Wang *et al.*, 1999; Zhou e Van Etten, 1999; Wang *et al.*, 2000a e b). Primeiramente, o resíduo de Cys funciona como um nucleófilo e o substrato liga-se ao sítio ativo da enzima pelos três átomos de oxigênio do grupo fosfato através de pontes de hidrogênio com os

resíduos de aminoácidos da alça do sítio ativo fixando o grupo fosfato próximo da Cys. O átomo de enxofre da Cys ataca o grupo fosfato simultaneamente quando o Asp doa um próton, formando um intermediário fosfocisteína. Esta ligação é extremamente favorecida no sítio ativo promovendo um abaixamento na energia de ativação. O segundo passo é a reação de hidrólise realizada por uma molécula de água que ataca o intermediário fosfocisteína formando outro intermediário, a fosfoenzima. Sendo o grupo fosfato liberado posteriormente.

As PTPs de BMr de mamíferos hidrolisam com muita eficiência arilfosfatos como o p-NPP e a fosfotirosina, tanto quanto acilfosfatos, sejam naturais ou sintéticos, como o carbamoil fosfato, acetil fosfato e benzoil fosfato; entretanto, apresentam baixa afinidade sobre alquil fosfatos (Ramponi, 1994), com exceção das FMN (Taga e Van Etten, 1982; Fuchs *et al.*, 1992; Granjeiro *et al.*, 1997b). Estas enzimas, bem como as oriundas de procariotos e leveduras, também apresentam uma atividade marcante sobre peptídios e proteínas fosforiladas em tirosina (Chernoff e Li, 1985; Ramponi *et al.*, 1989; Zhang e Van Etten, 1991b; Shekels *et al.*, 1992; Stefani *et al.*, 1993; Li e Strohl, 1996). Esses autores ainda afirmam que a atividade sobre fosfoserina/treonina é insignificante, mas são contestados por Zhang *et al.* (1995). Outra característica marcante das PTPs de BMr é a capacidade de catalisar reações de transfosforilação (Hollander, 1971; Tanizaki *et al.*, 1977; Cirri *et al.*, 1993b).

As PTPs são inibidas competitivamente por vanadato, assim como as de BMr (Zhang e Van Etten, 1990; Granjeiro *et al.*, 1997a) e irreversivelmente por peroxivanadato ou pervanadato (complexo do vanadato com H_2O_2), através da oxidação da Cys-12, determinada por espectrometria de massa; agentes redutores como o DTT, presentes no meio de reação, mantêm a cisteína reduzida e convertem mais rapidamente o pervanadato em vanadato (Huyer *et al.*, 1997). O íon vanadato forma uma ligação covalente com o nucleófilo Cys-12 no sítio ativo, que apresenta

Isto levou alguns pesquisadores a supor que a sobre-expressão de algumas PTPs poderia suprimir ou mesmo reverter a transformação celular (Liebow *et al.*, 1989; Ramponi *et al.*, 1992). Rugiero *et al.* (1993) demonstraram ainda que a sobre-expressão da PTP de BMr em células transformadas (*v-erbB*, *v-raf* e *v-src*) provocam uma diminuição intensa (cerca de 50%) na síntese de DNA, proporcionalmente ao nível da PTP de BMr, quando comparado com as células normais, exceto para as células *v-H-ras* transformadas (Ramponi *et al.*, 1992). Berti *et al.* (1994) demonstraram uma diminuição em até 90% na resposta mitogênica ao PDGF além de uma diminuição no nível de autofosforilação PDGF-r após a sobre expressão da IF2. Logo após, Chiarugi *et al.* (1995) relataram que a sobre-expressão da PTP de BMr mutante e inativa (Cys-12→Ser) proporcionava um aumento intenso do nível de autofosforilação do PDGF-r; as células ainda apresentavam aumento no nível de proliferação. Dessa forma, ao menos para a IF2, Ramponi e colaboradores têm demonstrado que seu papel fisiológico está associado à hidrólise de resíduos de tirosina no EGF- e PDGF-r autofosforilado, sendo que sua atividade pode ser regulada via fosforilação ao nível de tirosina.

Contudo, a função desta enzima em microorganismos e a função da IF1, bem como a regulação de ambas, ainda permanecem desconhecidas.

FLAVONÓIDES

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

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

Subseqüentemente, outras propriedades biológicas foram descritas para os flavonóides, incluindo: atividade anti-hipertensiva e anti-arrítmica, propriedades anti-inflamatória e anti-alérgica, atividade anti-coleresterolêmica, estabilizante de plaquetas e mastócitos, atividade hepatotóxica, anti-hemorragica e atividade anti-tumoral, anti-trombótica (Gryglewski *et al.*, 1987; Hertog *et al.*, 1993; Formica e Regelson, 1995; Antônio e Brito, 1998), sendo que estes grupos fenólicos possuem uma potencial função protetora contra doenças cardiovasculares e coronarianas, e certamente várias formas de câncer (Hertog, 1996; Rice-Evans *et al.*, 1996).

Em uma excelente revisão, Formica e Regelson (1995) relataram as propriedades biológicas da quercetina (o mais comum dos flavonóides) e seus derivados, e Di Carlo *et al.* (1999) discutiram a origem e a atividade biológica dos flavonóides mais importantes e conhecidos. Mais de 4.000 flavonóides diferentes têm sido descritos e categorizados como flavonol, flavona, flavan-3-ol, flavanonol, flavanona e isoflavona que podem ou não ser glicosilados. Em plantas, flavonóides são encontrados ligados a açúcares como glicosídeos e são bastante estáveis (Hertog *et al.*, 1993). Na Tabela 1 são apresentadas as diferentes classes de flavonóides mais importantes e com maior atividade biológica de interesse. Como os flavonóides estão presentes na dieta humana, é importante o entendimento das suas propriedades bioativas, sua absorção, sua subseqüente distribuição, seu metabolismo e excreção em humanos (Hollman e Katan, 1998).

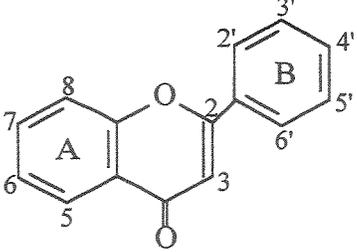
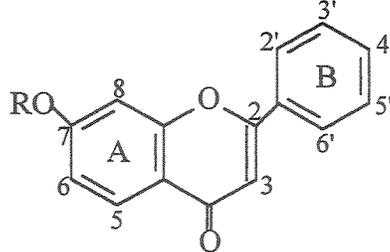
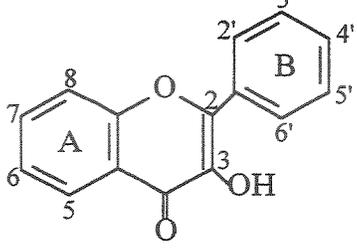
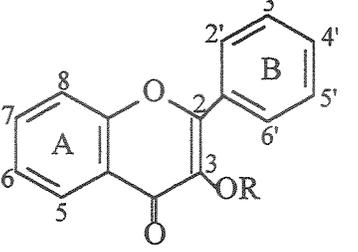
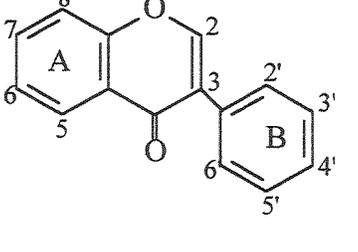
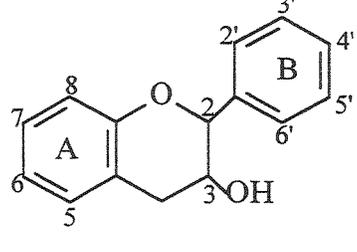
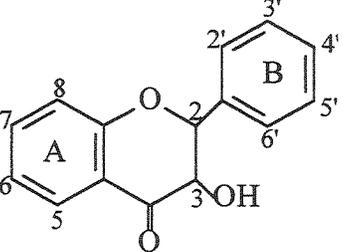
						
	Flavona					
	5	6	7	4'		
Apigenn	OH	-	OH	OH		
Baicalein	OH	OH	OH	-		
Chrysin	OH	-	OH	-		
						
	Flavona glicosilada					
	5	6	7			
Baicalin	OH	OH	R			
	R= β- glucopiranonosil					
						
	Flavonol					
	5	7	2'	3'	4'	5'
Quercetin	OH	OH	-	OH	OH	-
Morin	OH	OH	OH	-	OH	-
Kaempferol	OH	OH	-	OH	-	-
Myricetin	OH	OH	OH	OH	OH	-
						
	Flavonol glicosilado					
	3	5	7	3'	4'	
Rutin	R	OH	OH	OH	OH	
	R= Raminosilglucosidio					
						
	Isoflavona					
	5	7	4'			
Genistein	OH	OH	OH			
						
	Flavan-3-ol					
	5	7	3'	4'		
Catechin	OH	OH	OH	OH		
						
	Flavononol					
	5	7	3'	4'		
Taxifolin	OH	OH	OH	OH		

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

PAPEL BIOLÓGICO DOS FLAVONÓIDES

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

A variedade dos efeitos biológicos dos flavonóides em inúmeros sistemas celulares *in vitro*, bem como *in vivo*, tem sido descrita por vários autores. Os flavonóides podem inibir muitas enzimas importantes nos sistemas celulares como: ATPase, fosfolipase, prostaglandina ciclooxygenase, lipoxigenase, aldose redutase, hexoquinase, NADH oxidase, succinoxidase, xantina oxidase, proteína quinase, hidrolases, peroxidases, metalopeptidases e tirosinases (Formica e Regelson, 1995; Bohmont *et al.*, 1987; Hille e Sprecher, 1987; Ferriola *et al.*, 1989; Day *et al.*, 2000; Ferreira *et al.*, 2000; Bormann e Melzing, 2000; Shimizu *et al.*, 2000); podem ainda induzir várias enzimas, como a aril hidroxilase e a epóxido hidroxilase (Das, 1994).

Diversos trabalhos têm mostrado o efeito inibitório de flavonóides sobre DNA e RNA polimerases dependentes de DNA (Shinozuka *et al.*, 1988; Ono e Nakane, 1990; Uddin e Choundhry, 1995; Solimani, R., 1997), dependentes de RNA (Ono *et al.*, 1990; Chu *et al.*, 1992; Formica e Regelson, 1995), sobre a transcriptase reversa e como anti-HIV (Ono *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1998; Min *et al.*, 2000).

Os flavonóides também podem atuar na diminuição da peroxidação lipídica (Das e Ray, 1988) e sua capacidade antioxidante pode inibir a produção de radicais

livres nas células em diferentes níveis: na iniciação, como sequestrador de $O_2^{\cdot-}$, em reações com peroxil ou radicais peroxil lipídicos, e na formação de OH^{\cdot} , provavelmente como quelante de ferro e na produção de peroxinitrito (Haenen *et al.*, 1997; Metodiewa *et al.*, 1999). Metodiewa *et al.* (1999) tem recentemente discutido a ação da quercetina em sistemas celulares e foi demonstrado que este possui ação antioxidante protegendo os componentes celulares da degradação oxidativa e toxicidade de radicais livres, reduzindo a morte celular promovida pela redução dos antioxidantes celulares. No entanto, tem-se verificado também que a quercetina pode possuir ação prooxidante dependente da concentração e surgimento dos radicais livres, sendo que este efeito trata-se da transformação da quercetina em compostos prooxidantes como o-semiquinona e o-quinona.

Os flavonóides e seus derivados, de maneira estrutura-dependente, podem ainda inibir proteínas quinases (Srivastava, 1985; Ferriola, *et al.*, 1989; Cushman *et al.*, 1991; Formica e Regelson, 1995). Assim, os flavonóides parecem possuir muitas propriedades farmacológicas que os tornam excelentes agentes naturais modificadores da resposta biológica. Recentemente, muita atenção tem sido dada para suas propriedades antioxidantes e seu papel inibitório na proliferação de células de câncer em cultura e em vários estágios de desenvolvimento tumoral estudados em animais (Le Marchand *et al.*, 2000; Shimizu, 2000). As atividades antioxidante e quelante dos flavonóides são, provavelmente, o fator mais importante na sua ação de proteção contra degradação em tecidos e células por radicais livres (Afanas'ev *et al.*, 1989; Korkina e Afanas'ev, 1997). Alguns flavonóides podem modular o aumento no número de processos celulares envolvendo reações redox, incluindo a regulação da atividade da tirosina fosfatase.

Portanto, devido a esses fatos, vários estudos epidemiológicos estão sendo realizados utilizando-se flavonóides. *In vitro*, tem se observado que os flavonóides são capazes de inibir a proliferação de células cancerosas e de diminuir a atividade de vários tipos de câncer como do colo do útero, ovários, linfóides e de mama (Kuo,

1996; Lepley e Pelling, 1997; Lepley *et al.*, 1996, Takakura, 1999), leucemia (Hirano *et al.*, 1994; Carrero *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1999), e atividade antiproliferante provocada por agentes quimioterápicos (Scambia *et al.*, 1996). Quando quercetina e rutina foram administradas em ratos, ocorreu uma diminuição significativa de incidência de tumores provocada por agentes neoplásicos (Deschner *et al.*, 1991) e a aplicação tópica de alguns flavonóides em pele de ratos resultou em uma completa proteção contra aparecimento de tumores e multiplicidade de carcinomas (Birt *et al.*, 1997; Korkina e Afanas'ev, 1997; Zi *et al.*, 1997). Mas, apesar dos estudos de flavonóides em diversos sistemas enzimáticos, não existem referências sobre o efeito destes compostos na atividade de PTP de BMr.

2- OBJETIVOS

O objetivo de nosso trabalho foi verificar os efeitos de flavonóides (quercetina, rutina, morina e kaempferol) e riboflavina na atividade de uma PTP de BMr purificada do rim bovino, utilizando-se diferentes substratos.

A presente tese contém resultados sobre:

a) Efeito de flavonóides nos parâmetros cinéticos (K_m , V_{max} , V_{max}/K_m , energia de ativação) utilizando p-NPP, Tyr-P e FMN como substratos.

b) Mecanismos de inibição de flavonóides e constantes de inibição, utilizando-se diferentes substratos.

c) Efeito de flavonóides na estabilidade da enzima e na desnaturação térmica utilizando p-NPP como substrato.

d) Efeito da concentração de NaCl na ativação e inibição por flavonóides.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Material

3.1.1- PTP de BMr de rim bovino

A PTP de BMr foi purificada a partir do rim bovino, de acordo com o método descrito por Granjeiro *et al.* (1997a). A enzima na concentração de 1mg/mL, foi estocada a -20°C em um meio contendo glicerol 50%, fosfato 0,15M e DTT 1mM.

3.1.2- Soluções e Reagentes

Todos os reagentes possuíam grau analítico. Todas as soluções foram preparadas com água purificada pelo sistema Maxima (ELGA).

O p-NPP, Quercetina, Murina, Rutina, Riboflavina, Kaempferol e dimetilsulfóxido (DMSO) foram obtidos da Sigma Chemical Co.

3.2- Métodos

3.2.1- Determinação da Atividade Enzimática.

A atividade enzimática foi determinada através da quantificação do fosfato inorgânico durante a hidrólise do substrato (p-NPP), como descrito por Lowry e Lopez (1946). Para um volume final de 1,0 mL, a reação foi iniciada pela adição da enzima a um meio contendo tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0 e de p-NPP 5,0 mM. A paralisação ocorreu pela adição de 1,0 mL de molibdato de amônio 3% (em acetato de sódio 200 mM, pH 4,0). A coloração foi desenvolvida pela adição de 0,1mL de ácido ascórbico 1% (em acetato de sódio 200 mM, pH 4,0). Nos controles, a enzima foi adicionada após a paralisação com molibdato de amônio 3% em todos os ensaios. Após 30 minutos à temperatura ambiente, mediu-se a absorbância a 700 nm. O coeficiente de extinção molar do azul de molibdênio é $4.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.2.2- Determinação da Atividade Enzimática na presença de Ditiotreitól.

A atividade enzimática foi determinada através da quantificação do fosfato inorgânico durante a hidrólise do substrato (p-NPP), como descrito por Sumner (1944). Para um volume final de 1,0 mL, a reação foi iniciada pela adição da enzima a um meio contendo tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0 e de p-NPP 5,0 mM. A paralisação ocorreu pela adição de 0,5 mL de ácido sulfúrico 250 mM. A coloração foi desenvolvida pela adição de 1,0 mL de molibdato de amônio 2,5% (em ácido sulfúrico 2,0 M) e posterior adição de sulfato ferroso 10% (em ácido sulfúrico 50 mM). Nos controles, a enzima foi adicionada após a paralisação com ácido sulfúrico 250 mM em todos os ensaios. Após 30 minutos à temperatura ambiente, mediu-se a absorvância a 700 nm. O coeficiente de extinção molar do azul de molibdênio é $4.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

3.2.3- Efeito de flavonóides na atividade da enzima.

A atividade foi determinada como descrito nos itens 3.2.1 ou 3.2.2, na ausência e na presença de quercetina, morina, rutina, kaempferol e riboflavina em concentrações variáveis. A atividade na ausência do composto foi tomada como 100%. Em todos os ensaios enzimáticos, ausência e presença de flavonóides, a concentração de DMSO foi mantida em 15%.

3.2.4- Determinação dos parâmetros cinéticos: K_m , V_{max} , V_{max}/K_m

Os parâmetros cinéticos, K_m e V_{max} , foram determinados através do ajuste da curva ($V \times [S]$) utilizando o modelo da hipérbole retangular.

3.2.5- Determinação do Energia de Ativação

A energia de ativação da reação de hidrólise do pNPP (5 mM) pela PTP do rim bovino na ausência e presença de quercetina foi determinada através do gráfico de Arrhenius ($\log k \times T^{-1}$), onde k é a velocidade inicial medida em diferentes

temperaturas (de 20 a 60°C) durante 10 minutos de reação. A velocidade inicial foi expressa em UE ($\mu\text{mol min}^{-1}$) tendo sido obtida a partir da inclinação das retas nos gráficos de Velocidade \times tempo. No gráfico de Arrhenius, a inclinação = $-E_a/R$.

3.2.6- Determinação do efeito do pH

A atividade enzimática foi determinada na ausência e na presença dos flavonóides, nos seguintes valores de pH: 2,5 (glicina); 3,0 (citrato); 3,5 - 5,5 (acetato); 6,0 - 7,0 (bis-tris); 8,0 (hepes); 9,0 (glicina). Os tampões foram utilizados na concentração final de 0,1 M.

3.2.7- Efeito dos flavonóides na estabilidade e na desnaturação térmica

Neste experimento, a enzima foi pré-incubada, por diferentes períodos de tempo, a uma temperatura onde já ocorria inativação térmica, na ausência e na presença de diferentes concentrações dos flavonóides. Em seguida, a atividade residual foi determinada no pH ótimo.

A desnaturação térmica foi realizada conforme descrito por Pace (1990), analisando-se a variação da absorbância a 280 nm na ausência e na presença dos flavonóides, na I_{50} .

3.2.8- Efeito dos flavonóides em função da força iônica

A atividade enzimática foi seguida como descrito, na ausência e na presença dos flavonóides, na I_{50} , em diferentes concentrações de NaCl.

4- RESULTADOS

Dentre os flavonóides testados (quercetina, murina, rutina e kaempferol) e a riboflavina, a atividade relativa (%) permitiu constatar que somente a quercetina e a murina produziam efeitos significativos na atividade enzimática. Observa-se que, na concentração de 400 μM , a quercetina mostrou uma ativação enzimática da ordem de três vezes; a murina apresenta uma inibição da ordem de 50%, a rutina, kaempferol e a riboflavina não mostraram nenhum efeito significativo (Figura 1).

Chama a atenção o fato de que uma pequena modificação na estrutura química do flavonóide pode proporcionar efeitos completamente diferentes. A mudança do grupo $-\text{OH}$ do carbono $\text{C}2'$ da cadeia B (murina) para o $\text{C}3'$ (quercetina) faz com que o flavonóide não provoque mais uma inibição na atividade da enzima e passe a ativá-la. A ausência de alguns grupos $-\text{OH}$ na estrutura, observada para o kaempferol na posição $\text{C}3'$, ou a substituição de um grupo $-\text{OH}$ na posição $\text{C}3$ por um açúcar (rutinose), observada na rutina, diminui drasticamente o efeito biológico (Hammad e Abdalla, 1997) que o flavonóide poderia apresentar sobre a enzima, quando testado na atividade enzimática.

Uma vez que os efeitos ativador da quercetina e inibidor da murina poderiam ser dependentes de suas concentrações, resolvemos determinar a atividade enzimática relativa (%) em diferentes concentrações para todos os flavonóides testados (figura 2). Interessante destacar que o aumento da concentração de quercetina proporcionou um aumento muito significativo da atividade enzimática, sendo que esta ativação ocorria de forma praticamente hiperbólica na concentração até 400 μM mantendo-se praticamente constante até a concentração de 1 mM; a maior ativação ocorreu em torno de 400 μM de quercetina, cerca de 2,6 vezes.

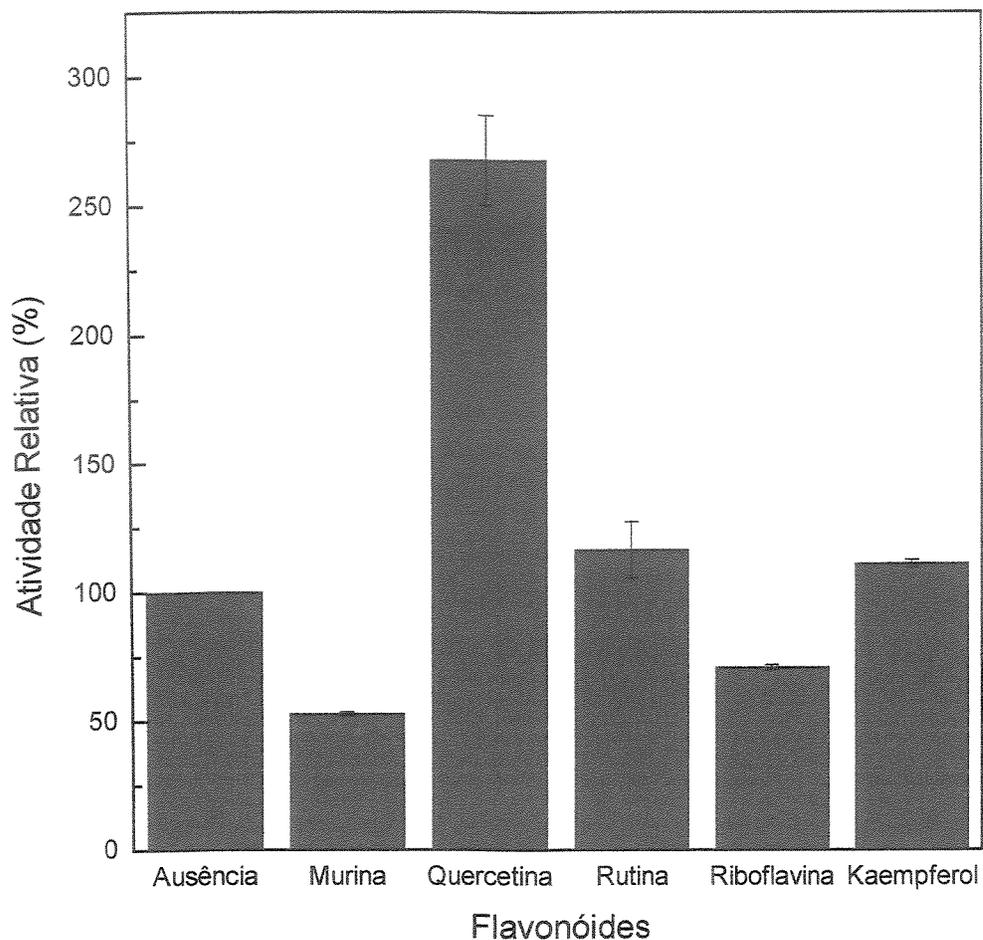


Figura 1: Efeito de Flavonóides na atividade da Proteína Tirosina Fosfatase de BMr. A atividade foi determinada como descrito em Métodos 3.2.3 na ausência ou em presença de 400 μM de flavonóides, utilizando pNPP como substrato. A atividade na ausência dos flavonóides foi tomada como controle (100%). Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam os desvios padrão (SD).

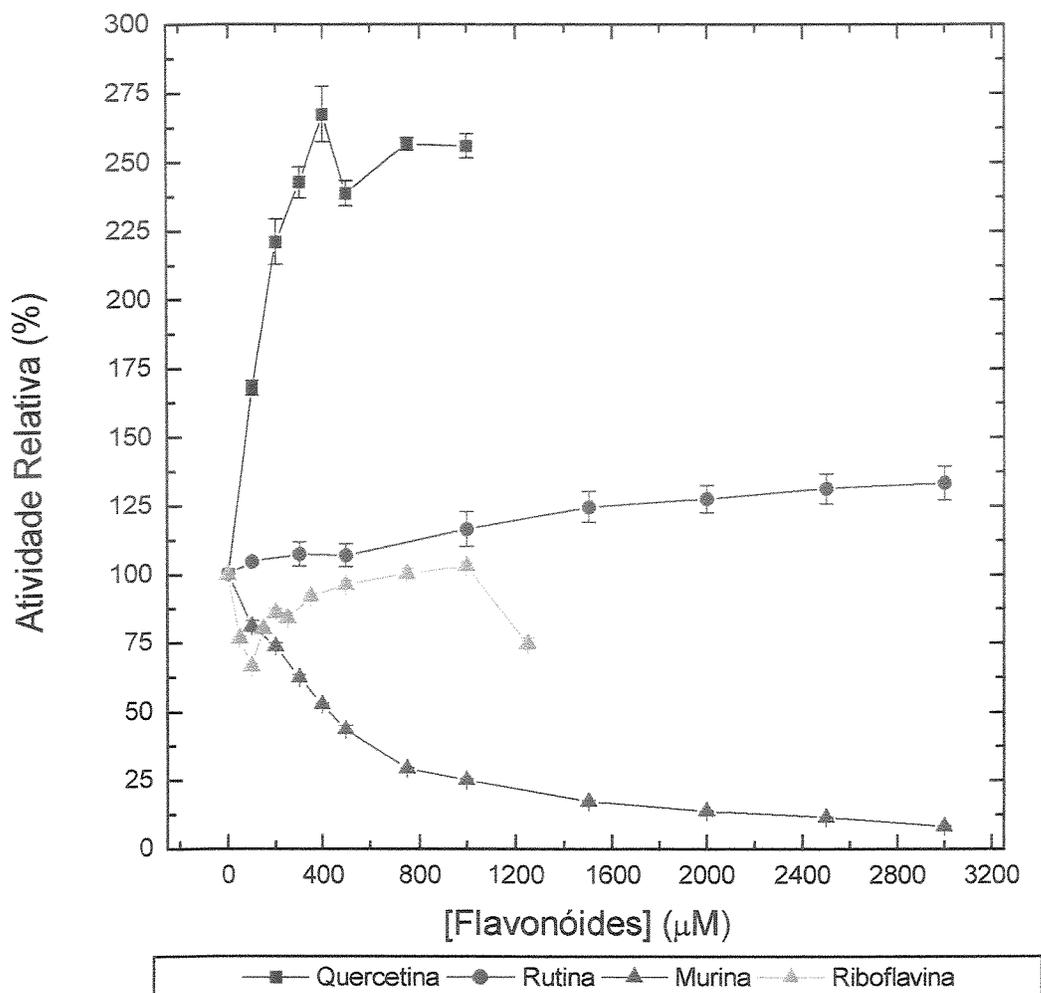


Figura 2: Efeito da Concentração de Flavonóides na Atividade da Proteína Tirosina Fosfatase de BMr com p-NPP como Substrato. A atividade enzimática foi determinada como descrito em Métodos 3.2.3, na ausência e em presença de diferentes concentrações dos compostos selecionados. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam os desvios padrão (SD).

Já o aumento da concentração de murina mostrou um efeito claramente inibitório, com uma curva semelhante a um decaimento exponencial, onde a concentração de murina que provoca 50% de inibição é em torno de 400 μM . Já a rutina apresentou uma ativação, acima de 1,4 mM, praticamente insignificante quando comparada com a quercetina. Nas mesmas condições, riboflavina não apresentou nenhum efeito considerável, quando comparado à quercetina, variando-se a sua concentração.

Como a quercetina e a murina foram, respectivamente, ativador e inibidor mais potentes, foram selecionados para o estudo do efeito causado sobre os parâmetros cinéticos (V_{max} , K_m e E_a). Podemos observar na figura 3A o efeito de diferentes concentrações de quercetina na velocidade da reação. Apesar do aumento da V_{max} em função da concentração da quercetina, ocorria um aumento também na K_m , desta forma diminuindo a constante de especificidade da enzima, indicando que o efeito ativador da quercetina não é devido a um aumento na afinidade da enzima pelo substrato. Observando a figura 3B, dos duplos recíprocos (Lineweaver e Burk, 1934), é possível verificar que a interação enzima-quercetina se dá por um mecanismo do tipo misto, pois o cruzamento das regressões lineares se dá fora dos eixos X e Y. Os valores de V_{max} , K_m e V_{max}/K_m na presença de quercetina encontram-se na tabela 2.

Como é possível constatar pelos dados na figura 3 (A e B), apesar do aumento da V_{max} na presença de quercetina, ocorreu uma diminuição da constante de especificidade da enzima. Para tentar explicar o aumento da velocidade da reação, determinou-se a energia de ativação (E_a) para a reação catalisada na presença deste flavonóide (figura 4). Observou-se a ocorrência de uma diminuição, em torno de 7,8 kJ/mol, na energia de ativação (tabela 2). Este fato pode explicar, em parte, o aumento na velocidade de reação.

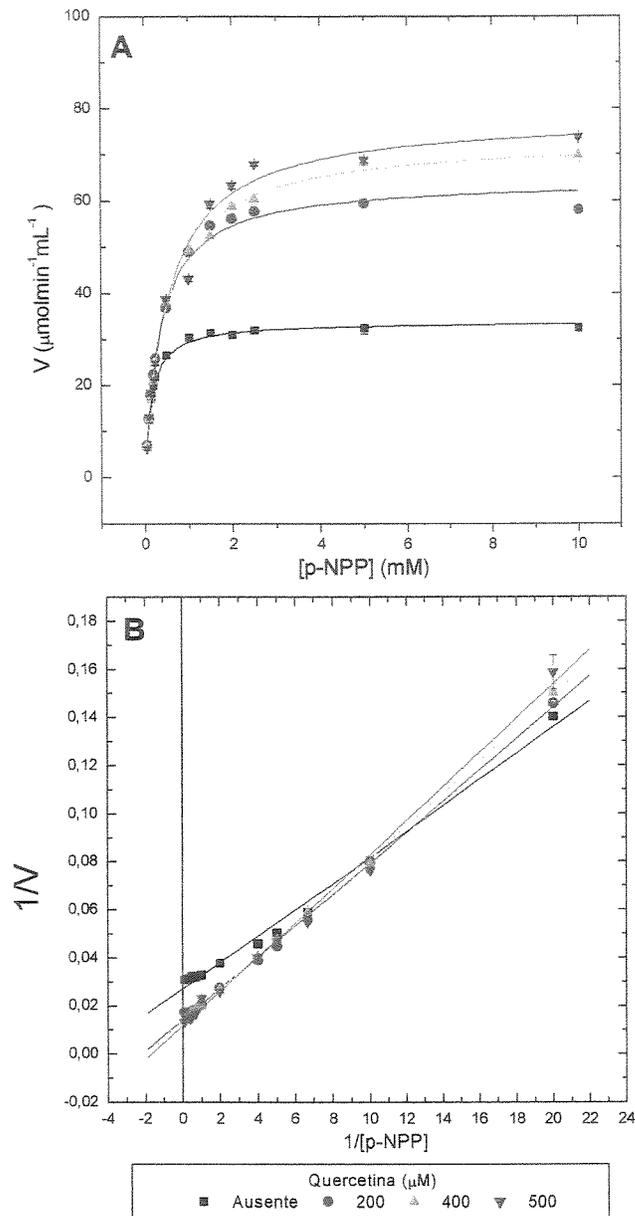


Figura 3: Determinação dos Parâmetros Cinéticos na Ausência e Presença de diferentes Concentrações de Quercetina. A atividade enzimática foi determinada como descrito em métodos 3.2.4, na ausência e na presença de diferentes concentrações de quercetina. (A) Gráfico de Michaelis-Menten; (B) Gráfico de Lineweaver-Burk. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam os desvios padrão (SD).

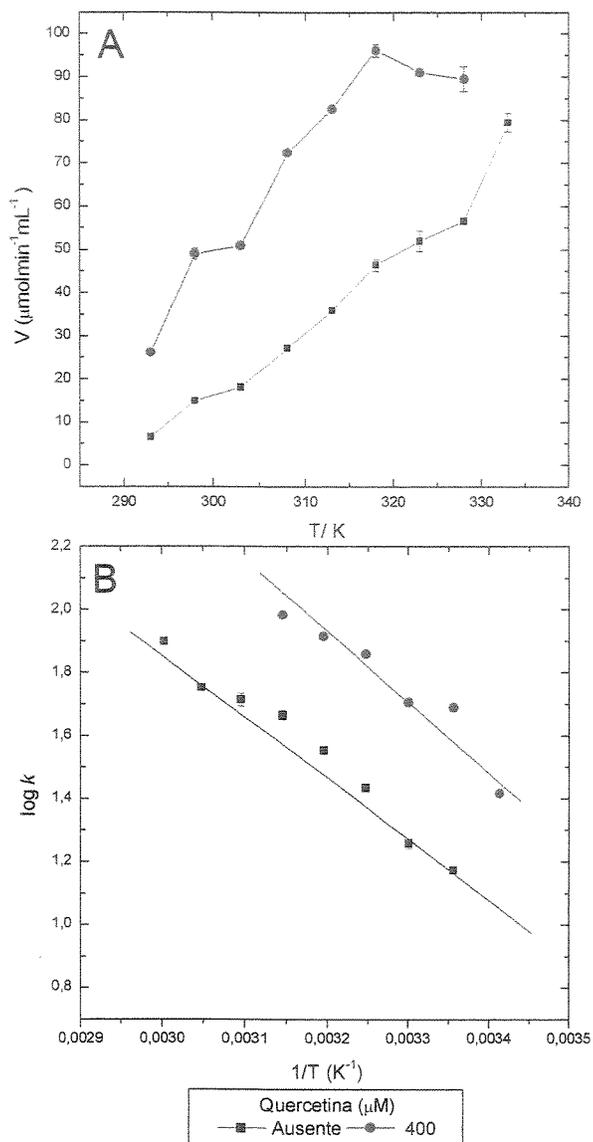


Figura 4: Cálculo da Energia de Ativação da Reação Catalisada na Ausência e presença de Quercetina. A velocidade inicial foi determinada em cada temperatura como descrito em métodos 3.2.5, com ou sem quercetina 400 μM (A), utilizando 5 mM de p-NPP como substrato, após diferentes tempos de reação. Os dados foram utilizados para a construção do gráfico de Arrhenius (B). Inclinação = E_a/R . Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam os desvios padrão (SD).

Tabela 2: Efeito da quercetina sobre os parâmetros cinéticos da Proteína Tirosina Fosfatase. Os dados foram obtidos das figuras 3 e 4.

Parâmetros	- Quercetina	+ Quercetina
V _{max} ($\mu\text{Molmin}^{-1}\text{mL}^{-1}$)	33,75	78,68
K _m (mmolL^{-1})	0,15	0,54
V _{max} /K _m	225	146
E _a (kJmol^{-1})	45,3	37,5

A figura 5A mostra o efeito de diferentes concentrações de murina na velocidade da reação. É evidente que com o aumento da concentração de substrato há uma tendência em se atingir a velocidade máxima apesar do efeito inibitório. Este fato pode ser observado na figura 5B, dos duplos recíprocos, sendo nítido que a inibição por murina se dá pelo mecanismo competitivo. A partir das inclinações das regressões lineares da figura 5B, foi possível calcular a constante de inibição (K_i) para murina, mostrada na figura 6, sendo da ordem de 58 μM .

Efetores que modificam a atividade enzimática podem apresentar efeitos diferentes quando se muda o substrato da enzima. Portanto, foi analisado o efeito de flavonóides na atividade enzimática utilizando FMN e Tyr-P como substrato. Dentre os flavonóides testados, quercetina, murina, rutina, riboflavina e kaempferol, a atividade relativa, em diferentes concentrações, permitiu constatar que a quercetina não apresentou um efeito ativador significativo na presença de FMN ou Tyr-P, quando comparado com o p-NPP. Observou-se apenas uma ativação de 10% na concentração de 300 μM utilizando FMN como substrato (figura 7) e de 30% na concentração de 1,0 mM com Tyr-P (figura 8). Já a murina apresentou uma I₅₀ de 500 μM (concentração de flavonóide que inibe 50% da atividade enzimática), utilizando-se FMN como substrato (figura 7) e de 10 μM , com Tyr-P (figura 8). Independentemente dos substratos utilizados, kaempferol não apresentou nenhum efeito apreciável sobre a atividade da enzima (figura 9).

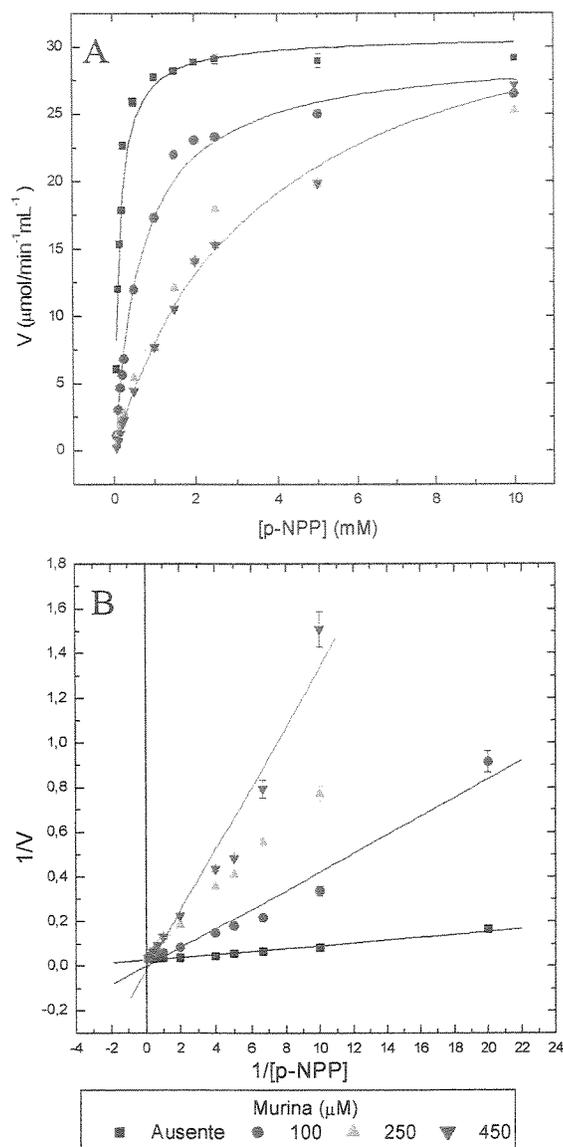


Figura 5: Determinação dos Parâmetros Cinéticos na Ausência e Presença de diferentes Concentrações de Murina. A atividade enzimática foi determinada como descrito em métodos 3.2.4, na ausência e na presença de diferentes concentrações de murina. (A) Gráfico de Michaelis-Menten; (B) Gráfico de Lineweaver-Burk. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam os desvios padrão (SD).

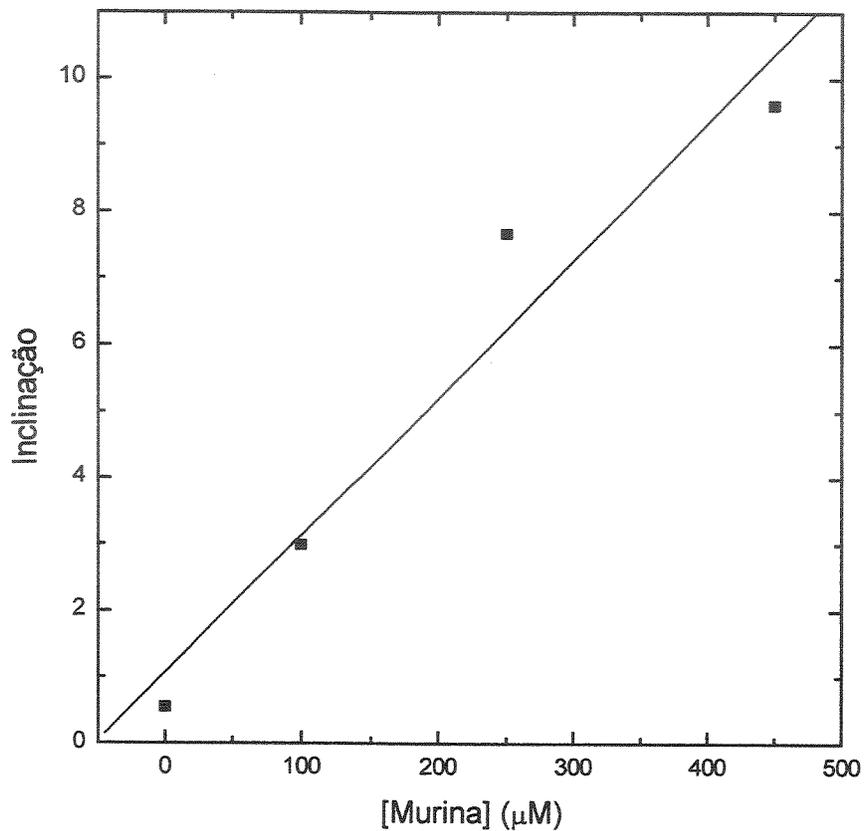


Figura 6: Determinação da Constante de Inibição (K_i) para a Murina, utilizando pNPP como substrato. A atividade enzimática foi determinada como descrito em Métodos 3.2.3 na ausência e na presença de diferentes concentrações de murina. O gráfico é obtido das inclinações das retas (Fig. 5B) *versus* concentração de murina.

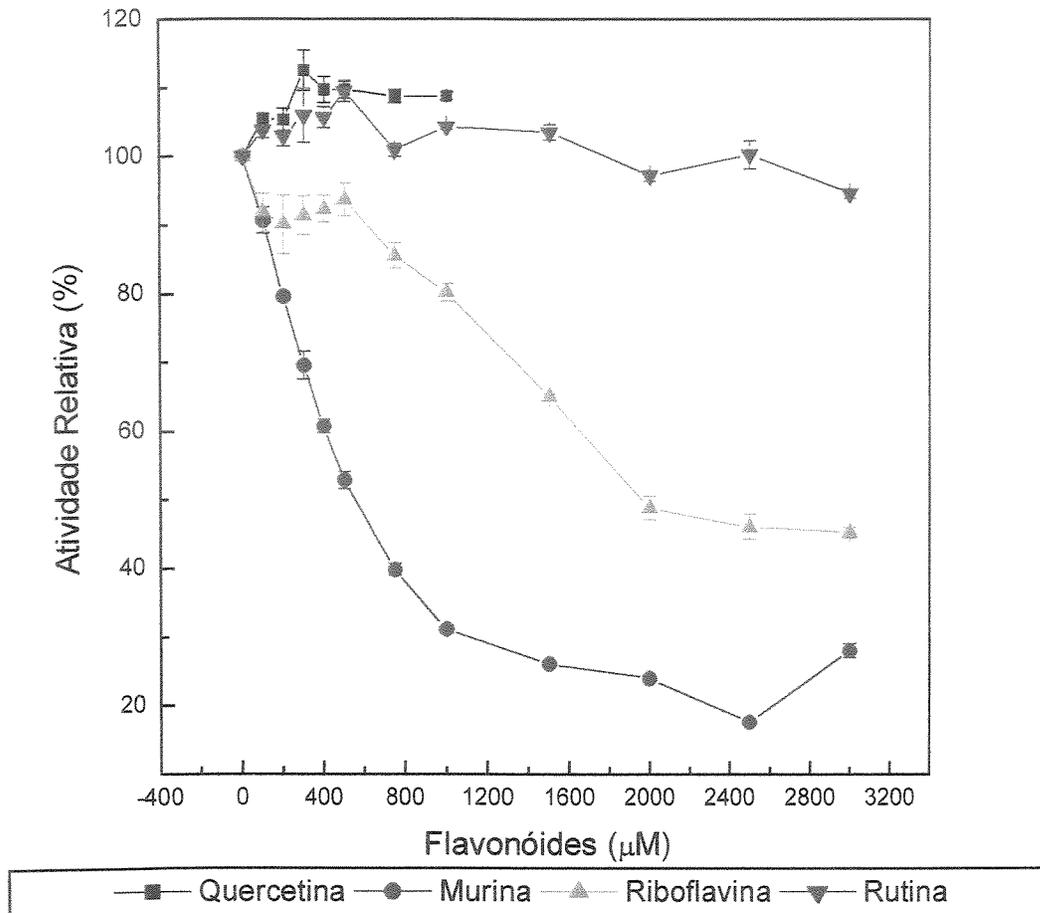


Figura 7: Efeito da Concentração de Flavonóides na Atividade da Proteína Tirosina Fosfatase de BMR na Presença de FMN. A atividade enzimática foi determinada como descrito em Métodos 3.2.3 na ausência e na presença de diferentes concentrações dos compostos selecionados. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam o desvio padrão (SD).

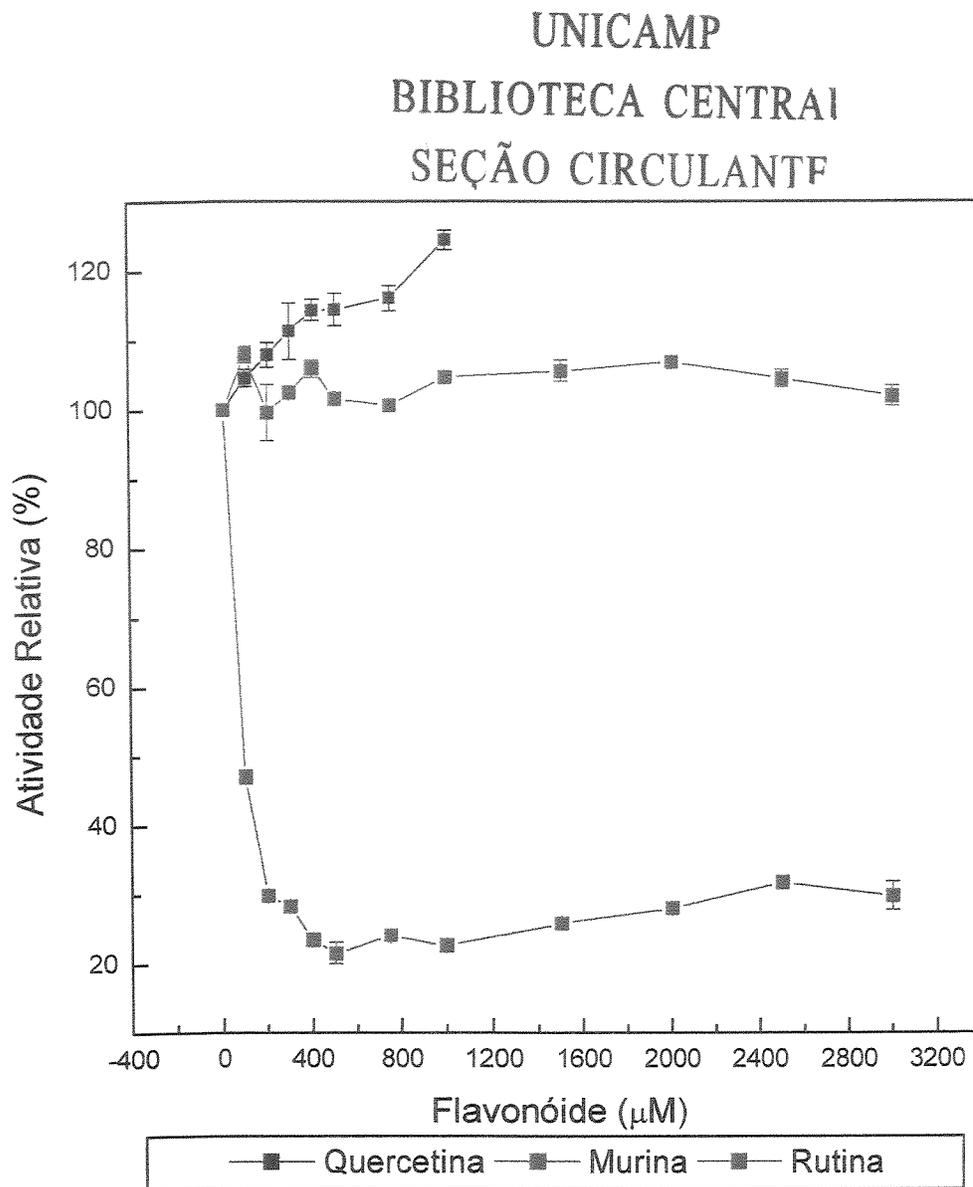


Figura 8: Efeito da Concentração de Flavonóides na Atividade da Proteína Tirosina Fosfatase de BMr na Presença de Tyr-P. A atividade enzimática foi determinada como descrito em Métodos 3.2.3 na ausência e na presença de diferentes concentrações dos compostos selecionados. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam o desvio padrão (SD).

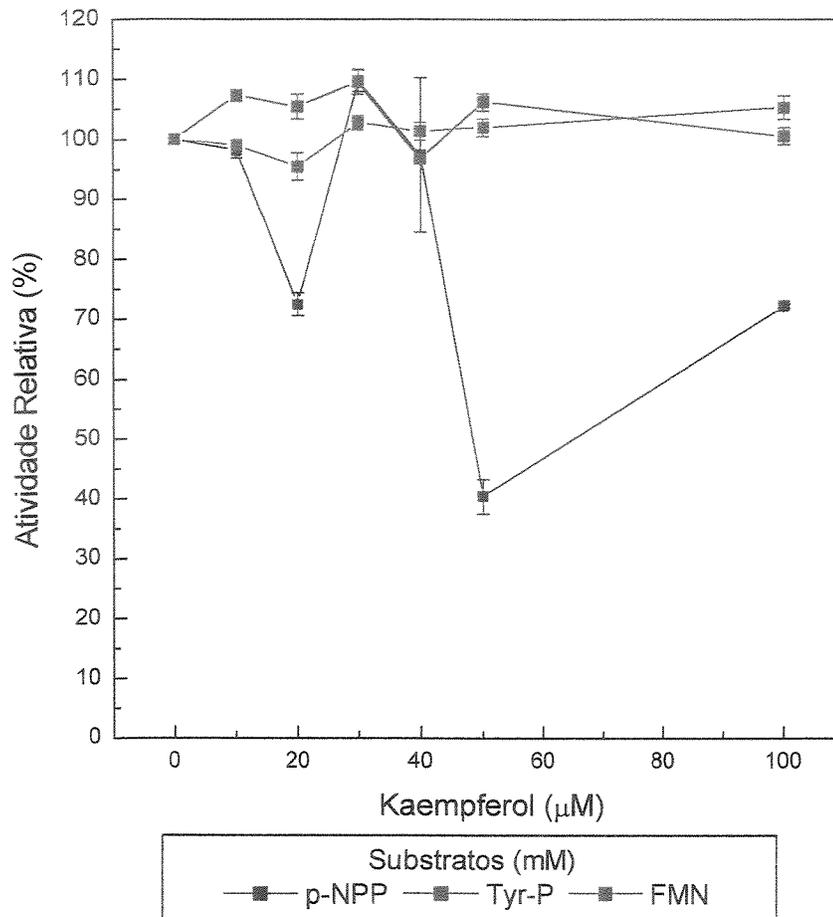


Figura 9: Efeito da Concentração de Flavonóide na Atividade da Proteína Tirosina Fosfatase de BMR utilizando p-NPP, FMN e Tyr-P como Substrato. A atividade enzimática foi determinada como descrito em Métodos 3.2.3 na ausência e na presença de diferentes concentrações do composto Kaempferol. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam o desvio padrão (SD).

Como FMN e Tyr-P são possíveis substratos fisiológicos para essa enzima (Granjeiro *et al.*, 1997b), a ativação por quercetina utilizando p-NPP, sugere a importância da interação enzima-substrato. A importância desta interação também foi observada em análises feitas com compostos purínicos na atividade da PTP (Granjeiro, 1998).

Como a murina ainda apresentou efeito de inibição considerável, foram determinados os mecanismos e a constante de inibição para os substratos FMN e Tyr-P. Nas figuras 10A e 11A, é mostrado o efeito de diferentes concentrações de murina na velocidade da reação. É bem evidente que com o aumento da concentração de substrato há uma tendência, marcante na figura 10A, em se atingir a velocidade máxima apesar do efeito inibitório. Este fato pode ser observado na figura 10B, dos duplos recíprocos, e na figura 11B, de Dixon, que a inibição por murina se dá pelo mecanismo competitivo. A partir das inclinações das regressões lineares da figura 10B, foi possível calcular a constante de inibição (K_i) para a murina utilizando FMN como substrato, equivalente a 56,5 μM (figura 12). A partir da figura 11B, foi possível calcular a constante de inibição utilizando Tyr-P como substrato, correspondendo a 55 μM . Na tabela 3, encontram-se descritas as K_i para murina, utilizando-se p-NPP, FMN e Tyr-P como substrato. Através do parâmetro K_m/K_i , que indica a eficiência da inibição utilizando o mesmo inibidor para diferentes substratos, verifica-se que a inibição provocada por murina utilizando Tyr-P é mais forte que para os demais substratos.

Tabela 3: Valores de K_i determinadas para a murina em diferentes substratos.

Substrato	Parametros		
	K_m (μM)	K_i (μM)	K_m/K_i
p-NPP	150	58	2,6
FMN	1.000	56,5	17,7
Tyr-P	2.300	55	41,8

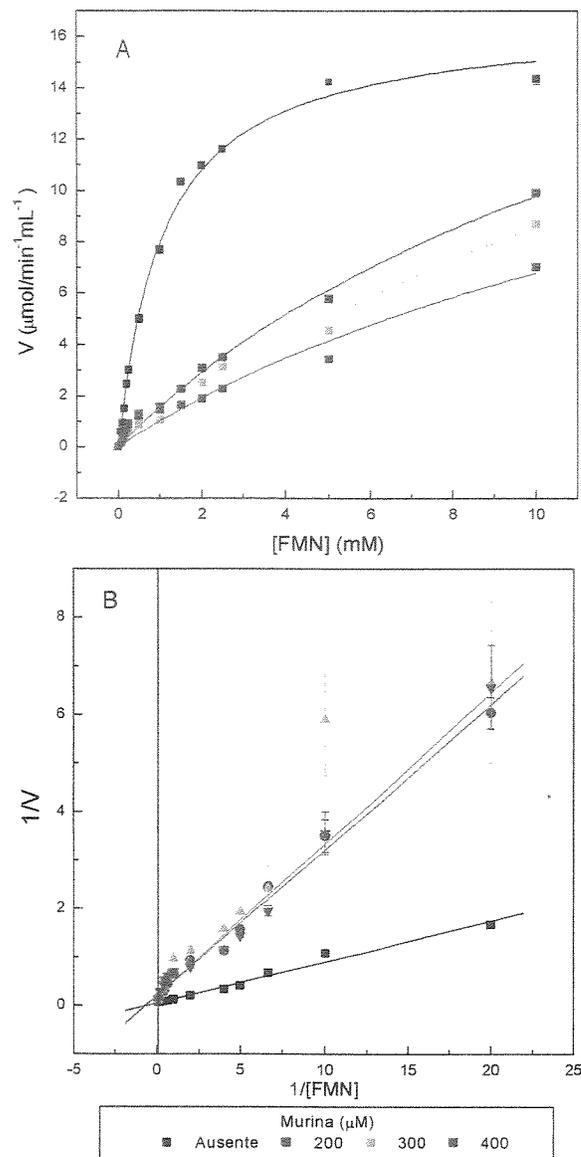


Figura 10: Determinação dos Parâmetros Cinéticos na Ausência e Presença de Diferentes Concentrações de Murina utilizando FMN como Substrato. A atividade enzimática foi determinada como descrito em Métodos 3.2.4, na ausência e na presença de diferentes concentrações de murina. (A) Gráfico de Michaelis-Menten; (B) Gráfico de Lineweaver-Burk. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam o desvio padrão (SD).

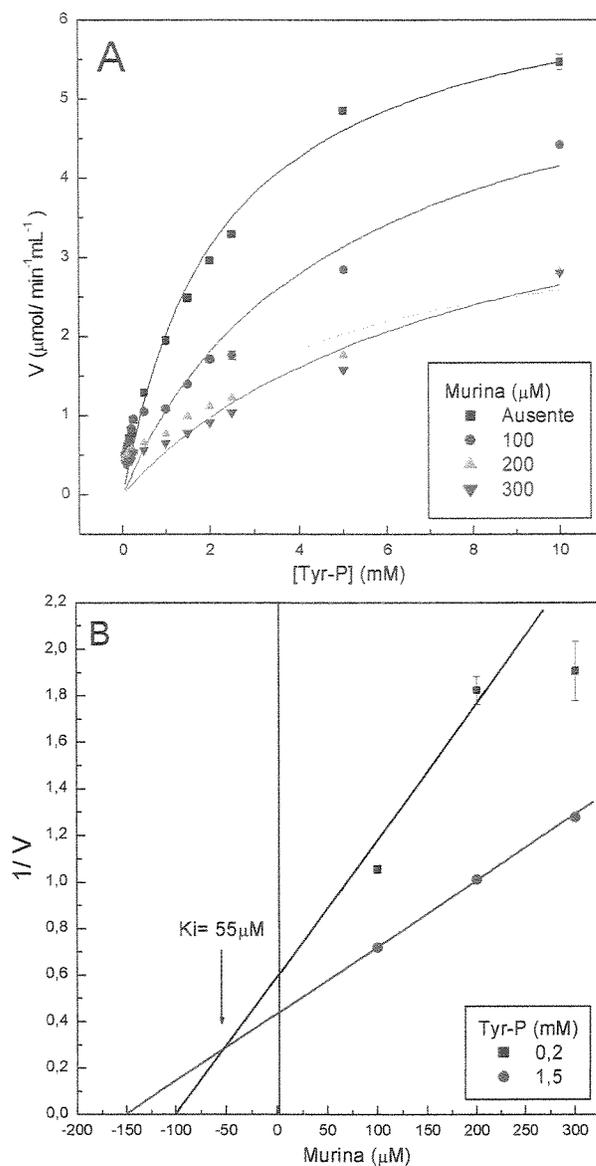


Figura 11: Determinação dos Parâmetros Cinéticos na Ausência e Presença de Diferentes Concentrações de Murina utilizando Tyr-P como Substrato. A atividade enzimática foi determinada como descrito em Métodos 3.2.4, na ausência e na presença de diferentes concentrações de murina. (A) Gráfico de Michaelis-Menten; (B) Gráfico de Dixon. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam o desvio padrão (SD).

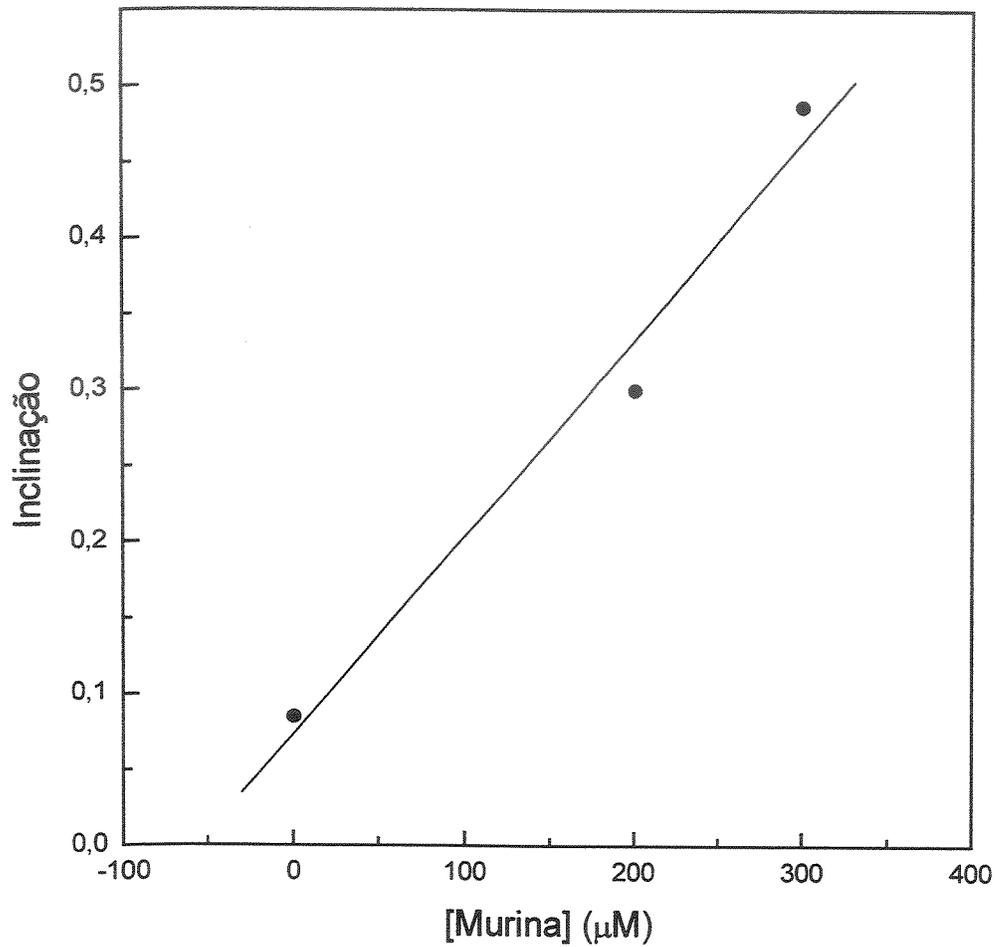


Figura 12: Determinação da Constante de Inibição (K_i) para a Murina utilizando FMN como Substrato. A atividade enzimática foi determinada como descrito em métodos 3.2.4, na ausência e na presença de diferentes concentrações de murina. O gráfico é obtido a partir das retas (fig 10B) *versus* concentração de murina.

Foi avaliado também se o pH poderia influenciar a interação enzima-flavonóides, uma vez que a variação do pH altera a carga líquida da enzima. Por esta análise, poderíamos determinar se a interação que ocorre seria do tipo eletrostática.

Em pH 5, não ocorre alteração nas cargas do flavonóide, uma vez que os pKs dos grupamentos -OH são da ordem de 4-5 (Andersson *et al.*, 1996). Na figura 13, é possível verificar que o perfil da curva de pH na presença de quercetina permanece idêntico ao da enzima na ausência de flavonóides, sendo mantido o pH ótimo de catálise enzimática em torno de 5,0. Já na curva de pH na presença de murina, observa-se que o efeito de inibição ocorre de maneira mais acentuada entre pH 4-5. Ocorre um pequeno deslocamento do pH ótimo de 5 para 6, e acima de pH 6,0 a atividade enzimática praticamente se anula, indicando que possivelmente não ocorre mais a interação entre enzima e murina.

Portanto, os resultados sugerem que a interação entre a enzima e a quercetina não deve ser eletrostática, possivelmente ocorrendo por um outro tipo de mecanismo, por exemplo, interações hidrofóbicas entre o anel aromático do flavonóide com sítios hidrofóbicos específicos da enzima. Além disso, nos flavonóides também pode ser possível a interação hidrofílica entre os grupos -OH e cetônico dos anéis A e B com a enzima. No entanto, comparando a estrutura da quercetina com a do composto purínico adenina verifica-se que ambos tem estruturas bem parecidas, com anéis aromáticos planos com grupos hidroxila ligados. Wang *et al.* (2000b) determinaram que a ativação deste purínico se dá pelo fato deste conduzir e orientar uma molécula de água no sítio ativo da enzima. Possivelmente, a quercetina poderia estar através de suas hidroxilas nas posições C3' e C4' desempenhado o mesmo papel que o composto purínico adenina.

No caso da murina, o componente eletrostático deve ser levado em consideração. Sabe-se que o NaCl inibe a atividade da PTP de BMr de rim bovino por interações eletrostáticas. A partir disso procuramos verificar se a quercetina e a murina poderiam ter qualquer efeito revertendo este efeito do sal, preservando a

atividade enzimática. Na figura 14, pudemos constatar que a quercetina não foi capaz de reverter o efeito de NaCl, pois o perfil de inativação foi o mesmo apresentado na ausência do flavonóide, indicando, novamente, que a interação enzima-quercetina não é eletrostática. Já na presença de murina, ocorreu uma proteção da atividade enzimática de cerca de 40% a partir da concentração de 125mM de NaCl. Outro fator importante que reforça o efeito eletrostático na interação enzima-murina é que abaixo de 50 mM de NaCl o efeito protetor da murina não ocorre.

Como os resultados mostraram que a murina é um bom inibidor competitivo e seu efeito foi revertido na presença de NaCl, supôs-se que a murina poderia colaborar para proteger a enzima da desnaturação térmica devido a sua forte interação. Desta forma, procurou-se confirmar este indício através de estudos de estabilidade e desnaturação térmica. Testou-se diferentes compostos como fosfato (Pi) (inibidor competitivo clássico) e DTT (impede a oxidação de grupos -SH da enzima) como protetores da enzima nos estudos de desnaturação.

Nas figuras 15 e 16, estão agrupados os resultados obtidos durante a desnaturação térmica da enzima. Percebe-se que o Pi é o único composto a proteger a desnaturação da enzima devido a sua interação com o sítio ativo (Taga e Van Etten, 1982). Já o DTT e a murina não protegem a enzima da desnaturação mas, ao contrário, intensificam o efeito. É importante salientar que, quando adicionados murina e Pi, o Pi consegue reverter o efeito de inativação intensificado pela murina. Este resultado reafirma que a murina é um inibidor competitivo, como visto anteriormente nos gráficos 5 e 6.

Nos experimentos de estabilidade e desnaturação térmica, no qual foi analisado o efeito do DTT, a quantificação do Pi foi realizada pelo método proposto por Sumner (1944). A mudança se tornou necessária, uma vez que o DTT interfere no método de determinação do fosfato proposto por Lowry-Lopez (1946).

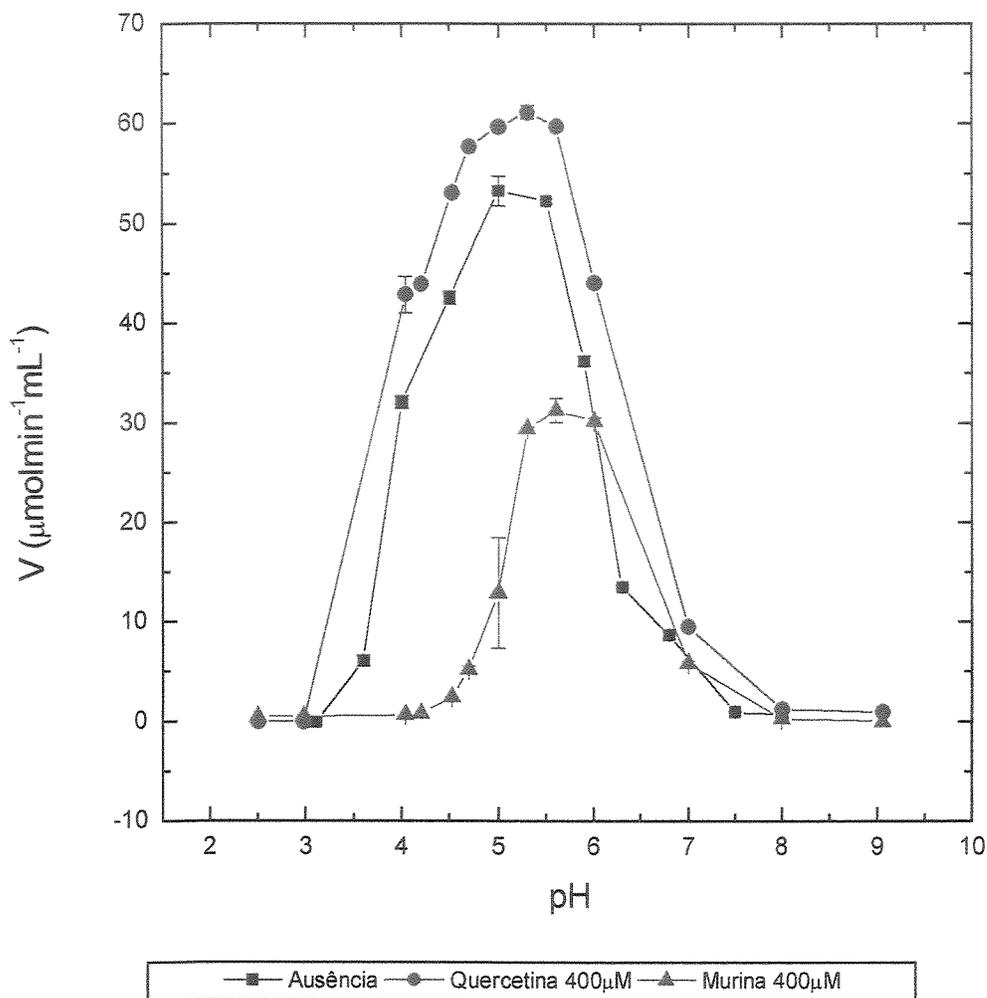


Figura 13: Efeito do pH na hidrólise do p-NPP na ausência e na presença de quercetina e murina. A atividade foi determinada como descrito em Métodos 3.2.6, em diferentes valores de pH, na presença de 400 μM dos respectivos compostos. A atividade na ausência do flavonóide foi tomada como controle. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam o desvio padrão (SD).

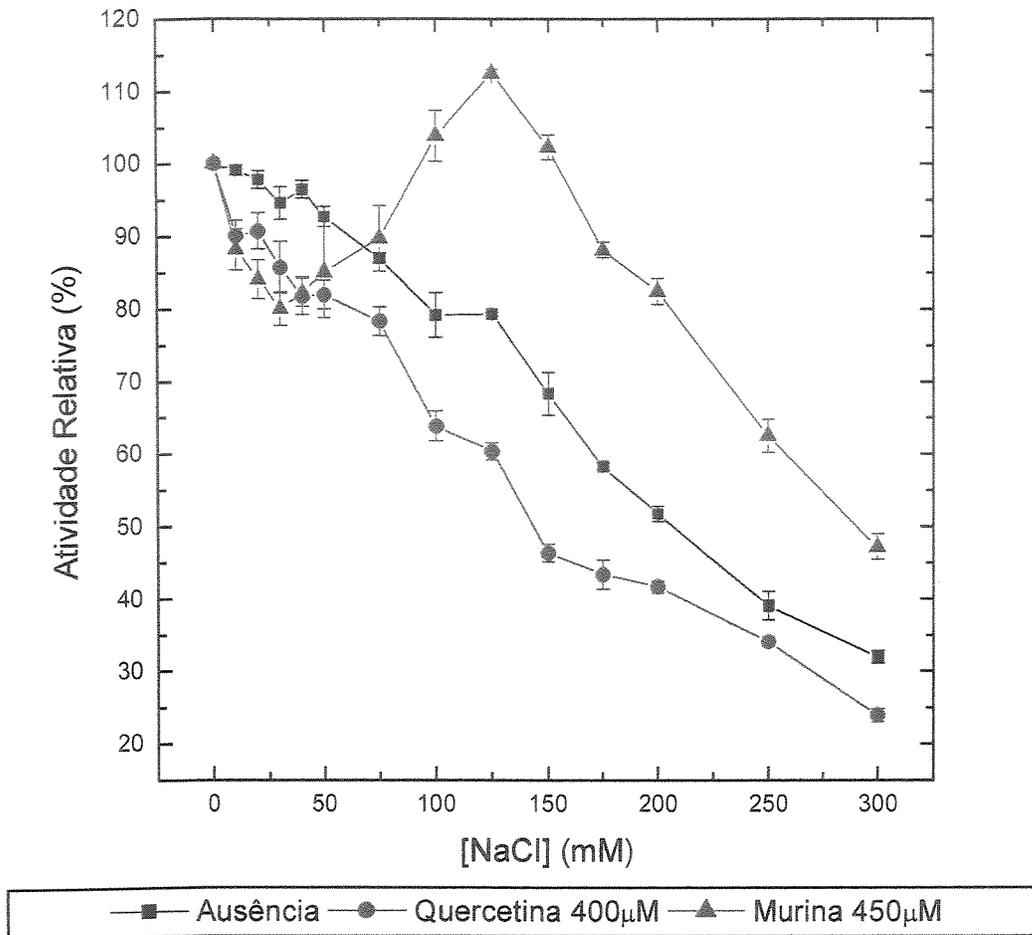


Figura 14: Efeito da concentração de NaCl na atividade da enzima na ausência e na presença de Quercetina e Murina. O ensaio foi realizado como descrito em Métodos 3.2.8, em diferentes concentrações de NaCl, na ausência e na presença de flavonóides, nas concentrações indicadas. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam o desvio padrão (SD).

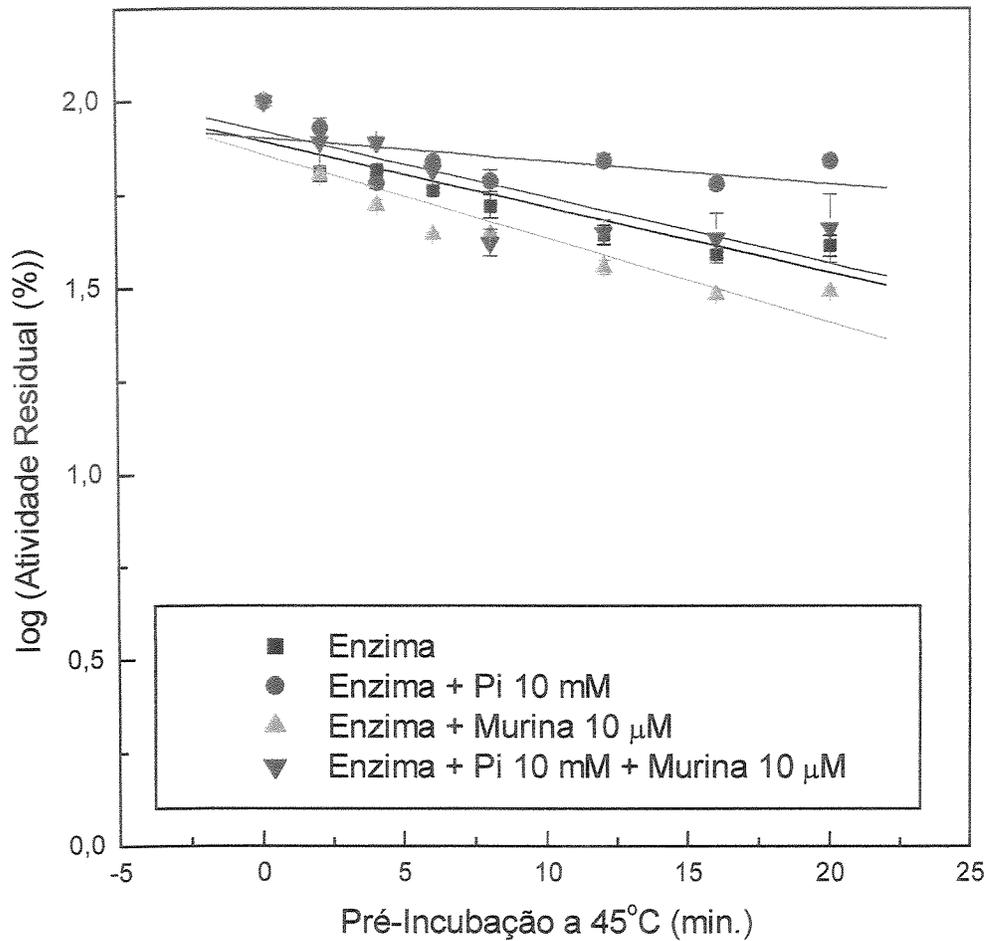


Figura 15: Efeito de Fosfato Inorgânico na Estabilidade Enzimática. A enzima foi pré-incubada a 45°C por diferentes períodos, na ausência e em presença dos compostos nas concentrações indicadas. A atividade residual relativa foi determinada como descrito em Métodos 3.2.7, tomando-se a atividade na ausência de compostos como 100%. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam o desvio padrão (SD).

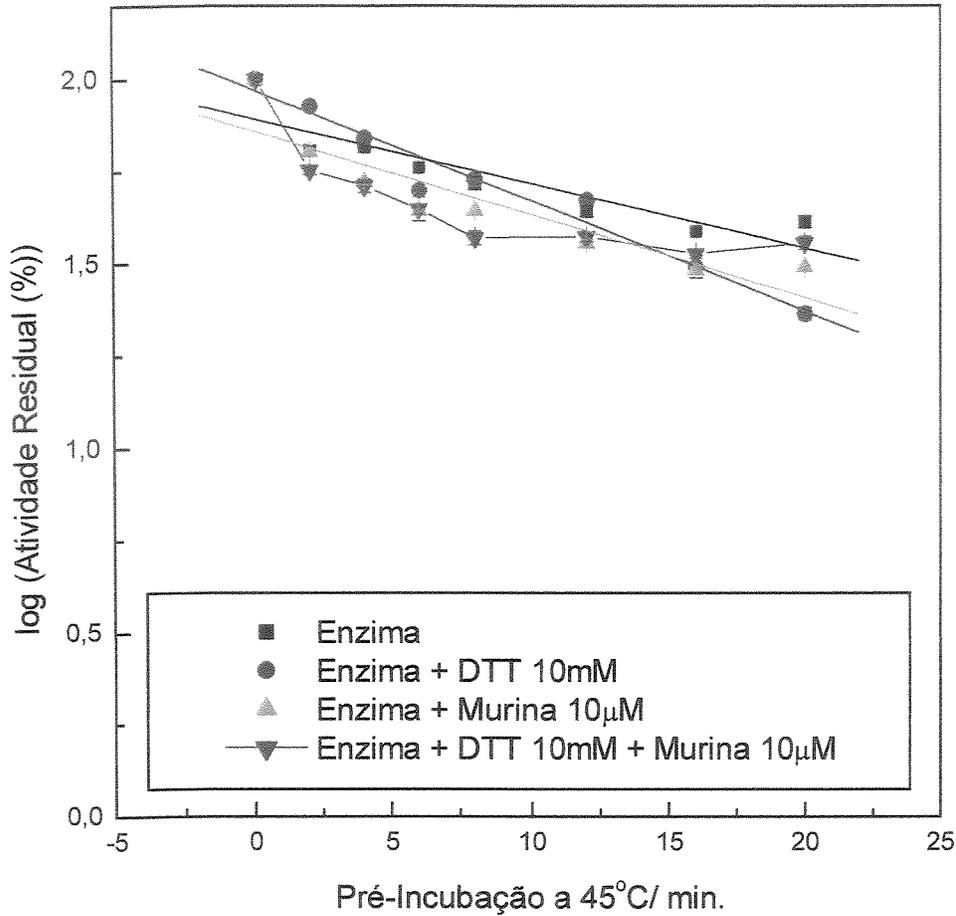


Figura 16: Efeito de DTT na Estabilidade Enzimática. A enzima foi pré-incubada a 45°C por diferentes períodos, na ausência e em presença dos compostos nas concentrações indicadas. A atividade residual relativa foi determinada como descrito em Métodos 3.2.7, tomando-se a atividade na ausência de compostos como 100%. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam o desvio padrão (SD).

5- DISCUSSÃO

Através da análise dos resultados obtidos, é possível avaliarmos o efeito que os flavonóides exercem sobre a atividade enzimática. A PTP de BMr de rim bovino foi ativada pela quercetina, utilizando p-NPP como substrato (figuras 2 e 3), e inibida por murina na presença dos substratos p-NPP, FMN e Tyr-P (figuras 2, 5, 7, 8, 10 e 11). Já rutina, riboflavina (figuras 2, 7 e 8) e kaempferol (figura 9) não apresentaram alteração significativa na atividade da enzima.

É importante chamar a atenção para a relação estrutura do flavonóide com o efeito que ele produz na atividade enzimática. Vários autores vêm discutindo a importância da estrutura do flavonóide e sua influência nos sistemas analisados. É de comum acordo que para apresentarem efeitos os flavonóides devem ter grupos –OH presos ao anel B. Estes pontos possuem alta densidade eletrônica propícias para interações como pontes de hidrogênio do tipo intermolecular (Ferriola *et al.*, 1989), e a variação destes grupos modifica o tipo de efeito provocado.

Em nosso caso, a quercetina (um bom ativador) possui estes grupos –OH nas posições 3' e 4'. A posição destas hidroxilas é propício para formar ponte de hidrogênio com uma molécula de água. Wang *et al.* (2000b), propuseram um mecanismo de ativação enzimática por adenina que consistia na coordenação de uma molécula de água no sítio ativo da enzima favorecendo a catálise. A quercetina poderia estar desempenhando o mesmo papel que o composto purínico adenina.

A murina (um excelente inibidor) apresenta esses grupos –OH nas posições 2' e 4'. As hidroxilas nestas posições favorecem a formação de pontes de hidrogênio do tipo intra-molecular, ou seja, não existiria a possibilidade de carregar uma molécula de água para o sítio catalítico, mas não impede que ela possa entrar e coordenar-se em pontos importantes competindo com o substrato. Isto é possível devido ao arranjo espacial plano, conferido pelos anéis presentes nos flavonóides. Como o kaempferol não tem um grupo –OH na posição 4' do anel B, seu efeito sobre a enzima é desconsiderável.

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

Já a glicosilação ou metilação dos grupos –OH nas posições indicadas anteriormente diminui drasticamente o efeito dos flavonóides (Murakami *et al.*, 1999). É o caso da rutina que apresenta uma glicosilação com uma rutinose no grupo –OH da posição 3. A substituição que ocorre nesta posição anula o efeito que a dupla ligação nos carbonos 2 e 3 poderia ter de deslocamento da intensidade eletrônica intensificando o efeito do flavonóide. É também importante analisar que o aumento de volume da molécula provoca um impedimento estérico, ou seja, o flavonóide perde seu efeito por não poder entrar no sítio ativo da enzima (Nikolovska-Coleska *et al.*, 1998).

Um outro fator importante na interação enzima-flavonóide considera que o flavonóide deve estar numa conformação estrutural formando um ângulo de 45° entre o anel B e o restante da estrutura (na forma de sofá). Isto é possível devido à presença de uma simples ligação de livre rotação que une o anel fenólico B ao restante da estrutura do flavonóide (Ferriola *et al.*, 1989). Um ponto que ainda pode ser analisado é a interação enzima-flavonóide, podendo ocorrer no domínio catalítico da enzima, uma vez que a murina é um inibidor competitivo. Há a possibilidade dos grupos –OH da murina interagirem com os grupos –SH presentes nas cisteínas do sítio ativo, inativando as cisteínas importantes para a catálise. Outros tipos de interação que possam estar ocorrendo são pontes de hidrogênio com

outros aminoácidos do sítio ativo, facilitando a permanência da murina (Nikolovska-Coleska *et al.*, 1998).

O flavonóide pode, também, interagir com a enzima através de cargas eletrostáticas, como a murina que promove alterações no pH ótimo da enzima de uma unidade (figura 13) e teve efeito protetor de 40% em altas concentrações de NaCl (figura 14), impedindo que a enzima perdesse atividade por ação das cargas do NaCl.

Em geral, inibidores do tipo competitivo como o Pi ligam-se à enzima mantendo a estrutura enzimática íntegra durante a desnaturação. Isto pode ser observado, nos resultados apresentados na figura 15. No entanto, a murina, também um inibidor competitivo, como observado nos resultados das figuras 5 e 6, não produz o mesmo efeito de proteção. Como a interação enzima-flavonóide pode estar ocorrendo com formação de pontes de hidrogênio ou com interações com os grupos -SH da enzima, pode ser que estas interações não sejam fortes o suficiente para manter a integridade da enzima durante a desnaturação térmica. Já o DTT, utilizado como um agente redutor para manter os grupos -SH do sítio ativo da enzima integros, não foi capaz de proteger a enzima, nem reverter o efeito da murina durante a desnaturação; ao contrário, o DTT e a murina apresentam efeitos semelhantes.

Como nos últimos anos muito se tem estudado a respeito do mecanismo de fosforilação e desfosforilação de proteínas, pois através deste mecanismo é disparado uma série de efeitos biológicos como produção de hormônios, mitógenos, oncogenes, citocinas, neurotransmissores, e considerando que, a fosforilação e desfosforilação em resíduos de tirosina tem surgido como um elemento importante em processos como crescimento, desenvolvimento e divisão celular, existe uma grande expectativa sobre o efeito de flavonóides nestes sistemas. Já é notório que a quercetina é um potente inibidor de uma série de proteínas quinases responsáveis por fosforilações de proteínas importantes como a fosfoinositídeo-3-quinase e proteína quinase C (Payraastre *et al.*, 1999), consideradas enzimas chaves em

sistemas celulares, incluindo multiplicação celular, apoptose e transformação. No entanto, a quercetina é um excelente ativador de proteína tirosina fosfatase, sendo que, até o momento não existiam trabalhos discutindo esta relação.

É notável o efeito inibitório que os flavonóides possuem sobre enzimas chaves que fazem parte do sistema de transdução de sinal e como um antiproliferante tumoral. O mecanismo responsável por esses efeitos ainda não é muito bem conhecido, mas é claro o efeito que eles promovem sobre vários sistemas metabólicos como a ativação de enzimas glicolíticas ou proteínas de síntese. Por isso, ainda há um vasto campo de pesquisa sobre a atuação dos flavonóides.

6- PERSPECTIVAS

Nos últimos anos, estudou-se muito o efeito de flavonóides sobre a atividade de diversos tipos de enzimas, principalmente as quinases ou as enzimas envolvidas nos processos anti-oxidantes (Day *et al.*, 2000; Ferreira *et al.*, 2000; Bormann e Melzing, 2000; Shimizu *et al.*, 2000). As quinases foram exaustivamente estudadas devido ao fato de estarem ligadas a processos celulares importantes como crescimento, desenvolvimento e diferenciação celular. O objetivo maior de se estudar o efeito de flavonóides na atividade das quinases está relacionado com estudos de alguns tipos de câncer, pois estas podem estar envolvidas no descontrole celular que origina os tumores.

No entanto, muito se tem feito e dado importância ao mecanismo de regulação por fosforilação e desfosforilação. O balanço desse mecanismo é de extrema importância para os processos celulares acima citados e fazem parte de mecanismo de regulação enzimática em etapa chave do metabolismo e da cascata de eventos controlados por hormônios. Assim, torna-se importante o estudo do efeito dos flavonóides sobre as fosfatases em geral. Como as fosfatases são divididas em vários grupos, é provável que haja efeitos distintos dos flavonóides sobre a atividade das diferentes classes. Nesta situação, poderiam ser utilizadas fosfatases de origens diferentes como animal, vegetal e de microorganismos.

Além do estudo de fosfatases de diferentes origens, poderiam ser testados outros flavonóides com diferenças estruturais mais marcantes para tentar propor, com um maior número de dados, um possível mecanismo de modulação enzimática pelos flavonóides.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFANAS'EV, I.B.; DOROZHKO, A.I.; BRODSKII, A.V.; KOSTYUK, V.A. and POTAPOVITCH, A.I. (1989). Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.*, 38: 1763-1769.
- ANDERSSON, C. M.; HALLBERG, A. and HÖGBERG, T. (1996). Advances in the development of pharmaceutical antioxidants. *Adv. Drug Res.*, 28: 65-180.
- ANTÔNIO, M. A. and BRITO, A. R. M. S. (1998) Oral anti-inflammatory and anti-ulcerogenic activities of a hydroalcoholic extract and partitioned fractions of *Turnera ulmifolia* (Turneraceae). *J. Ethnopharmacol.*, 61: 215-228.
- BERTI, A.; RIGACCI, S.; RAUGEI, G.; DEGL'INNOCENTI, D. and RAMPONI, G. (1994). Inhibition of cellular response to platelet-derived growth factor by low Mr phosphotyrosine protein phosphatase. *FEBS Lett.*, 349: 7-12.
- BIRT, D.F.; MITCHELL, D.; GOLD, B.; POUR, P. and PINCH, H.C. (1997). Inhibition of ultraviolet light induced skin carcinogenesis in SKH-1 mice by apigenin, a plant flavonoid. *Anticancer Res.*, 17: 85-92.
- BOHMONT, G; AARONSON, L.M.; MANN, K. and PARDINI, R.S. (1987). - Inhibition of mitochondrial NADH oxidase, succinoxidase, and ATPase by naturally occurring flavonoids. *J. Nat. Prod.*, 50: 427-433.
- BORMANN, H. and MELZING, M.F. (2000) Inhibition of metallopeptidases by flavonoids and related compounds. *Pharmazie*, 55: 129-132.
- BURKE, T. R. and ZHANG, Z. Y. (1998). Protein-Tyrosine phosphatase: structure, mechanism, and inhibitor discovery. *Biopolymers*, 47: 225-241.
- CAMICI, G.; MANAO, G.; CAPPUGI, G.; MODESTI, A.; STEFANI, M. and RAMPONI, G. (1989) The complete amino acid sequence of the low molecular weight cytosolic acid phosphatase. *J. Biol. Chem.*, 264: 2560-2567.

- CARRERO, P.; ORTEGA, H.; BOTAS, J. M.; CORONADO, D. G. And LASUNCIÓN, M. A. (1998) Flavonoid induced ability of minimally modified low density lipoproteins to support lymphocyte proliferation. **Biochem. Pharmacol.**, 55: 1125-1129.
- CASELLI, A.; PAZZAGLI, L.; PAOLI, P.; MANAO, G.; CAMICI, G.; CAPPUGI, G. and RAMPONI, G. (1994a) Porcine liver low Mr phosphotyrosine protein phosphatase: The amino acid sequence. **J. Prot. Chem.**, 13: 107-115.
- CASELLI, A.; CAMICI, G.; MANAO G. ;MONETI, G.; PAZZAGLI, L.; CAPPUGI G. and RAMPONI, G (1994b) Nitride oxide causes inactivation of the low molecular weigth phosphotyrosine protein phosphatase. **J. Biol. Chem.**, 269: 24878-24882.
- CHAIMOVICH, H. and NOME, F. (1970) Purification and properties of an acid phosphatase from bovine brain. **Arch. Biochem. Biophys.**, 139: 9-16.
- CHERNOFF, J. and LI, H. C. (1985) A major phosphotyrosylprotein phosphatase from bovine heart is associated with a low-molecular-weight acid phosphatase. **Arch. Biochem. Biophys.** 240: 135-145.
- CHIARUGI, P.; CIRRI, G.; CAMICI, G.; MANAO, G.; FIASCHI, T.; RAUGEI, G.; CAPPUGI, G. and RAMPONI, G. (1994) The role of His65 and His72 in the reaction mechanism of bovine liver low Mr phosphotyrosine protein phosphatase. **Biochem. J.**, 298: 427-433.
- CHIARUGI, P.; CIRRI, P.; RAUGEI, G.; CAMICI, G.; DOLFI, F.; BERTI, A. and RAMPONI, G. (1995) PDGF receptor as a specific *in vivo* target for low Mr phosphotyrosine protein phosphatase. **FEBS Lett.**, 372: 49-53.
- CHU, S.C.; HSIEH, Y.S. and LIN, J.Y.(1992). Inhibitory effects of flavonoids on moloney murine leukemia virus reverse trancriptase activity. **J. Nat. Prod.**, 55: 179-183.

- CIRRI, P.; CHIARUGI, P.; CAMICI, G.; MANAO, G.; PAZZAGLI, L.; CASELLI, A.; BARGHINI, I.; CAPUGGI, G.; RAUGEI, G. and RAMPONI, G. (1993b) The role of Cys 17 in the pyridoxal 5'-phosphate inhibition of the bovine liver low Mr phosphotyrosine protein phosphatase. **Biochim. Biophys. Acta**, 1161: 216-222.
- COHEN, P. (1992) Signal integration at the level of protein kinases, protein phosphatases and their substrates. **Trends Biochem. Sci.**, 17, 408-413.
- CUSHMAN, M.; NAGARATHMAM, D.; BURG, D.L. and GEAHLEN, R. L.(1991). Synthesis and protein-tyrosine kinase inhibitory activities of flavonoids analogues. **J. Med. Chem.**, 34: 798-806.
- DAS, D.K.(1994). Naturally occurring flavonoids: structure, chemistry, and high-performance liquid chromatography methods for separation and characterization. **Meth. Enzymol.**, 234: 410-420.
- DAS, M. and RAY, P. K. (1988). Lipid antioxidant properties of quercetin *in vitro*. **Biochemistry**, 17: 203-209.
- DAVIS, J. P.; ZHOU, M. M. and VAN ETTEN, R. L. (1994a) Kinetic and site-directed mutagenesis studies of the cysteine residues of bovine low molecular weight phosphotyrosil protein phosphatase. **J. Biol. Chem.**, 269: 8734-8740.
- DAY, A.J.; CAÑADA, F.J.; DÍAZ, J.C.; KROON, P.A.; MCLAUCHLAN, R.; FAULDS, C.B.; PLUMB, G.W.; MORGAN, M.R.A. and WILLIAMSON, G (2000) Dietary flavonoids and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hidrolase. **FEBS Lett.**, 468: 166-170.
- DESCHNER, E.E.; RUPERTO, J.; WONG, G. and NEWMARK, H.L. (1991) Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. **Carcinogenesis**, 12: 1193-1196.
- DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A. A. and CAPASSO, F. (1999) Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sciences**, 65: 337-353.

UNICAMP

BIBLIOTECA CENTRAL

SEÇÃO CIRCULANTE

- DISSING, J.; DAHL, O. and SVENSMARK, O. (1979) Phosphonic and arsonic acids as inhibitors of human red cell acid phosphatase and their use in affinity chromatography. **Biochim. Biophys. Acta**, 569: 159-176.
- DISSING, J. and SVENSMARK, O. (1990) Human red cell acid phosphatase: purification and properties of the A, B e C isoenzymes. **Biochim. Biophys. Acta.**, 1041: 232-242.
- DISSING, J.; JOHNSEN, A.H. and SENSABAUGH, G.F. (1991) Human red cell acid phosphatase (ACP1). The amino acid sequence of the two isozymes Bf and Bs encoded by the ACP1*B allele. **J. Biol. Chem.**, 266: 20619-20625.
- DISSING, J. and JOHNSEN, A. H. (1992) Human red cell acid phosphatase (ACP1). The primary structure of the two pairs of isozymes encoded by the ACP1*A and ACP1*C alleles. **Biochim. Biophys. Acta**, 1121: 261-268.
- FAUMAN, E. B. and SAPER, M. A. (1996) Structure and function of the protein tyrosine phosphatases. **Trends Biochem. Sci.**, 21: 413-417.
- FERREIRA, A.C.F.; ROSENTHAL, D. and CARVALHO, D.P. (2000) Thyroid peroxidase inhibition by *Kalanchoe brasiliensis* aqueous extract. **Fd Chem. Toxic.**, 38: 417-421.
- FERRIOLA, C.P.; CODY, V. and MIDDLETON, E.(1989). Protein kinase C inhibition by plant flavonoids. – Kinetic mechanisms and structure-activity relationships. **Biochem. Pharmacol.**, 38: 1617–1624.
- FORMICA, J.V. and REGELSON, W.(1995). Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. **Fd Chem. Toxic.**, 33: 1061–1080.
- FUCHS, K. R.; SHEKELS, L. L. and BERNLOHR, D. A. (1992) Analysis of the ACP1 gene product: classification as an FMN phosphatase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 189: 1598-1605.
- FUJIMOTO, S.; MURAKANI, K.; ISHIKAWA, A. HIMI, K. and OHARA, A. (1988) Two distinct low-molecular-weight acid phosphatases from rat liver. **Chem. Pharm. Bull.**, 36: 3020-3026.

- GRANJEIRO, J. M.; TAGA, E. M. and AOYAMA, H. (1997a) Purification and characterization of a low-molecular-weight bovine kidney acid phosphatase. **An. Acad. Bras. Ci.**, 69: 451-460.
- GRANJEIRO, J.M; FERREIRA, C. V.; JUCÁ, M. B.; TAGA, E. M. and AOYAMA, H. (1997b) Bovine kidney low molecular weight acid phosphatase: FMN – dependent kinetics. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, 41: 1201-1208.
- GRANJEIRO, J.M. (1998) Tese de Doutorado, Instituto de Química UNICAMP.
- GRYGLEWSKI, R.J.; KORBUT, R.; ROBAK, J. and SWIES, J.(1987). On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids. **Biochem. Pharmacol.**, 36: 317–322.
- HAENEN, G. R. M. M.; PAQUAY, J. B. G.; KORTHOUWER, R. E. M. and BAST, A. (1997). Peroxynitrite scavenging by flavonoids. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 236: 591-593.
- HAMMAD, H. M. and ABDALLA, S. S. (1997). Pharmacological effects of selected flavonoids on rat isolated ileum: structure-activity relationship. **Gen. Pharmacol.**, 28(5): 767-771.
- HEINRIKSON, R. L. (1969) Purification and characterization of a low molecular weight acid phosphatase from bovine liver. **J. Biol. Chem.**, 244: 299-307.
- HENGGE, A. C.; ZHAO, Y.; WU, L. and ZHANG, Z. Y. (1997) Examination of the transition state of the low-molecular mass small tyrosine phosphatase 1. Comparisons with other protein phosphatases. **Biochemistry**, 36: 7928-7936.
- HERTOG, M.G.L.; FESKENS, E.J.M.; HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. and KROMHOUT, D.(1993). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. **Lancet**, 342: 1007–1011.
- HERTOG, M.G.L (1996) Epidemiological evidence on potential health properties of flavonoids. **Proc. Nutr. Soc.**, 55: 385-397.
- HILLE, R. and SPRECHER, H.(1987). On the mechanism of action of xanthine oxidase. **J. Biol. Chem.**, 262: 10914–10917.

- HIRAGA, A. and TZUIKI, S. (1991) Rat liver protein-tyrosine phosphatase: purification and characterization of two isoforms. **Adv. Prot. Phosphatases**, 6: 251-264.
- HIRANO, T., GOTOH, M. and OKA, K. (1994) Natural flavonoids and lignans are potent cytostatic agents against human leukemic HL 60 cells. **Life Science**, 55: 1061-1069.
- HOLLANDER, P. V. (1971) Acid phosphatases, *in* **The Enzymes**, 2nd ed, Cap. IV, Edited by Boyer P.D., Academic Press, N.Y., pp. 449.
- HOLLMAN, P.C.H.; GAAG, M.V.D.; MENGELERS, M.J.B.; van TRIJP, J.M.P.; de VRIES, J.H.M. and KATAN, M.B., (1996) Absorption and disposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man. **Free Radical Biol. Med.**, 21: 703-707.
- HOLLMAM, P.C.H.; VAN TRIJP, J.M.P.; BUYSMAN, M.N.C.P.; VANDERGAAG, M.S.; MENGELERS, M.J.B.; VRIES, J.H.M. and KATAN, M.B. (1997) Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. **FEBS Lett.**, 418: 152-156.
- HOLLMAN, P.C.H. and KATAN, M.B. (1998) Bioavailability and health effects of dietary flavonols in man. **Arch. Toxicol.**, 20: 237-248.
- HUNTER, T. (1989) Protein-tyrosine phosphatase: the other side of the coin. **Cell**, 22:1013-1016.
- HUYER, G.; LIU, S.; KELLY, J.; MOFFAT, J.; PAYETTE, P.; KENNEDY, B.; TSAPRAILIS, G.; GRESSER, M. and RAMACHANDRAN, C. (1997) Mechanism of inhibition of protein-tyrosine phosphatases by vanadate and pervanadate. **J. Biol. Chem.**, 272: 843-851.
- JIA, Z. (1997) Protein phosphatases: structures 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. **Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.**, 22: 199-232.
- KEYSE, S. M. (1995) An emergent family of dual specificity MAP kinase phosphatases. **Biochim. Biophys. Acta**, 1265: 152-160.
- KIM, H.K.; CHEON, B.S.; KIM, Y.H.; KIM, S.Y. and KIM, H.P. (1999) Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure-activity relationships. **Biochem. Pharmacol.**, 58: 759-765.
- KLARLUND, J.K. (1985) Transformation of cells by an inhibitor of phosphatases acting on phosphotyrosine in proteins. **Cell**, 41: 707-717.
- KLARLUND, J.K.; LATINI, S. and FORCHLAMMER, J. (1988) Numerous proteins phosphorylated on tyrosine and enhanced tyrosine kinase activities in vanadate-treated NIH 3T3 fibroblasts. **Biochim. Biophys. Acta**, 971: 112-120.
- KORKINA, L.G. and AFANAS'EV, I.B. (1997) Antioxidant and chelating properties of flavonoids. **Adv. Pharmacol.**, 38: 151-163.
- KUO, S.M. (1996) Antiproliferative potency of structurally distinct dietary flavonoids on human colon cancer cells. **Cancer Lett**, 110: 41-48.
- LAU, K. H.; FARLEY, J. R. and BAYLINK, D. J. (1989) Phosphotyrosyl protein phosphatases. **Biochem. J.**, 257: 23-36.
- LAWRENCE, G. L. and VAN ETTEN, R. L. (1981) The low-molecular-weight acid phosphatase from bovine liver: isolation, amino acid composition, and chemical modifications studies. **Arch. Biochem. Biophys.**, 206: 122-131.
- LE MARCHAND, L.; MURPHY, S.P.; HANKIN, J.H.; WILKENS, L.R. and KOLONEL, L.N. (2000) Intake of flavonoids and lung cancer. **J. Nat. Cancer Inst.**, 92: 154-160.
- LENBURG, M. E. and O'SHEA, E. K. (1996) Signaling phosphate starvation. **Trends Biochem. Sci.**, 21: 383-387.

- LEPLEY, D.M.; LI, B.; BIRT, D.F. and PELLING, J.C. (1996) The chemopreventive flavonoid apigenin induces G2/M arrest in keratynocytes. **Carcinogenesis**, 17: 2367-2375.
- LEPLEY, D.M. and PELLING, J.C. (1997) Induction of P21/WAF 1 and G1 cell-cycle arrest by the chemopreventive agent apigenin. **Mol. Carcinog.**, 19: 74-82.
- LI, Y. and STROHL, W. R. (1996) Cloning, purification, and properties of a phosphotyrosine protein phosphatase from *Streptomyces coelicolor* A3(2). **J. Bacteriol.**, 178: 136-142.
- LIEBOW, C.; REILLY, C.; SERRANO, M. and SCHALLY, A. V. (1989) Somatostatin analogues inhibit growth of pancreatic cancer by stimulating tyrosine phosphatase. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 86: 2003-2007.
- LINEWEAVER, H. and BURK, D. (1934) The determination of enzyme dissociation constants. **J. Am. Chem. Soc.**, 56: 658-666.
- LOGAN, T. M.; ZHOU, M., M.; NETTESHEIM, D. G.; MEADOWS, R. P.; VAN ETTEN, R. L. and FESIK, S. W. (1994) Solution structure of a low molecular weight protein tyrosine phosphatase. **Biochemistry**, 33: 11087-11096.
- LOWRY, O. H. and LOPEZ, J. (1946) The determination of inorganic phosphate in the presence of labile phosphate esters. **J. Biol. Chem.**, 162: 421-424.
- MANAO, G.; PAZZAGLI, L.; CIRRI, P.; CASELLI, A.; CAMICI, G.; CAPPUGI, G.; SAEED, A. and RAMPONI, G. (1992) Rat liver low Mr phosphotyrosine protein phosphatase isoenzymes: purification and amino acid sequences. **J. Prot. Chem.**, 3: 333-345.
- METODIEWA, D.; JAISWAL, A.K.; CENAS, N.; DICKANCAITÉ, E. and AGUILAR, J.S. (1999) Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. **Free Radical Biol. & Med.**, 26: 107-116.

- MIN, B.-S.; NAKAMURA, N.; MIYASHIRO, H.; KIM, Y.-H. and HATTORI, M. (2000) Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and ribonuclease H activities by constituents of *Juglans mandshurica*. **Chem. Pharmac. Bulletin**, 48: 194-200.
- MODESTI, A.; CIRRI, P.; RAUGEI, G.; CARRARESI, L.; MAGHERINI, F.; MANAO, G.; CAMICI, G. and RAMPONI, G. (1995) Expression, purification and kinetic behaviour of fission yeast low Mr protein-tyrosine phosphatase. **FEBS Lett.**, 375: 235-238.
- MONDESERT, O.; MORENO, S. and RUSSEL, P. (1994) Low molecular weight protein-tyrosine phosphatases are highly conserved between fission yeast and man. **J. Biol. Chem.**, 269: 27996-27999.
- MURAKAMI, S.; MURAMATSU, M. and TOMISAWA, K. (1999) Inhibition of gastric H⁺, K⁺-ATPase by flavonoids: A structure-activity study. **J. Enz. Inhib.**, 14: 151-166.
- NIKOLOVSKA-COLESKA, Z.; SUTURKOVA, L.; DOREVSKI, K.; KRBAVCIC, A. and SOLMAJER, T. (1998) Quantitative structure-activity relationships of flavonoid inhibitors of p56(lck) protein tyrosine kinase: A classical/Quantum chemical approach. **Quant Structure-Act. Relationships**, 17: 7-13.
- ONO, K. and NAKANE, H. (1990). Mechanisms of inhibition of various cellular DNA and RNA polymerases by several flavonoids. **J. Biochem.**, 108: 609-613.
- ONO, K.; NAKANE, H.; FUKUSHIMA, M.; CHERMANN, J. C. and BARRÉ-SINOUSSE, F. (1990). Differential inhibitory effects of various flavonoids on the activities of reverse transcriptase and cellular DNA and RNA polymerases. **Eur. J. Biochem.**, 190: 469-476.
- OSTANIN, K.; POKALSKY, C.; WANG, S. and VAN ETTEN, R. L. (1995) Cloning and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding the low molecular weight protein-tyrosine phosphatase. **J. Biol. Chem.**, 270: 18491-18499.

- PACE, C. N. (1990) Measuring and increasing protein stability. **Trends Biotechnol.**, 8 (4): 93-98.
- PAGANGA, G. and RICE-EVANS, C.A. (1997) The identification of flavonoids as glycosides in human plasm. **FEBS Lett.**, 401: 78-82.
- PAYRASTRE, L. G.; MANENTI, S.; GRATACAP, M. P.; TULLIEZ, J.; CHAP, H. and PAYRASTRE, B. (1999) Flavonoids and the inhibition of PKC and PI 3-kinase. **Gen. Pharmac.**, 32: 279-286.
- RAMPONI, G.; MANAO, G.; CAMICI, G.; CAPPUGI, G.; RUGGIERO, M. and BOTTARO, B. P. (1989) The 18 kDa cytosolic acid phosphatase from bovine liver has phosphotyrosine activity on the autophosphorylated epidermal growth factor receptor. **FEBS Lett.**, 250: 469-473.
- RAMPONI, G.; RUGIERO, M.; RAUGEI, G.; BERTI, A.; MODESTI, A.; DEGL'INNOCENTI, D.; MAGNELLI, L.; PAZZAGLI C.; CHIARUGI, V. P. and CAMICI, G. (1992) Overexpression of a synthetic phosphotyrosine protein phosphatase gene inhibits normal and transformed cell growth. **Int. J. Canc.**, 51: 652-656.
- RAMPONI, G. (1994) The low Mr cytosolic phosphotyrosine protein phosphatase. **Adv. Prot. Phosphatases**, 8: 1-25.
- RAMPONI, G. and STEFANI, M. (1997). Structural, catalytic, and functional properties of low Mr phosphotyrosine protein phosphatases. Evidence of a long evolutionary history. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, 29: 279-292.
- RICE-EVANS, C.; MILLER, N.J. and PAGANGA, G. (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biol. Med.**, 20: 933-956.
- RIGACCI, S.; MARZOCCHINI, R.; BUCCIANTINI, M. and BERTI, A. (1998). Different *in vitro* and *in vivo* activity of low Mr phosphotyrosine protein phosphatase on epidermal growth factor receptor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 29: 577-581.

- ROKNABADI, S. .M.; BOSE, S. K. And TANEJA, V. (1999) A histidini thiol 100 kDa, tetrameric acid phosphatase from lentil, *Lens esculenta*, seeds with the characteristics of protein tyrosine phosphatases. **Biochim. Biophys. Acta**, 1433: 272 – 280.
- RUFF, S. J.; CHEN, K. and COHEN, S. (1997) Peroxovanadate induces tyrosine phosphorylation of multiple signaling proteins in mouse liver and kidney. **J. Biol. Chem.**, 272: 1263-1267.
- RUGIERO, M.; PAZZAGLI, C.; RIGACCI, S.; MAGNELLI, L.; RAUGEI, G.; BERTI, A.; CHIARUGI, V. P.; PIERCE, J. H.; CAMICI, G. and RAMPONI, G. (1993) Negative growth control by a novel low Mr phosphotyrosine protein phosphatase in normal and transformed cells. **FEBS Lett.**, 326: 294-298.
- SCAMBIA, G.; DE VINCEZO, R.; RANELLETI, F. O.; PANICI, B.; FERRANDINA, G.; D'AGOSTINO, G.; FATTOROSI, A.; BOMBARDELLI, E. and MANCUSO, S. (1996) Antiproliferative effect of silybin on gynaecological malignancies: synergism with cisplatin and doxorubicin. **Eur. J. Cancer**, 32A: 877-882.
- SHEKELS, L. L.; SMITH, A. J.; VAN ETEN, R. L. and BERNLOHR, D. A. (1992) Identification of the adipocyte acid phosphatase as a PAO-sensitive tyrosyl phosphatase. **Protein Sci.**, 1: 710-721.
- SHIMIZU, I. (2000) Sho-saiko-to: Japanese herbal medicine for protection against hepatic fibrosis and carcinoma. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, 15: 84-90.
- SHIMIZU, K.; KONDO, R. and SAKAI, K. (2000) Inhibition of tyrosinase by flavonoids stilbenes and related 4-substituted resorcinols: Structure-activity investigations. **Planta Medica**, 66: 11-15.
- SHINOZUKA, K.; KIKUCHI, Y.; NISHINO, C., MORI, A. and TAWATA, S. (1988) Inhibitory effect of Flavonoids on DNA-dependent DNA and RNA polymerases. **Experientia**, 44: 882–885.

- SOLIMANI, R. (1997) The flavonols quercetin, rutin and morin in DNA solution: UV-vis dichroic (and mid-infrared) analysis explain the possible association between the biopolymer and a nucleophilic vegetable-dye. **Biochim. Biophys. Acta**, 1336: 281-294.
- SRIVASTAVA, A.K.(1985) Inhibition of phosphorylase kinase, and tyrosine protein kinase activities by quercetin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 131: 1-5.
- STEFANI, M.; CASELLI, A.; BUCCIANTINI, M.; PAZZAGLI, L.; DOLFI, F.; CAMICI, G.; MANAO, G. and RAMPONI, G. (1993) Dephosphorylation of tyrosine phosphotylated synthetic peptides by rat liver phosphotyrosine protein phosphatase isoenzymes. **FEBS Lett.**, 326: 131-134.
- SU, X. D.; TADDEI, N.; STEFANI, M.; RAMPONI, G. and NORDLUND, P. (1994) The crystal structure of a low-molecular-weight phosphotyrosine protein phosphatase. **Nature**, 370: 575-578.
- SUMNER, J.B. (1944) A method for the colorimetric determination of phosphorus. **Science**, 100: 413-414.
- TABERNERO, L.; EVANS, B.N.; TISHMACK, P.A.; VAN ETTEN, R.L. and STAUFFACHER, C.V. (1999) The structure of the bovine protein tyrosine phosphatase dimer reveals a potential self-regulation mechanism. **Biochemistry**, 38: 11651-11658.
- TAGA, E.M. and VAN ETTEN, R.L. (1982) Human liver acid phosphatase: purification and properties of a low molecular weight isoenzymes. **Arch. Biochem. Biophys.**, 214: 505-515.
- TAKAKURA, K.; BECKMAN, J. S.; MacMILLAN-CROW, L. A. And CROW, J. P. (1999) Rapid and irreversible inactivation of protein tyrosine phosphatases PTP1B, CD45, and LAR by peroxynitrite. **Arch. Biochem. Biophys.**, 369: 197-207.
- TANIZAKI, M.M.; BITTENCOURT, H.M.S. and CHAIMOVICH, H. (1977) Activation of low molecular weight acid phosphatase from bovine brain by purines and glycerol. **Biochim. Biophys. Acta**, 485: 116-123.

- TONKS, N. K. and NEEL, B. G. (1996) From form to function: signaling by protein tyrosine phosphatases. *Cell*, 87: 365-368.
- UDDIN, S. and CHOUDHRY, A.(1995) Quercetin, a bioflavonoid, inhibits the DNA synthesis of human leukemia Cells. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 36: 545-550.
- WAHEED, A.; LAIDLER, P. M.; WO, Y. Y. P. and VAN ETTEN, R. L. (1988) Purification and physicochemical characterization of a human placental acid phosphatase activity. *Biochemistry*, 27: 4265-4273.
- WANG, H. K.; XIA, Y.; YANG, Z. Y.; NATSCHKE, S. L. and LEE, K. H. (1998) Recent advances in the discovery and development of flavonoids and their analogues as antitumor and anti-HIV agents. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 439: 191-225.
- WANG, I. K.; LIN-SHIAU, S. Y. and LIN, J. K. (1999) Introduction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells. *Eur. J.Cancer*, 35: 1517-1524.
- WANG, Q.; SCHEIGETZ, J.; GILBERT, M.; SNIDER, J. and RAMACHANDRAN, C.(1999) Fluorecein monophosphates as fluorogenic for protein tyrosine phosphatases. *Biochim. Biophys. Acta*, 1431: 14-23.
- WANG, S.; TABERNERO, L.; ZHANG, M.; HARMS, E.; VAN ETTEN, R.L. and STAUFFACHER, C.V. (2000a) Crystal structures of a low-molecular weight protein tyrosine phosphate from *Saccharomyces cerevisiae* and its complex with the substrate p-nitrophenylphosphate. *Biochemistry*, 39: 1903-1914.
- WANG, S.; STAUFFACHER, C.V. and VAN ETTEN, R.L. (2000b) Structural and mechanistic basis for the activation of a low molecular weight protein tyrosine phosphate by adenine. *Biochemistry*, 39: 1234-1242.

- WO, Y. Y. P.; McCORMACK, A. L.; SHABANOWITZ, J.; HUNT, D. F.; DAVIS, J. P.; MITCHELL, G. L. and VAN ETTEN, R. L. (1992a) Sequencing, cloning and expression of human red cell-type acid phosphatase, a cytoplasmic phosphotyrosyl protein phosphatase. **J. Biol. Chem.**, 267: 10856-10865.
- YARDEN, Y. and ULLRICH, A. (1988). Growth factor receptor tyrosine kinase. **Ann. Rev. Biochem.**, 57: 443-478.
- ZHANG, Z. and VAN ETTEN, R. L. (1990) Purification and characterization of a low-molecular-weight acid phosphatase - a phosphotyrosyl protein phosphatase from bovine heart. **Arch. Biochem. Biophys.**, 282: 39-49.
- ZHANG, Z. Y. and VAN ETTEN, R. L. (1991b) Pre-steady-state and steady-state kinetic analysis of the low molecular weight phosphotyrosyl protein phosphatase from bovine heart. **J. Biol. Chem.**, 266: 1516-1525.
- ZHANG, M.; VAN ETTEN, R. L. and STAUFFACHER, C. V. (1994) Crystal structure of bovine heart phosphotyrosyl phosphatase at 2.2 Å resolution. **Biochemistry**, 33: 11097-11105.
- ZHANG, Z. Y.; ZHOU, G.; DENU, J. M.; WU, L.; TANG, X.; MONDESERT, O.; RUSSEL, P.; BUTCH, E. and GUAN, K. L. (1995) Purification and characterization of the low molecular weight protein tyrosine phosphatase, Stp1, from the fission yeast *Shizosaccharomyces pombe*. **Biochemistry**, 34: 10560-10568.
- ZHANG, M.; ZHOU, M.; VAN ETTEN, R. L. and STAUFFACHER, C. V. (1997) Crystal structure of bovine low molecular weight phosphotyrosyl phosphatase complexed with the transition state analog vanadate. **Biochemistry**, 36: 15-23.
- ZHOU, M. and VAN ETTEN, R. L. (1999) Structural basis of the tight binding of pyridoxal 5'-phosphate to a low molecular weight protein tyrosine phosphatase. **Biochemistry**, 38: 2636-2646.

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