

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Biologia



Ana Carolina Santos de Souza

"MECANISMO DA AÇÃO ANTINEOPLÁSICA DE SUBSTÂNCIAS
BIOATIVAS E ALVOS MOLECULARES ESTRATÉGICOS PARA A INDUÇÃO
DE MORTE DE CÉLULAS TUMORAIS".

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
ANA CAROLINA SANTOS DE SOUZA
Carmen
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carmen Veríssima Ferreira

Co-orientador: Prof. Dr. Hiroshi Aoyama

Campinas

2007

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

So89m

Souza, Ana Carolina Santos de
Mecanismo da ação antineoplásica de substâncias bioativas e alvos moleculares estratégicos para a indução de morte de células tumorais / Ana Carolina Santos de Souza.
– Campinas, SP: [s.n.], 2007.

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

1. Transdução de sinal. 2. Células cancerosas. 3. Compostos naturais. 4. Alvos moleculares. 5. Apoptose. I. Ferreira, Carmen Veríssima. II. Aoyama, Hiroshi. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Título em inglês: Antineoplastic action mechanism of bioactive compounds and strategical molecular targets for inducing tumoral cells death.

Palavras-chave em inglês: Signal transduction; Cancer cells; Natural compounds; Molecular targets; Apoptosis.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Doutora em Biologia Molecular e Funcional.

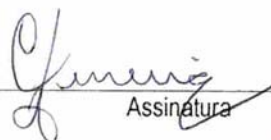
Banca examinadora: Carmen Veríssima Ferreira, Maikel Petrus Peppelenbosch, José Andrés Yunes, Alexandre Donizeti Martins Cavagis, José Barreto Campello Carvalheira.

Data da defesa: 26/02/2007.

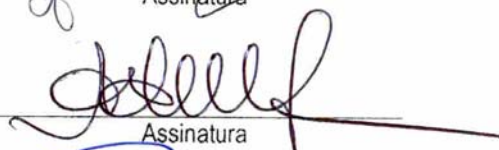
Programa de Pós-Graduação: Biologia Molecular e Funcional.

BANCA EXAMINADORA


Profa. Dra. Carmen Veríssima Ferreira (Orientadora)


Assinatura

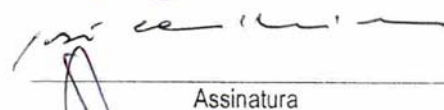
Prof. Dr. Alexandre Donizeti Martins Cavagis


Assinatura

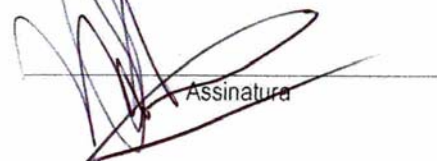
Prof. Dr. José Andrés Yunes


Assinatura

Prof. Dr. José Barreto Campello Carvalheira


Assinatura

Prof. Dr. Maikel P. Peppelenbosch


Assinatura

Profa. Dra. Giselle Zenker Justo

Assinatura

Profa. Dra. Eneida de Paula

Assinatura

Profa. Dra. Sílvia Mika Shishido

Assinatura

AGRADECIMENTOS

São muitas as pessoas às quais devo agradecimento eterno por tudo que até hoje consegui na minha vida. Posso dizer que Deus sempre colocou as pessoas certas no meu caminho e que com cada uma delas aprendi o valor da bondade, da união, da amizade. Gostaria de agradecer a todas essas pessoas maravilhosas, em especial:

À minha mãe Sebastiana que, apesar de todos os problemas e dificuldades, sempre priorizou os meus estudos fazendo o possível e o impossível para que um dia sua filha se tornasse uma “doutora”. Mãe nós conseguimos!

Ao colégio Mater Dei, onde tive a oportunidade de receber educação de qualidade, tornando possível o sonho de entrar em uma boa universidade. Em especial aos meus professores, que acreditaram em mim e sempre me ajudaram de todas as maneiras até o momento em que finalmente atingi meu objetivo.

À Unicamp, que não somente me deu a oportunidade de me tornar uma bióloga, mas também, moradia e trabalho, condições necessárias para que isso acontecesse.

Aos meus professores de graduação, em especial ao professores Eduardo Galembeck, Ione Salgado, Hiroshi Aoyama e ao Paulino que me apresentaram ao maravilhoso mundo da Bioquímica, paixão à primeira vista!

Ao professor Hiroshi Aoyama, um grande exemplo de ser humano e pesquisador. Sempre presente, sempre disposto a ajudar; uma pessoa com quem a gente pode contar sempre.

À professora Carmen Veríssima Ferreira, a indescritível! E como descrever alguém tão especial, capaz de fazer da pesquisa sua vida e ao mesmo tempo não deixar de ser tão humana? Exemplo de orientadora e professora, sempre presente, sempre paciente, sempre ensinando. Quantas vezes fiz as coisas mais “inacreditáveis” na bancada ou no fluxo, coisas que me faziam ir embora e não querer voltar. Mas para a professora Carmen, aquelas eram coisas que aconteciam, não tinha problema. E, por isso, continuei até o

fim sempre contando com sua compreensão e apoio. Professora Carmen, a senhora sempre será o meu maior exemplo!

À professora Giselle Zenker por sua valiosa participação na qualificação dessa tese e por toda ajuda e apoio durante a realização do trabalho. Obrigada pelas conversas, discussões, artigos; tudo foi muito valioso para mim.

Ao Alexandre Cavagis, uma pessoa brilhante cujas perguntas mais que inteligentes mudaram para sempre minha maneira de ler os artigos. Não me lembro quando e nem quem uma vez me disse que o verdadeiro pesquisador muitas vezes não é aquele que sabe a resposta certa de tudo, mas sim aquele que sabe fazer a pergunta correta.

Ao professor Maikel Peppelenbosch, pelo suporte à execução deste trabalho e pelas valiosas críticas e sugestões na montagem dos artigos finais.

À professora Eneida de Paula, por seu apoio à minha formação docente, permitindo minha participação como monitora em suas aulas de Bioquímica e, também, por suas sugestões e contribuições à tese de doutorado durante o exame de qualificação.

À professora Fernanda Gadella, pela grande ajuda nos experimentos e na discussão dos resultados.

Aos meus amigos desde os tempos de graduação, Patrícia, Júlia, Ricardo e Antônio Saraiva. Que a gente sempre possa continuar sendo amigos e que o tempo ou a distância não apaguem essa amizade. Vocês sempre serão muito importantes para mim!

Aos colegas do laboratório do professor Hiroshi, Erika, Marilena, Camila, Luciana, Daniela, Viviane, Willian e Márcio pelo companheirismo de sempre.

À Denise, Cláudia e Miça pela carinhosa recepção no laboratório, pelas conversas, risadas, conselhos, por tudo! Que a gente ainda possa comemorar muitas datas juntas, que o laboratório tenha sempre esse espírito de união.

À Karla, minha primeira colega de laboratório, com quem aprendi muito e por quem tenho grande estima e admiração. Karla, obrigada por todos os momentos juntas, por todas as conversas, por todo seu companheirismo. Quando lembro aquele dia, você na câmara escura cheia de radiação revelando os meus blottings... fico até bege!

Ao Willian e ao Antônio, por todas as brincadeiras e risadas que fazem tanta diferença no nosso dia a dia.

À Paula, Roberta, Guga e Marília pelo convívio de todo dia, pelas conversas, risadas e também pelos momentos de estresse que passamos juntas.

À Daisy e ao Rodrigo, essas duas pessoas tão animadas que se tornaram, em pouco tempo de convivência, dois grandes amigos. Que a gente ainda possa matar muitas células juntos!

À Vanessa, minha primeira “tentativa” de acompanhar um aluno de iniciação científica, coitada! Vanessa, a você só tenho uma coisa a dizer: obrigada por me agüentar!

À Fapesp, que possibilitou a realização do projeto de doutorado e minha permanência no curso de pós-graduação através do apoio financeiro na forma de Bolsa e reserva técnica.

Às HL60, que (incrivelmente!) cresceram tão bem durante o meu projeto permitindo que pudesse concluí-lo. Que vocês deixem esse momento de revolta e voltem a crescer corretamente para que os meus colegas possam trabalhar!

Por fim, gostaria de agradecer a todos de que não me lembrei de agradecer acima. São tantas as pessoas que merecem meu agradecimento, mas os neurônios estão tão escassos...

Dedicatória:

Ao meu esposo Fábio por seu amor, carinho e companheirismo.

RESUMO

Produtos naturais têm originado muitos dos compostos biologicamente ativos usados clinicamente, destacando-se como importantes fontes de novos agentes terapêuticos utilizados no tratamento das mais variadas patologias incluindo câncer, HIV/AIDS, Alzheimer e malária. O desenvolvimento de novos fármacos a partir de produtos naturais, especialmente os derivados de plantas, tem desempenhado importante papel na prevenção e tratamento do câncer sendo que, de todos os antitumorais disponíveis entre 1940 e 2002, aproximadamente 40% eram caracterizados como produtos naturais ou derivados destes, com outros 8% sendo considerados agentes mimetizantes de produtos naturais.

No presente trabalho, fisetin (flavonóide de origem vegetal) e a vitamina riboflavina foram avaliados como potenciais agentes antitumorais. Para este propósito, as linhagens de células leucêmicas HL60 e de câncer prostático PC3 foram tratadas com riboflavina irradiada ou fisetin por 24 horas e seus efeitos sobre vias de transdução de sinais responsáveis pela sobrevivência e morte celular foram avaliados. Os resultados obtidos demonstram que riboflavina e fisetin apresentam expressiva atividade antiproliferativa, induzindo a morte das células tumorais em concentrações na ordem de μM . A investigação do mecanismo molecular da ação citotóxica da riboflavina demonstrou que o tratamento de HL60 e PC3 com a vitamina irradiada induz morte celular através da via extrínseca de indução de apoptose, mediada pela ativação do sistema Fas/FasL e aumento na síntese de ceramida. Como consequência da ativação do receptor de morte Fas, uma seqüência ordenada de eventos leva à modulação de cascatas de sinalização através da alteração da atividade/expressão de moléculas-chave associadas a proliferação, sobrevivência, migração e morte celular.

Assim como a riboflavina, fisetin também mostra-se eficiente indutor de morte por apoptose em

células HL60, modulando cascatas de proteínas quinases e fosfatases e levando a alterações na expressão de NFκB, atividade de MAPKs, níveis de fosfoproteínas e, também, à inibição de enzimas envolvidas na manutenção do estado redox.

Os resultados obtidos neste trabalho contribuem para um maior conhecimento sobre a atividade/função biológica de algumas moléculas envolvidas na sobrevivência e morte de células leucêmicas e prostáticas, sugerindo potenciais alvos para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes no combate a doenças neoplásicas. Além disso, os resultados obtidos demonstram que a riboflavina irradiada e fisetin são potentes indutores de apoptose e promissores agentes antitumorais, capazes de modular importantes vias de sinalização intracelular através de ação específica sobre moléculas-chaves relacionadas a proliferação, resistência e invasividade de células tumorais.

ABSTRACT

Natural products have been providing numerous clinically used medicines and remain as essential components in the search for new drugs against various pharmacological targets including cancer, HIV/AIDS, Alzheimer's, malaria, and pain. Drug discovery from natural products, especially from medicinal plants, has played an important role in the chemoprevention and treatment of cancer and, of all available anticancer drugs between 1940 and 2002, about 40% were natural products *per se* or natural product-derived, with another 8% considered natural product mimics.

In the present work, the plant flavonoid fisetin and the vitamin riboflavin are evaluated as potential anticancer agents. For this purpose, the leukemic cell line HL60 and the human prostate cancer cell PC3 were treated for 24h with irradiated riboflavin or fisetin and their effects on signal transduction pathways related to the cell survival and proliferation were evaluated. The results obtained demonstrated that riboflavin and fisetin have strong anti-proliferative activity, inducing tumoral cell death at μM concentrations.

The investigation of the molecular death mechanism triggered by riboflavin demonstrated that the treatment of HL60 and PC3 with the irradiated vitamin induces apoptotic cell death through induction of the extrinsic pathway mediated by the activation of Fas/FasL system via a ceramide-dependent pathway. As a consequence of the activation of the death receptor Fas, an orderly sequence of signaling events leads to the modulation of signaling cascades through alterations in the activity/expression of key targets molecules related to proliferation, survival, migration and cell death. As well as riboflavin, fisetin also showed strong apoptotic activity, inducing HL60 cell death through modulation of protein kinase and phosphatase signaling cascades, leading to alterations in the NF κ B expression, MAPKs activities, phosphoprotein levels and also inhibition of enzymes involved in the redox status maintenance.

The results obtained in this work bring out information about the biologic activity of some molecules involved in the survival and death of leukemic and prostate cancer cells, indicating among them potential targets for the development of rational therapeutic strategies. Moreover, the data obtained demonstrated that irradiated riboflavin and fisetin have potential proapoptotic activity, pointing out these bioactive compounds as promising antitumoral agents, since they can affect important molecular targets related to proliferation, resistance and invasibility of cancer cells.

ÍNDICE

RESUMO.....	viii
ABSTRACT	x
ABREVIATURAS	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1. Compostos bioativos.....	18
1.1.1. Riboflavina e suas funções biológicas.....	19
1.1.2. Fisetin.....	23
1.2. Células usadas no trabalho.....	27
1.2.1. Células da leucemia mielocítica humana (HL60)	27
1.2.2. Células do câncer prostático humano andrógeno-independente (PC3).....	28
1.3. Apoptose.....	29
1.3.1. Vias de sinalização apoptótica	31
1.3.2. Família de proteínas Bcl-2.....	35
1.3.3. Mecanismos de morte celular.....	37
1.4. Proteínas fosfatases	40
1.4.1. Proteínas tirosina fosfatases (PTPs).....	41
1.4.2. Proteínas serina/treonina fosfatases	43
1.5. Proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs).....	47
2. OBJETIVOS	51
3. CAPÍTULO 1 - Riboflavina: uma vitamina multifuncional.....	55
4. CAPÍTULO 2 - A promising action of riboflavin as a mediator of leukaemia cell death	61
5. CAPÍTULO 3 - Natural compounds as a source of protein tyrosine phosphatase inhibitors: Application to the rational design of small – molecule derivatives.....	73
6. CAPÍTULO 4 - Phosphoprotein levels, MAPK activities and NFκB expression are affected by fisetin	89
7. CAPÍTULO 5 – Mechanism of riboflavin-induced prostate cancer cell death and its potential as a metastasis inhibitor	100
8. DISCUSSÃO.....	112
9. CONCLUSÃO.....	122
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	124
11. ANEXOS.....	138

ABREVIATURAS

7-AAD: 7-amino-actinomicina D

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

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

Bad (“Bcl-2 antagonist of cell death”): antagonista de Bcl-2 associado a morte celular

Bak (“Bcl-2 antagonist killer 1”): antagonista de Bcl-2 associado a morte celular

Bax (“Bcl-2 associated x protein”): proteína x associada a Bcl-2

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

BH: domínio de homologia a Bcl-2

Bid (“BH3 interacting domain death agonist”): agonista de domínio de morte associado a BH3

CAD / DFF (“caspase-activated DNase / DNA fragmentation factor”): DNase ativada por caspase

CARD (“caspase activator and recruitment domain”): domínio de recrutamento e ativação de caspases

CCCP: 3-clorofenilhidrazona

CD45: tirosina fosfatase hematopoiética célula-específica

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

c-Myc: proteína oncogênica

CREB (“c-AMP response element-binding”): proteína ligante ao elemento de resposta a AMP cíclico

CuZnSOD: isoforma de superóxido dismutase dependente de cobre e zinco

DAXX (“Fas death domain associated protein”): proteína associada a domínio de morte de Fas

DD (“death domain”): domínio de morte

DED (“death effector domain”): domínio efetor de morte

DISC (“death-inducing signaling complex”): complexo intracelular de indução de morte

DNA-PK (“DNA dependent protein kinase”): proteína quinase dependente de DNA

E2F: fator de transcrição E2F

ERKs (“extracellular signal-regulated kinases”): quinases reguladas por sinal extracelular

FAD: flavina adenina dinucleotídeo

FADD (“Fas-associated death domain protein”): proteína com domínio de morte associada a Fas

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

FasL (“Fas-ligand”): proteína ligante de receptor Fas

FMN: flavina mononucleotídeo

GPX: glutationa peroxidase

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

ICAD (“inhibitor of CAD”): inibidor de CAD

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

IRS-1 (“insulin receptor substrate-1”): substrato do receptor de insulina 1

I κ B: proteína inibidora de NF κ B

JAK (“Janus kinase”): quinase Janus

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

MAPKAPKs: proteínas quinases ativadas por MAPKs

MAPKK: MAPK quinase

MAPKKK: MAPKK quinase

MAPKPs / MKPs: fosfatases de MAPKs

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

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

MEK (MAPK ERK kinase): proteína quinase de ERK

MMP-2 (“matrix metalloprotease 2”): metaloproteinase de matriz tipo 2

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

MNKs (“MAPK-interacting kinases”): proteínas de interação a MAPKs

MnSOD: isoforma de superóxido dismutase dependente de manganês

MSKs (“mitogen and stress activated kinases”): quinases ativadas por estresse e mitógenos

NF κ B: fator nuclear kappa B

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

p21: proteína inibidora de quinases dependentes de ciclinas

p53: proteína supressora de tumor p53

PARP (“poli ADP-ribose polymerase”): poli (ADP-ribose) polimerase

PCNA (“proliferating cell nuclear antigen”): antígeno nuclear de proliferação celular

PI3K (“phosphatidylinositol 3-kinase”): fosfatidilinositol-3 quinase

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

PKB / Akt (“protein kinase B”): proteína quinase B

PKC (“protein kinase C”): proteína quinase C

PP2A: proteína fosfatase 2A

PPMs: proteínas fosfatases dependentes de magnésio

PPPs: fosfoproteínas fosfatases

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

PTPs: proteínas tirosina fosfatases

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

RAIDD (“RIP associated protein with a death domain”): domínio de morte associado a RIP

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

Rb: proteína retinoblastoma

RECK (“reversion inducing cysteine rich protein with kazal motifs”): glicoproteína inibidora da atividade de metaloproteinases

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

RSKs (“p90 ribosomal S6 kinase”): quinases S6 ribossomais

SHP1 (“SH2 containing protein tyrosine phosphatase 1”): proteína tirosina fosfatase com domínio SH2

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

SMase: esfingomielinase

SOD: superóxido dismutase

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

tBid: forma truncada de Bid

TNF (“tumor necrosis factor”): fator de necrose tumoral

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

TRADD (“TNF receptor associated death domain”): domínio de morte associado a TNFR

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

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

Este trabalho foi viabilizado com recursos das seguintes instituições:



Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP



Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FAPESP



Academisch Medisch Centrum - AMC
University of Amsterdam - The Netherlands

1. INTRODUÇÃO

1.1. Compostos bioativos

A procura por substâncias medicinais em compostos naturais é uma prática antiga na história da humanidade, iniciada há milhares de anos quando o homem aprendeu a utilizar as plantas, inicialmente na forma de tinturas, chás, pós e emplastos, para cura e alívio de suas enfermidades. Em nossa história mais recente, o uso de compostos naturais como medicamento evoluiu da administração de simples extratos para o isolamento e caracterização de compostos farmacologicamente ativos a partir de suas fontes de origem (Balunas and Kinghorn, 2005).

Compostos biologicamente ativos, em particular os derivados de plantas medicinais, destacam-se como potenciais fármacos ou candidatos a novas drogas estruturalmente e funcionalmente diversas, além de constituírem modelos moleculares de referência para síntese de novos compostos medicinais (Koehn and Carter, 2005). De fato, com o seqüenciamento do genoma humano e a identificação de alvos moleculares associados à gênese de importantes doenças como câncer, AIDS e Alzheimer's, muitos compostos biologicamente ativos de origem natural têm demonstrado atuar de maneira seletiva e promissora sobre determinadas moléculas alvo ou, adicionalmente, em outras novas moléculas candidatas a potenciais alvos (Lee *et al.*, 2002, Blaskovich *et al.*, 2003, Kramer and Cohen, 2004).

Compostos bioativos de origem vegetal, originados do metabolismo secundário em plantas ou derivados destes, têm se destacado na prevenção e tratamento do câncer. A importância de compostos naturais no tratamento do câncer pode ser observada pela porcentagem relativa dessa classe de drogas em relação aos demais tipos existentes. Dados da literatura revelam que de todas as drogas antitumorais disponíveis entre 1940 e 2002, aproximadamente 40% eram originadas de produtos naturais, enquanto que outros 8% eram moléculas derivadas de compostos naturais (Newman *et al.*, 2003; Butler, 2004). Atualmente, quatro principais classes de compostos bioativos originados de plantas, vinca alcalóides, epipodofilotoxinas, taxanos e camptotecinas têm se prestado a uso clínico,

cada uma das quais desempenhando suas funções antitumorais através de exclusivos mecanismos de ação (Balunas and Kinghorn, 2005).

1.1.1. Riboflavina e suas funções biológicas

A riboflavina (7,8-dimetil-10-ribitil-isoaloxazina) é uma vitamina hidrossolúvel pertencente ao complexo vitamínico B2 (Figura 1).

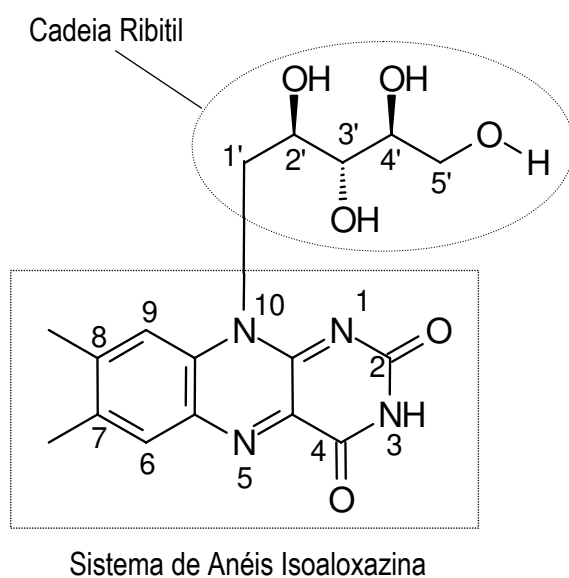


Figura 1. Estrutura da riboflavina. Em destaque, a cadeia ribitil e o sistema de anéis isoaloxazina que apresenta o sistema π conjugado.

A riboflavina é encontrada na maioria dos alimentos como leite, carnes, peixes e, principalmente, em vegetais verde-escuro (Powers, 2003). É de fundamental importância em organismos aeróbios, sendo precursora de importantes coenzimas participantes da cadeia transportadora de elétrons como a flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN). Adicionalmente, origina grande número de flavinas que se encontram ligadas a diversas

enzimas, todas as quais catalisando importantes reações como as relacionadas ao reparo do DNA e ao processo fotossintético (Edwards *et al.*, 1999b; Powers, 2003). O metabolismo de lipídios requer derivados da riboflavina, assim como a degradação de drogas e outros compostos químicos exógenos via sistema de hidroxilação microsomal. Cofatores de riboflavina são requeridos para o metabolismo normal do ácido fólico, piridoxina e niacina além de serem utilizados por enzimas de eritrócitos como a glutatona redutase, importante enzima pertencente ao sistema de proteção contra as espécies reativas de oxigênio (Rivlin *et al.*, 1983).

Por fim, estudos recentes têm demonstrado a ação da riboflavina na transdução de sinais responsáveis pela indução de apoptose e na regulação do relógio biológico por mecanismos ainda não completamente esclarecidos (Massey, 2000; Souza *et al.*, 2006; Powers, 2003).

Riboflavina: Um fotossensibilizador biológico eficiente

Além das já mencionadas atuações da riboflavina no metabolismo aeróbico, no organismo a riboflavina ainda possui importante papel biológico como sensibilizador fotoquímico, o que está associado a sua sensibilidade à radiação UV e visível. Ao absorver luz, a riboflavina alcança o estado de triplete ativado que pode tanto interagir com o oxigênio molecular gerando oxigênio singlete (mecanismo tipo II) como agir diretamente com um substrato (mecanismo tipo I), levando à sua fotooxidação, geração de radicais intermediários e espécies reativas de oxigênio, tais como ânion superóxido, radical hidroxil e peróxido de hidrogênio (La Rochette *et al.*, 2000; Edwards and Silva, 2001). Essa capacidade pode ser útil ao organismo, como no caso de enzimas que requerem luz visível para o desempenho de suas atividades catalíticas, tais como enzimas participantes do processo de fotossíntese e enzimas de reparo do DNA, cujos grupos prostéticos agem como substratos do triplete excitado de riboflavina.

A capacidade fotossensibilizadora da riboflavina em sistemas biológicos está relacionada ao alto potencial redox de sua forma triplete ativada. Embora o potencial redox da riboflavina seja $-0,3V$ em pH 7,0 (Meisel and Neta, 1975), sua irradiação e ativação ao estado triplete eleva o potencial redox a $1,7V$ que é bem maior que o potencial redox de importantes biomoléculas como aminoácidos, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, que desta forma, podem sofrer fotodegradação em presença de riboflavina (Joshi, 1985; Suzuki *et al.*, 1982). Desta maneira, a riboflavina irradiada reage com os aminoácidos triptofano, tirosina e, em menor extensão, com fenilalanina levando à fotooxidação dessas moléculas, acompanhada pela formação de espécies reativas de oxigênio, fotoadutos e fotoprodutos, os quais são tóxicos para células tumorais (de Souza *et al.*, 2006; Silva, 1992).

Vários estudos mostram que a irradiação de células tumorais com luz visível em presença de riboflavina é capaz de induzir a morte celular. Quando células F9 de teratocarcinoma e NSO/2 murinas são irradiadas em meio de cultura enriquecido com triptofano e riboflavina, alterações morfológicas similares às de células apoptóticas são observadas. O efeito citotóxico tem sido associado à geração de espécies reativas de oxigênio e a formação de outros produtos tóxicos originados de reações envolvendo o radical ânion de riboflavina e radical cátion indol do triptofano. Tais fotoprodutos constituem basicamente formas agregadas de riboflavina, produtos indólicos associados a flavinas, produtos indólicos com peso molecular maior que o do triptofano, formilcinurenina e outros produtos da fotodecomposição do triptofano (Silva *et al.*, 1995).

Além disso, os efeitos da riboflavina irradiada em presença de triptofano também são observados em culturas de células não irradiadas as quais não sofrem os efeitos deletérios das espécies reativas de oxigênio formadas durante a irradiação do meio. Nessas circunstâncias, tais efeitos são atribuídos aos demais fotoprodutos gerados, cuja citotoxicidade é ainda mais evidente em experimentos realizados em atmosfera anaeróbia onde predomina o mecanismo de reação tipo I (Edwards *et al.*, 1994; Edwards *et al.*, 1999a). Fotoprodutos derivados de ácido 3-indol acético (I_3A)

irradiado em presença de riboflavina causam danos severos em cultura de células humanas como HL60 e células tumorais murinas NOS/2 (Edwards *et al.*, 1999b). Tais efeitos foram mais acentuados do que os anteriormente descritos para os fotoprodutos do triptofano, além de aumentarem de acordo com a elevação da concentração dos fotoprodutos (Edwards *et al.*, 1999a). Com base em estudos de microscopia eletrônica e análises de citometria de fluxo, demonstrou-se que tais fotoprodutos induzem morte celular por mecanismo apoptótico. Postula-se que o mecanismo de ativação apoptótica esteja relacionado à atuação dos fotoprodutos I₃A-RF como ligantes sinalizadores de morte agindo na superfície celular. Tal afirmação baseia-se no fato de que uma quantidade insignificante de riboflavina adicionada ao meio é incorporada pela célula, comportamento que também pode ser atribuído aos fotoprodutos (Edwards *et al.*, 1999a).

É interessante mencionar que recentes estudos (Ahmad *et al.*, 2006; Ahmad *et al.*, 2004a; Ahmad *et al.*, 2004b; Holzer, *et al.*, 2005) voltados para a análise das reações de fotodegradação da riboflavina em soluções aquosas (aspectos fotoquímicos da riboflavina) evidenciaram a formação de um conjunto de fotoprodutos os quais também podem estar relacionados aos efeitos citotóxicos da riboflavina irradiada. Os resultados obtidos mostram que a riboflavina é degradada através de uma variedade de reações, entre elas fotólise (fotoredução intramolecular) e fotoadição (fotoadição intramolecular), tidas como as principais (Ahmad *et al.*, 2006; Ahmad *et al.*, 2004a; Ahmad *et al.*, 2004b). Como resultado, a fotodegradação da riboflavina em soluções aquosas resulta na formação de uma série de produtos, tais como 7,8-dimetil-10-(formilmetil)-isoaloxazina, lumicromo, lumiflavina e ciclodehidroriboflavina (Figura 2).

Atualmente, a riboflavina e outras substâncias com capacidade fotossensibilizadora têm sido alvos de estudos relacionados ao tratamento e prevenção de doenças com emprego de luz. Na área oncológica, destaca-se o estudo da Terapia Fotodinâmica, uma forma estabelecida de fotoquimioterapia onde uma substância fotossensibilizadora é acumulada num tecido tumoral especificamente irradiado,

levando à destruição das células tratadas (Edwards *et al.*, 1999a; Sol *et al.*, 2006). A Terapia Fotodinâmica tem se mostrado método atrativo para o tratamento de neoplasias induzindo a eliminação das células tumorais por diversas vias de morte, incluindo morte necrótica, apoptótica e autofágica (Zaidi and Oleinick, 1993; He *et al.*, 1994; Luo *et al.*, 1996; Kessel *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2005). No tratamento das leucemias o método revela-se ponto chave na determinação do sucesso de transplantes autólogos de células tronco hematopoiéticas desde que mostra induzir, de maneira efetiva, a eliminação de células leucêmicas residuais responsáveis pela recidiva da doença (Huang *et al.*, 2006).

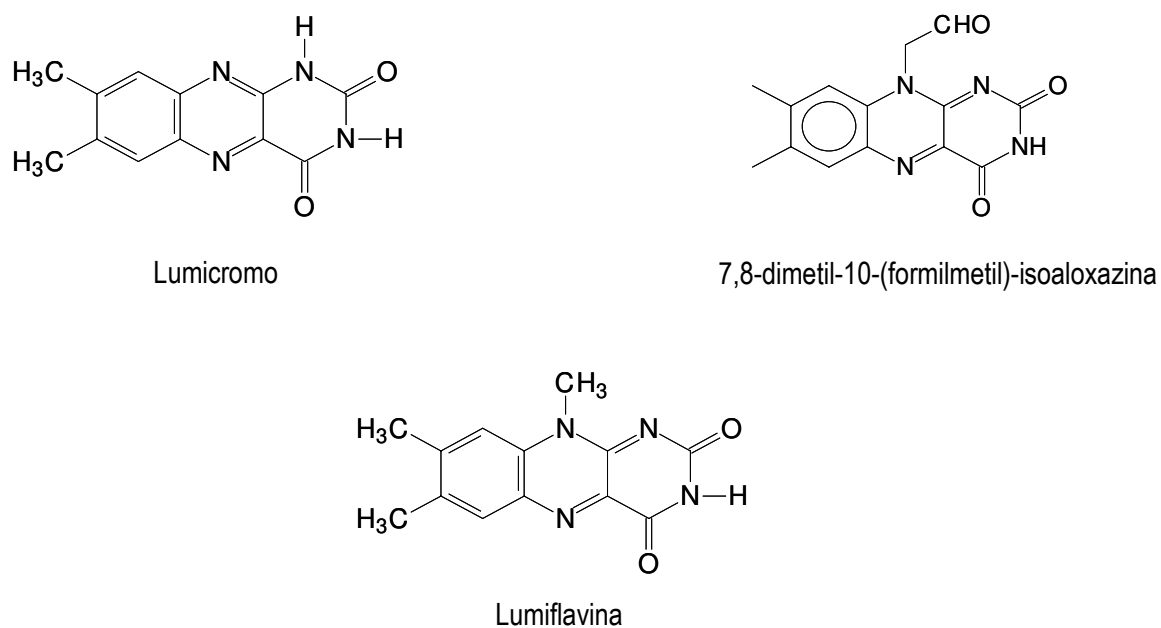


Figura 2. Estrutura química dos principais fotoprodutos da riboflavina.

1.1.2. Fisetin

Flavonóides são compostos polifenólicos de baixa massa molecular, freqüentemente presentes em grãos, frutas cítricas, vinho tinto, chá e óleo de oliva. O interesse no estudo das atividades biológicas dos flavonóides teve início em 1936 com Rusznyák and Szent Györgyi, os pioneiros no

reconhecimento dos benefícios terapêuticos apresentados por esses compostos. Desde então, o estudo de flavonóides tem despertado cada vez mais interesse, o que atualmente pode ser observado pelo aumento explosivo de pesquisas com flavonóides considerados terapeuticamente ativos. Aliando efetivo poder antioxidante com a capacidade de inibição de enzimas específicas, alta potência e baixa toxicidade sistêmica, os flavonóides são considerados compostos potenciais para a inibição seletiva de vias de sinalização intracelulares. Assim sendo, os flavonóides constituem alternativas promissoras às tradicionais drogas terapêuticas utilizadas no tratamento de uma variedade de doenças, incluindo câncer, alergias, AIDS, aterosclerose, isquemia, degeneração neuronal e doenças cardíacas, entre outras (Sengupta *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2006). Nesse contexto, a identificação de possíveis alvos moleculares da ação de flavonóides e o estudo da interação estabelecida entre flavonóides e seus alvos constituem um importante foco da atual pesquisa farmacológica.

Fisetin (3,7,3',4'-tetrahidroxiflavona) é um flavonóide bioativo comum da dieta, podendo ser encontrado em uma variedade de frutas e vegetais (Figura 3). Consumido em uma média de 0,4mg/dia, fisetin exerce efeitos cardioprotetores e anticarcinogênicos o que tem sido atribuído às suas propriedades antioxidantes (Van Acker *et al.*, 2000; Pietta, 2000; Lee *et al.*, 2002), citoprotetora, antiinflamatória e habilidade de prevenir a proliferação celular e a angiogênese (Fotsis *et al.*, 1997).

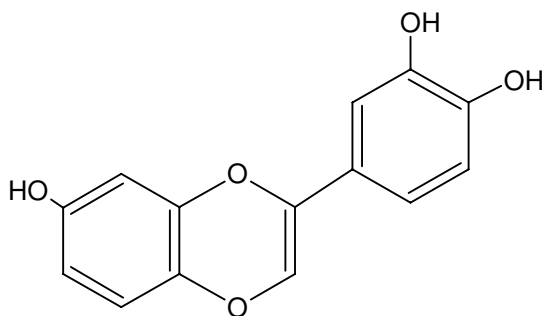


Figura 3. Estrutura química do fisetin.

É importante frisar que um crescente número de trabalhos na literatura tem demonstrado a capacidade do fisetin de modular vias de sinalização intracelulares, interferindo na expressão e/ou atividade de várias enzimas e moléculas sinalizadoras. Desta maneira, fisetin tem atraído interesse como potencial agente farmacológico para o tratamento de importantes patologias como AIDS, câncer, doenças autoimunes, neurodegenerativas, entre outras.

Estudos têm destacado a ação do fisetin na indução de enzimas de fase II, como NADPH quinona-redutase e glutathione S-transferase, e inibição de importantes enzimas como proteína quinase C (PKC) e proteinase HIV-1, sendo esta última enzima viral indispensável para a maturação e processamento do vírus da AIDS e, portanto, alvo viável para a terapia da doença (Ferricola *et al.*, 1989; Brinkworth *et al.*, 1992). Fisetin também mostra ação promissora na prevenção e tratamento de doenças inflamatórias regulando, através de diferentes mecanismos, as vias de sinalização relacionadas à liberação de citocinas pró-inflamatórias em diferentes sistemas celulares. De fato fisetin causa inibição da expressão de TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-6 e IL-8 em mastócitos efeito associado a sua capacidade de inibir enzimas da família das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) e a transcrição de genes mediada por NF κ B (Park *et al.*, 2006).

A capacidade do fisetin em modular a atividade de MAPKs tem despertado interesse não somente para o tratamento de doenças inflamatórias, mas também na terapêutica de doenças neurodegenerativas e de perda de memória. Recentemente foi descrita a capacidade do fisetin em promover, com grande eficiência, a diferenciação de células nervosas e, também, conferir proteção a essas células contra morte induzida por estresse oxidativo (Ishige *et al.*, 2001; Sagara *et al.*, 2004). A indução de diferenciação de células nervosas pelo fisetin mostra depender da ativação da via Ras/ERK e da conseqüente ativação de CREB (c-AMP response element-binding protein) promovida pela MAPK ERK. Como resultado da ativação de CREB no sistema nervoso central observa-se uma variedade de mudanças celulares associadas ao desenvolvimento da memória de longa duração mostrando que a

ativação da via de sinalização Ras/ERK por fisetin poderia ocasionar mudanças no cérebro que consistiriam a base celular da memória (Maher *et al.*, 2006).

Além dos efeitos citoprotetores já conhecidos, dados da literatura têm mostrado que fisetin também pode atuar como potente indutor de apoptose de células tumorais. Desta forma, o tratamento de células da leucemia mielocítica humana HL60 ou células de carcinoma hepático SK-HEP-1 com fisetin induz o aparecimento de características bioquímicas e morfológicas correspondentes às identificadas em células apoptóticas. Nessas células fisetin leva à ativação de caspase 3, fragmentação do DNA nuclear, formação de corpos apoptóticos e ao estabelecimento de uma população na fase sub G1 do ciclo celular. Importante citar que fisetin também levou a diminuição dos níveis intracelulares de H₂O₂ nas HL60 demonstrando uma intrigante correlação entre atividade antioxidante e apoptose induzida por flavonóides (Chen *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002).

Recentemente, Haddad *et al.* (2006) demonstraram que o tratamento da linhagem humana de câncer prostático PC3 com fisetin induz inibição do ciclo celular na fase G2/M. Além disso, fisetin mostra ainda inibir competitivamente a captação de glicose na linhagem tumoral mielóide U937, indicando a potencialidade do uso deste flavonóide como bloqueador da captação de glicose *in vitro* (Park, 1999).

Devido às suas propriedades cardioprotetoras e anticarcinogênicas, altas doses de fisetin e outros flavonóides são freqüentemente adicionadas a suplementos nutricionais, uma medida visando a aumentar seus benefícios biológicos. Porém, os efeitos biológicos da ingestão desses compostos em altas concentrações ainda não são conhecidos e evidências indicam que, nessas condições, fisetin e outros flavonóides podem interferir em processos celulares vitais. Estudos sugerem que fisetin pode ser genotóxico mesmo em concentrações relativamente baixas (Sengupta *et al.*, 2005; Guharay *et al.*, 2001) e que administração de doses progressivamente maiores tendem a aumentar a geração de radicais livres durante a sua oxidação, podendo causar lesões oxidativas, quebras e mutações nas

cadeias de DNA ou inibição da enzima topoisomerase II (Olaharski et al., 2005). Compostos que inibem DNA topoisomerase II, enzima nuclear essencial para a replicação do DNA, possuem uma clara tendência de induzir a fragmentação do DNA dupla fita podendo, desta forma, ser usados no tratamento de doenças neoplásicas.

1.2. Células usadas no trabalho

1.2.1. Células da leucemia mielocítica humana (HL60)

A leucemogênese é um fenômeno complexo caracterizado pelo desacoplamento anômalo dos eventos de proliferação e diferenciação resultando no bloqueio da maturação celular. Células da leucemia mielocítica humana (HL60) têm servido como sistema modelo para o estudo de compostos fotosensibilizadores e também para o estudo *in vitro* da diferenciação de células leucêmicas e desenvolvimento de novas drogas que poderão ser utilizadas na prevenção e tratamento dos diferentes tipos de leucemias (Edwards and Silva, 1999a; Uzunoglu *et al.*, 1999).

As células HL60 são indiferenciadas (blastos), não codificam a proteína p53 (responsável pelo reparo do DNA ou indução de apoptose) e expressam em grande quantidade as proteínas Bcl-2 e c-myc, esta última correlacionada com o estado hiperproliferativo dessas células (Blagosklonny *et al.*, 1996; Wall *et al.*, 1999). Expostas à ação de compostos específicos como ácido retinóico, dexametasona, arabinofuranosilcitosina C e vitamina D, as células HL60 podem se diferenciar em granulócitos/monócitos (Uzunoglu *et al.*, 1999), sendo este processo acompanhado por diminuição significativa dos níveis da proteína Bcl-2.

O ciclo de células eucarióticas é regulado por várias proteínas, incluindo as proteínas quinases dependentes de ciclinas e proteínas fosfatases (Tyson, 1999). A fosfatase Cdc25 ativa o complexo ciclina-quinase estimulando, portanto, a progressão do ciclo celular. As células HL60 apresentam pelo menos cinco tipos de proteínas fosfatases: proteína serina/treonina fosfatases PP1 e PP2A e proteínas

tirosina fosfatases CD45, SHP-1 e Cdc25. A modulação da atividade da CD45 apresenta importante papel na diferenciação e/ou manutenção de várias linhagens de células leucêmicas num estado antiproliferativo (Buzzi *et al.*, 1992). A proteína tirosina fosfatase SHP-1 também está envolvida na regulação da diferenciação destas células (Uesugi, *et al.*, 1999). PP1 está envolvida na indução de apoptose pela desfosforilação da proteína retinoblastoma (Rb), responsável pela progressão do ciclo celular de G1 para S através da indução da expressão de ciclinas e liberação do fator E2F (Wang *et al.*, 2001). PP2A participa na regulação do metabolismo, transcrição, processamento do RNAm (“splicing”), tradução, diferenciação, ciclo celular, transformação oncogênica e transdução de sinal. A ação anti-apoptótica das fosfatases PP1 e PP2A foi evidenciada com a utilização de inibidores destas enzimas (ácido okadáico e caliculina, respectivamente) os quais induzem apoptose das células HL60 (Uzunoglu *et al.*, 1999).

1.2.2. Células do câncer prostático humano andrógeno-independente (PC3)

O câncer prostático é uma das mais freqüentes malignidades metastáticas causadora da morte de homens em decorrência de câncer. Embora hoje novos métodos de detecção e novos agentes terapêuticos tenham sido desenvolvidos, em geral, pouco progresso tem sido observado no tratamento da doença o que está associado às altas taxas de detecção da doença em estágios mais avançados ou metastáticos e à dificuldade do estabelecimento de terapias mais eficientes. Atualmente, 22% dos novos casos de câncer prostático são detectados em fases avançadas contribuindo para o alto índice de mortalidade em decorrência da doença. Embora novas drogas mais efetivas e menos tóxicas tenham sido desenvolvidas, tumores prostáticos ainda mostram-se de difícil erradicação, freqüentemente tornando-se andrógeno-independentes e de difícil tratamento nos casos de recidiva da doença (Navarro *et al.*, 2002; Evans *et al.*, 2003; Diaz *et al.*, 2004; Nelson, 2004). Atualmente, muitos estudos têm se voltado para a determinação de novos alvos moleculares e moléculas biossensoras para o tratamento e

detecção precoce da doença. Nesse contexto, a linhagem celular PC3 tem sido usada como modelo de câncer prostático hormônio-refratário para o estudo *in vitro* dos mecanismos moleculares envolvidos na diferenciação celular e apoptose em resposta a potenciais agentes farmacológicos.

PC3 mostra-se resistente à morte induzida por TNF α e, apesar de comumente expressar Fas e secretar a forma biologicamente ativa de FasL, também mostra resistência à morte celular apoptótica induzida por Fas (Costa-Pereira and Cotter, 1999; Hyer et al., 2000; Bertran, 2006). Contudo, dados da literatura demonstram que a inibição de PI3K em células de câncer prostático é capaz de levar à reativação do potencial apoptótico da sinalização via Fas (Bertran, 2006).

Curiosamente, em células de câncer prostático como PC3 a ativação da MAPK p38, quinase frequentemente envolvida na indução de apoptose em células tumorais, parece estar mais relacionada com efeitos anti-apoptóticos e antimetastáticos (Ricote *et al.*, 2005), demonstrando as particularidades destas células quanto ao mecanismo molecular de indução de morte e a emergente necessidade da determinação de seus efetivos alvos moleculares. Nesse sentido, metaloproteases mostram-se potenciais alvos moleculares na inibição da metástase de câncer prostático, visto que somente células tumorais prostáticas expressando altos níveis de MMP-2 e MMP-9 mostram capacidade de ocasionar metástases (Evans and Moller, 2003; Thuraija *et al.*, 2004; Carlin and Andrioli, 2000).

1.3. Apoptose

Apoptose pode ser definida como um mecanismo de morte celular geneticamente programado e conservado evolutivamente que capacita as células a desencadear um processo de morte altamente regulado em resposta a estímulos inerentes ao desenvolvimento normal ou em situações de estresse celular (Kaufmann and Hengartner, 2001; Degterev *et al.*, 2003; Orrenius *et al.*, 2003). Assim sendo, a apoptose é considerada a principal forma de “suicídio celular”, desempenhando papel central em vários processos fisiológicos e na manutenção da homeostase em organismos multicelulares.

Em geral, a apoptose caracteriza-se por acometer células individuais e esparsas de um tecido, induzindo um conjunto específico de alterações morfológicas, entre as quais, encolhimento citoplasmático e perda de contato com células vizinhas, aparecimento de vacúolos citoplasmáticos, formação de bolhas ou projeções nas membranas nuclear e citoplasmática, fissão mitocondrial, condensação da cromatina, fragmentação nucleossomal do DNA (originando fragmentos com múltiplos de 180-200 pares de bases) e exposição da fosfatidilserina na camada externa da membrana citoplasmática sendo que, ao final do processo, ocorre fragmentação celular em unidades conhecidas como corpos apoptóticos (Wyllie *et al.*, 1980; McConkey, 1998; Los *et al.*, 2003; Youle and Karbowski, 2005). É interessante citar que, durante todo o processo não há extravasamento de material intracelular e os corpos apoptóticos são reconhecidos e rapidamente removidos por células fagocíticas sem que haja desencadeamento de resposta inflamatória (Israels and Israels, 1999; Liston *et al.*, 2003).

Estima-se hoje que metade das doenças médicas esteja relacionada ao descontrole do processo apoptótico (Fischer and Schulze-Osthoff, 2005). De fato, assim como os processos de proliferação e diferenciação, a morte apoptótica constitui evento crítico para a manutenção da homeostase e falhas no processo podem levar ao acúmulo de células indesejáveis (formação e proliferação de tumores, resistência à quimioterapia), falha na erradicação de células aberrantes (doenças autoimunes) ou desordens levando à inapropriada perda de células (choque séptico, destruição do tecido vascular após processo de isquemia-reperfusão, AIDS, doenças neurodegenerativas, injúrias hepáticas)-(Kaufmann and Hengartner, 2001; Degtrev *et al.*, 2003, Fischer and Schulze-Osthoff, 2005).

O mecanismo de morte celular apoptótica pode ser desencadeado por uma série de estímulos intra e extracelulares que levam à ativação de cascatas de enzimas proteolíticas específicas denominadas caspases as quais são responsáveis pela iniciação, execução e regulação do processo apoptótico. Baseadas num mecanismo de clivagem específica de proteínas as caspases levam ao

colapso da infra-estrutura celular através da desintegração do citoesqueleto, desarranjo metabólico e fragmentação genômica. Entre os principais alvos de caspases encontram-se proteínas estruturais e de funções essenciais como proteínas requeridas no reparo do DNA (DNA-PK, PARP), proteínas reguladoras do ciclo celular (Cdc27, Rb), proteínas envolvidas em patologias humanas e proteínas diretamente envolvidas na regulação da apoptose (ICAD, Bid), assim como reguladoras/mediadoras da sinalização apoptótica (PKB/Akt, RIP quinase)-(Schmitt *et al.*, 1999; Köhler *et al.*, 2002, Ghobrial *et al.*, 2005).

Além do papel desempenhado na regulação e execução do processo apoptótico, muitas caspases possuem funções adicionais não relacionadas com a morte celular, estando associadas à regulação da resposta imune, progressão do ciclo celular e ao processo de diferenciação. Assim, caspase 1 e 11 participam na regulação da resposta inflamatória, caspase 8 está envolvida na ativação de linfócitos T e B, caspase 3 participa na diferenciação muscular e a caspase 14 parece estar envolvida na diferenciação de queratinócitos (Donepudi and Grütter, 2002, Los *et al.*, 2003). A regulação da atividade de caspases está, portanto, implicada nos processos de proliferação, apoptose e diferenciação celular (Liston *et al.*, 2003) demonstrando que a ativação desse grupo de enzimas em uma célula não deve ser entendida como sinônimo de indução de apoptose. Assim sendo, a determinação do destino celular não deve ser somente associada a quantidade de caspases ativas mas também devem ser levados em consideração o local onde essas caspases são ativadas e a presença de possíveis inibidores (Los *et al.*, 2003).

1.3.1. Vias de sinalização apoptótica

O desencadeamento do processo de morte celular apoptótica e ativação de caspases pode ocorrer através de duas vias principais, dependendo da natureza do estímulo. A via extrínseca é desencadeada pela ativação de receptores de morte enquanto que na segunda via de indução

apoptótica, via intrínseca, a mitocôndria é a mediadora chave do processo de morte celular (Assunção and Linden, 2004).

Na via extrínseca, o sinal de morte é transmitido através de um ligante extracelular, membro da superfamília do fator de necrose tumoral (TNF), que se acopla a um receptor da família dos receptores de morte (CD95/Fas/Apo1, TNFR1, DR3/Wsl-1/Tramp, DR4/TRAIL-R1, DR5/TRAIL-R2/TRICK2/Killer e DR6) induzindo sua oligomerização (McConkey, 1998; Donepudi and Grütter, 2002). A multimerização induzida pelo ligante resulta na formação de um complexo intracelular de indução de morte denominado DISC (“death- inducing signaling complex”) o qual é formado pela interação entre a parte citoplasmática dos receptores com múltiplas moléculas adaptadoras como FADD/MORT1 (Fas associated death domain protein), TRADD (TNF receptor associated DD), DAXX, RIP (receptor interacting protein kinase), RAIDD (RIP associated protein with DD) e FLIP. A interação entre receptor e moléculas adaptadoras se dá através de domínios de interação proteína-proteína denominados domínios de morte, DD (“death domain”) presentes em ambas as moléculas (Degterev *et al.*, 2003; Barnhart *et al.*, 2003; Fischer and Schulze-Osthoff, 2005). Posteriormente, caspases iniciadoras, como as caspases 8 ou 10, são recrutadas para DISC onde interagem com moléculas adaptadoras através de domínios efetores de morte DED (“death effector domains”). A interação com proteínas adaptadoras leva à oligomerização das caspases 8 ou 10 em DISC, aumentando a concentração local e favorecendo a autoclivagem e autoativação dessas caspases iniciadoras (Johnstone *et al.*, 2002). Uma vez ativada, a caspase 8 cliva e ativa caspase 3, induzindo diretamente a fase de execução do processo apoptótico.

A via intrínseca desencadeia apoptose em resposta a danos no material genético, defeitos nos pontos de checagem do ciclo celular, mitose catastrófica, hipóxia, ausência de fatores de crescimento, agentes quimioterápicos, radiação, drogas citotóxicas e outros tipos severos de estresse intracelulares (Gottlieb, 2000; Wang and El-Deiry, 2003; Liston *et al.*, 2003). Esta via envolve a ativação de proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2 que agem na mitocôndria, afetando sua permeabilidade seletiva através

da formação de poros por onde extravasam fatores apoptogênicos como citocromo c, fator de indução de apoptose (AIF, “apoptosis-inducing factor”), Omi/HtrA2, Smac/DIABLO e endo G, entre outras (Kaufmann and Hengartner, 2001; Wang and El-Deiry, 2003; Youle and Karbowski, 2005).

A liberação do citocromo c no citosol, em presença de dATP, induz a formação dos apoptossomos estruturas que, similarmente ao complexo DISC formado na via extrínseca de ativação apoptótica, associam moléculas adaptadoras intracelulares às formas inativas de caspases iniciadoras através de domínios de interação proteína-proteína do tipo CARD (“caspase activator and recruitment domain”) presente em ambas as moléculas. O apoptossomo consiste num heptâmero de moléculas adaptadoras APAF-1, cada uma das quais ligadas a um dímero de caspase 9. O dímero de caspase 9 é então ativado através de mudança conformacional induzida pelo apoptossomo, atuando seqüencialmente no processamento e ativação das caspases efetoras 3 e 7 e iniciando a execução da apoptose similarmente à caspase 8. O complexo apoptossômico provavelmente serve como um regulador alostérico da caspase 9 que, em situações onde não haja estímulo apoptótico, encontra-se livre no citosol na forma de monômeros inativos. A integração da caspase 9 ao apoptossomo induz sua dimerização e ativação, o que faz do apoptossomo uma verdadeira holoenzima na qual a atividade da caspase ativa chega a ser mil vezes maior que a atividade residual do monômero (Degterev *et al*, 2003). É importante notar que, contrariamente à ativação da caspase 8 que necessita de aproximação e atividade proteolítica, a ativação da caspase 9 é um evento controlado alostericamente, onde a ativação é alcançada por mudança conformacional através de dimerização induzida pelo apoptossomo (Donepudi and Grütter, 2002).

Adicionalmente à ativação de caspases, a liberação do citocromo c causa vagarosa e irreversível perda de função mitocondrial e decréscimo de respiração levando à morte celular. Portanto, a via apoptótica mitocondrial parece resultar em um evento que compromete irreversivelmente a célula

à morte (“point-of-no-return”) levando à rápida ativação de caspases acompanhada de morte celular lenta através de disfunção mitocondrial (Liston *et al.*, 2003).

É importante notar que as vias intrínseca e extrínseca freqüentemente agem em conjunto nas fases de indução e execução do processo apoptótico, cooperando na recepção do sinal de morte e na amplificação da ativação de caspases. De fato, as vias extrínseca e intrínseca de indução de morte celular podem comunicar-se entre si em vários níveis fazendo com que a ativação de uma possa, em algum nível, desencadear a ativação da outra, o que vai depender do tipo e contexto celular, tipo e intensidade do estresse, entre outros fatores. Assim, a ativação de receptores de morte pode levar à subsequente ativação da via mitocondrial através da clivagem da proteína pró-apoptótica Bid pela caspase 8. A forma truncada resultante de Bid (tBid) transloca-se para a mitocôndria onde ativa Bak e Bax, induzindo a oligomerização dessas moléculas e a formação de poros por onde extravasam citocromo c e demais fatores apoptogênicos mitocondriais levando à consequente ativação de caspases efetoras (Kaufmann and Hengartner, 2001; Barnhart *et al.*, 2003; Scorrano, 2003). Da mesma maneira, a ativação da via intrínseca também pode sensibilizar as células a ligantes de morte extrínsecos através da indução da expressão de receptores de morte mediada por p53. A dependência de p53 para ativação da via mitocondrial após danos ao DNA constitui um ponto crítico na indução de morte de células tumorais através de agentes quimioterápicos. Grande parte dos tipos tumorais apresenta mutações em p53 que acabam levando à ineficácia do tratamento (Wang and El-Deiry, 2003).

Uma terceira via de sinalização apoptótica através do retículo endoplasmático parece também fazer parte do arsenal de indução apoptótica (Assunção and Linden, 2004). Postula-se que um estímulo estressor prolongado sobre o retículo endoplasmático leve à ativação da caspase 12, localizada na membrana do retículo endoplasmático, sendo esta clivada e ativada por m-calpaína em resposta à mobilização dos estoques intracelulares de Ca^{2+} . Uma vez ativada, a caspase 12 age em caspases efetoras induzindo apoptose. Assim, estresse de retículo endoplasmático causado por depleção de Ca^{2+}

ou alterações no seu sistema de transporte pode estar relacionado diretamente à ativação de caspases (Kadowaki *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2005).

1.3.2. Família de proteínas Bcl-2

Os membros da família de proteínas Bcl-2 são mediadores chaves do processo apoptótico estando relacionados tanto à percepção do estímulo de morte quanto à ativação e regulação da maquinaria de morte celular. Por atuarem em diversos níveis do processo apoptótico, mutações em genes que codificam proteínas da família Bcl-2 podem exercer profundos efeitos no desenvolvimento embrionário e estão freqüentemente associadas à gênese de diversas doenças (Wang *et al.*, 1999; Kaufmann and Hengartner, 2001; Ghobrial *et al.*, 2005).

A família de proteínas Bcl-2 engloba proteínas que compartilham pelo menos um domínio de homologia a Bcl-2 (BH) conservado. Inclui tanto membros pró-apoptóticos (Bax, Bak, Bok, Bid, Bim, Bik, Bad, Bmf, Kek, Noxa e Puma) quanto anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-XL, A1, Bcl-w e Mcl-1, A1/Bfl1)-(Cory and Adams, 2002) que, em condições normais, permanecem em equilíbrio. Os membros anti-apoptóticos da família são caracterizados pela presença de BH1-BH4, sendo que muitas das proteínas desse grupo também possuem uma cauda hidrofóbica C-terminal através da qual se fixam na superfície citosólica de várias membranas intracelulares, tais como, membrana mitocondrial externa, membrana nuclear e retículo endoplasmático. Membros dessa classe de proteínas Bcl-2 destacam-se também por possuírem uma região hidrofóbica formada pelos resíduos de BH1, BH2, BH3 que pode ser ocupada pela própria cauda hidrofóbica ou mediar ligações com outras proteínas da família, através do domínio BH3. O mecanismo pelo qual previnem a morte celular baseia-se na ligação e seqüestro de membros pró-apoptóticos, embora outros mecanismos envolvendo interações proteína-proteína também existam (Kaufmann and Hengartner, 2001). Destaca-se neste subgrupo a ação de Bcl-2, proteína integral de membrana com importante função anti-apoptótica. Também fazem parte desse subgrupo proteínas

como Bcl-XL e Bcl-w que, ao contrário de Bcl-2, somente associam-se fortemente com membranas após a sinalização de morte (Cory and Adams, 2002).

Os membros pró-apoptóticos da família Bcl-2 podem ser divididos em duas subfamílias. A subfamília de Bax apresenta proteínas com seqüências similares aos membros anti-apoptóticos, especialmente nas regiões de BH1, BH2 e BH3, porém parecem ter perdido o domínio BH4. Fazem parte desta subfamília proteínas como Bax, Bak e Bok cujas atividades mostram-se necessárias e possivelmente suficientes para induzir a liberação do citocromo c. Bax reside no citoplasma mas em ocasião de estímulo apoptótico transloca para a membrana mitocondrial externa onde sofre mudança conformacional e oligomeriza-se, formando poros por onde ocorre a liberação do citocromo c. Bak apresenta-se na forma de oligômeros integrais da membrana mitocondrial externa mesmo na ausência de estímulo apoptótico. Na ocasião de indução de morte celular, muda de conformação formando agregados ainda maiores também envolvidos na liberação do citocromo c (Cory and Adams, 2002; Fischer and Schulze-Osthoff, 2005).

A segunda subfamília de membros pró-apoptóticos consiste de um grande e variado grupo de polipeptídeos que contêm apenas um único domínio BH3 que é, tanto necessário quanto suficiente para a ação pró-apoptótica. Proteínas de domínio BH3 único (Bad, Bim, Bik, Bid, Bmf, Noxa, Puma) respondem a uma grande variedade de estímulos apoptóticos (desde remoção de fatores de crescimento, alterações no citoesqueleto até danos ao DNA) parecendo mesmo “sentinelas” encarregadas de desencadear apoptose após estímulo estressor de origem intra ou extracelular. Com exceção de Bid, agem por ligação e neutralização de membros anti-apoptóticos via domínios BH3 (Cory and Adams, 2002). A proteína Bad, dependendo da origem do estímulo de sobrevivência e do tipo celular, é fosforilada em resíduos de Ser-112, Ser-128, Ser-136, Ser-155 e Ser-170 por diferentes quinases. A fosforilação de Bad, principalmente no resíduo de Ser-136, resulta em sua associação com proteínas 14-3-3 e retenção no citosol, o que impede que se associe e inative Bcl-2 e Bcl-XL

mitocondriais. Bid promove a morte celular ativando Bax e Bak e, também, inativando membros anti-apoptóticos, sendo ambas atividades dependentes de interação entre domínios BH3. A exposição do domínio BH3 em Bid ocorre após clivagem dentro da região amino terminal, reação promovida pela caspase 8 ou granzima B. Após ativado, Bid transloca-se para a mitocôndria onde induz oligomerização de Bax/Bak e a formação dos poros para liberação do citocromo c (Schmitt *et al.*, 1999).

Em geral, ambas subfamílias de Bcl-2 pró-apoptóticas são necessárias para a iniciação da apoptose. As proteínas de domínio BH3 único agem como sensores de danos celulares e antagonistas diretos de proteínas anti-apoptóticas, enquanto membros da subfamília Bax agem posteriormente, provavelmente na permeabilização da membrana mitocondrial.

1.3.3. Mecanismos de morte celular

Apesar do grande avanço das pesquisas levando à caracterização bioquímica e celular do mecanismo de morte apoptótica, a confusão entre os termos apoptose e morte celular programada ainda pode ser observada com frequência nos meios de divulgação científica, não sendo raro o uso da palavra apoptose como sinônimo de morte celular programada.

Morte celular programada não é sinônimo de apoptose e pode ser definida como uma seqüência de eventos, não necessariamente aqueles que levam a uma morfologia apoptótica, baseados no metabolismo celular e que culminam com a morte da célula. De fato, a apoptose não é o único modelo de morte celular programada (Assunção and Linden, 2004).

Atualmente, o próprio mecanismo apoptótico tem sido revisto e evidências sugerem que, na verdade, este não é um mecanismo único mas um conjunto de múltiplos mecanismos que levam a uma morfologia apoptótica comum. Entre esses vários mecanismos, muitos surpreendem por derrubarem conceitos que até o presente momento pareciam dogmas do estudo da apoptose. A indução de caspases como resultado de estímulo de morte parece não ser mais pré-requisito para o

desencadeamento apoptótico, desde que a inibição de caspases falha em bloquear a morte celular com morfologia apoptótica em vários modelos experimentais (Los *et al.*, 2003; Abraham and Shaham, 2004; Twomey and McCarthy, 2005). Vias de morte celular independentes de caspases têm sido descritas em várias formas de morte induzidas por Bax (Jurgensmeier *et al.*, 1998; Twomey and McCarthy, 2005), bem como em situações onde outras proteases, tais como, calpaína e serina proteases são ativadas (Squier *et al.*, 1994; Jurgensmeier *et al.*, 1998; Assefa *et al.*, 2000). Esses dados mostram que a morfologia apoptótica clássica pode ser alcançada, tanto pela ativação de caspases quanto por outras famílias de proteases, embora as exatas características citológicas da degeneração celular possam variar levemente entre essas várias formas de apoptose, atualmente designadas como “apoptosis-like”. Além disso, o mecanismo apoptótico também mostra ser flexível em relação à ativação de caspases específicas, desde que vias alternativas de ativação de caspases podem ser ativadas durante o estímulo apoptótico, dependendo da disponibilidade da caspase preferencial (Troy *et al.*, 2001).

Durante os últimos trinta anos, a morte celular foi classificada segundo um padrão dicotômico. De um lado, havia a necrose, morte celular “acidental” e descontrolada e, de outro, a apoptose, caracterizada como um tipo de morte celular geneticamente programado, apresentando um padrão de alterações morfológicas comuns. Hoje, estudos demonstram que a necrose também pode ser um tipo de morte celular programada assim como evidenciam a existência de outras formas desse tipo de morte além da apoptose, entre elas a autofagia a qual postula-se ter-se desenvolvido muito antes do processo apoptótico (Zong and Thompson, 2006).

A morte celular autofágica ocorre em muitas células eucarióticas, sendo considerada uma via degenerativa que culmina na degradação lisossomal de vacúolos citoplasmáticos contendo macromoléculas e organelas (Assunção and Linden, 2004). O processo é acompanhado por mudanças morfológicas específicas que envolvem a formação de vacúolos citoplasmáticos, dilatação de mitocôndria e retículo endoplasmático, formação de bolhas na membrana citoplasmática e perda de

especializações, tais como, microvilosidades e complexos de junção, além de intensa endocitose observada nos estágios finais do processo. A autofagia tem sido descrita como um mecanismo de resistência à escassez de nutrientes bem como parte integrante dos processos de diferenciação, metamorfose, envelhecimento e transformação celular, entre outros (Dunn, 1990; Abraham and Shahan, 2004). Contudo, o mecanismo de autofagia e o perfil celular autofágico final estão sendo relacionados à reações celulares defensivas contra estímulos estressores não letais e, também, como uma forma de morte celular programada distinta da apoptose, desencadeada em situações de injúrias letais (Assunção and Linden, 2004). Interessante citar que além da apoptose, a autofagia também tem mostrado estar associada a morte de parte das células neuronais em doenças como Parkinson (Anglade *et al.*, 1997), Alzheimer (Cataldo *et al.*, 1996) a até mesmo em doenças mediadas por príons (Jeffrey *et al.*, 1992).

Em relação ao atual conhecimento do processo necrótico, existem crescentes evidências de que as formas de morte celular necróticas e apoptóticas compartilhem mais similaridades do que originalmente se pensava. De fato, a necrose tem se mostrado potencial substituta da apoptose durante o desenvolvimento embrionário, sendo que algumas formas de necrose podem também ser mediadas por moléculas chaves do processo apoptótico, tais como Bcl-2/Bcl-XL e caspases (Kane *et al.*, 1995; Oppenheim *et al.*, 2001). Também tem sido sugerida a existência de duas vias distintas de morte celular desencadeadas por receptores de Fas, as quais podem levar tanto à clássica ativação de apoptose caspase-dependente ou desencadearem necrose programada (Kawahara *et al.*, 1998). Necrose, então, tem sido definida como uma morte celular programada que ocorre na ausência de condensação de cromatina ou com pontos de agrupamento de cromatina (Leist and Jaattela, 2001).

1.4. Proteínas fosfatases

As células respondem aos estímulos do ambiente através de vias transdução de sinais intracelulares as quais comumente utilizam os mecanismos de fosforilação e desfosforilação a fim de promover modificação de proteínas de uma maneira rápida e reversível (Ferreira *et al.*, 2006; Tamura *et al.*, 2004). De fato, o balanço entre fosforilação e desfosforilação de proteínas é a base para o controle de diversos eventos biológicos disparados por efetores extracelulares como hormônios, mitógenos, carcinógenos, citocinas, neurotransmissores e substâncias ou metabólitos tóxicos (Harrison *et al.*, 1999; Ostman and Bohmer, 2001). Em eucariotos, a atividade de pelo menos 30% das proteínas pode ser regulada por fosforilação, principal mecanismo que controla uma grande variedade de processos celulares como sobrevivência, diferenciação e morte celular (Garcia *et al.*, 2003).

A fosforilação de uma proteína pode criar um novo sítio de reconhecimento para interações proteína-proteína, controlar a estabilidade protéica e, ainda, regular a atividade enzimática. As cascatas de sinalização geralmente são formadas por reações seqüenciais de proteínas quinases, mas o controle do mecanismo como um todo envolve a ação conjunta de proteínas quinases e fosfatases (Janssens *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2002), cujas atividades são cuidadosa e fortemente reguladas *in vivo*. Assim sendo, alterações na atividade dessas enzimas estão envolvidas no desenvolvimento de inúmeras doenças genéticas ou adquiridas, tais como diabetes, câncer e autoimunidade (Schönthal, 2001; Ferreira *et al.*, 2006; Malentacchi *et al.*, 2005). Em particular, a fosforilação e desfosforilação de resíduos de treonina, serina e tirosina em proteínas têm emergido como eventos chaves na regulação da divisão, diferenciação, desenvolvimento celular, apoptose, regulação do metabolismo, expressão gênica, contração, transporte, locomoção celular, aprendizado e memória (Harrison *et al.*, 1999; Krebs and Graves, 2000; Schönthal, 2001; Genoux *et al.*, 2002)

Com base na função, estrutura, seqüência, especificidade, sensibilidade a ativadores e inibidores, as proteínas fosfatases podem ser divididas em dois grandes grupos: serina/treonina fosfatases e tirosina fosfatases (PTPs) (Jia, 1997; Aoyama *et al.*, 2003).

1.4.1. Proteínas tirosina fosfatases (PTPs)

No genoma humano já foram identificados 107 genes que codificam enzimas da família das proteínas tirosina fosfatases (PTPs)-(Mustelin *et al.*, 2004; Alonso *et al.*, 2004), uma classe de enzimas sinalizadoras estrutural e funcionalmente diversificada que, juntamente com proteínas tirosina quinases, modula os níveis celulares de fosforilação em resíduos de tirosina, controlando processos fisiológicos fundamentais como crescimento e diferenciação, ciclo celular, metabolismo e funções de citoesqueleto (Zhang, 2003; Andersen *et al.*, 2004).

Classicamente, as PTPs têm sido classificadas como PTPs tipo receptor, PTPs citoplasmáticas, PTPs de especificidade dual e PTPs de baixo massa molecular. Contudo, trabalhos mais recentes têm proposto uma nova classificação desta família, baseada nos resíduos de aminoácidos presentes em seus domínios catalíticos (Alonso *et al.*, 2004; Andersen *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2006). De acordo com essa nova classificação, as PTPs podem ser agrupadas em quatro classes diferentes:

PTPs da classe I, representadas pelas PTPs “clássicas” e PTPs de especificidade dual, caracterizadas pela utilização de um mecanismo catalítico comum, baseado numa cisteína presente no sítio ativo, onde um intermediário fosfo-cisteinil é formado e hidrolisado seqüencialmente com o auxílio de um resíduo de ácido aspártico (Mustelin *et al.*, 2004). A presença de cisteína no sítio ativo é responsável pela característica comum das PTPs desta classe de serem inibidas por pervanadato, p-cloromercuribenzoato e outros agentes oxidantes (Aoyama *et al.*, 2003).

As PTPs “clássicas” são divididas entre fosfatases tipo receptor e enzimas citosólicas. As PTPs tipo receptor (CD45, PTP α , PTP γ) são enzimas modulares consistindo de um segmento extracelular,

envolvido na comunicação célula-célula e transdução de sinais, seguido por um único segmento transmembrana com um ou dois domínios PTPs citoplasmáticos (Alexander, 2000; Zhang, 2001; Aoyama *et al*, 2003). PTPs citosólicas (PTP1B, PTP2, VH1 e SHP) apresentam um único sítio catalítico e várias extensões amino e carboxi-terminais contendo domínios extra-catalíticos, tais como domínios SH2, envolvidos diretamente na regulação da atividade catalítica ou endereçamento e reconhecimento de substratos, estratégia que visa ao aumento da capacidade catalítica dessas enzimas (Zhang *et al.*, 2002; Aoyama *et al*, 2003).

PTPs de especificidade dual atuam tanto em resíduos de fosfotirosina quanto fosfoserina e fosfotreonina, possuindo maior afinidade por fosfotirosina. Alguns componentes do grupo agem também sobre outros substratos além de fosfoproteínas sendo que, em geral, as enzimas do grupo participam da regulação de sinais mitogênicos e desempenham importante papel no controle do ciclo celular (Wu *et al.*, 1999; Zhang, 2001). Fazem parte deste grupo fosfatases de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKPs) e fosfatase supressora de tumor (PTEN), entre outras (Zhang *et al.*, 2002; Aoyama *et al*, 2003).

A classe II de PTPs, assim como a classe I, agrupa enzimas com mecanismo catalítico baseado num resíduo de cisteína que parecem ter uma origem mais antiga do que as enzimas da classe I. Em humanos são representadas pelas proteínas fosfatases tirosina-específicas de baixa massa molecular (LMWPTPs) reconhecidas pela capacidade de interação com vários receptores tirosina quinase (PDGF, receptor de insulina, e receptor Eph A2) e proteínas de ancoragem (β -catenina), atuando tanto como reguladores negativos quanto positivos da proliferação celular induzida por fatores de crescimento. Recentes estudos têm mostrado que o aumento na expressão de LMWPTPs é suficiente para induzir a transformação celular e que a atividade dessas enzimas está fortemente correlacionada ao desenvolvimento e progressão de tumores em modelos animais (Kikawa *et al.*, 2002; Chiarugi *et al.*, 2004).

PTPs da classe III são representadas por fosfatases tirosina/treonina específicas como o grupo de fosfatases Cdc25 cuja ação, também mediada por um resíduo de cisteína, constitui evento importante na progressão do ciclo celular.

A quarta e última classe de PTPs, representada pela família de proteínas Eya, agrupa enzimas com mecanismo catalítico baseado num resíduo de aspartato e dependente de cátion.

Em contraste às proteínas tirosina quinases, que apresentam potencial de promoção de crescimento, as PTPs podem agir como supressoras de tumor e inibir o crescimento celular. PTPs também têm sido implicadas na ativação de linfócitos B e T e na sinalização por insulina, o que faz destas enzimas alvos atrativos para o desenvolvimento de drogas usadas numa variedade de doenças como câncer, inflamação, diabetes e obesidade (Pils and Schultz, 2004; Haugh *et al.*, 2004, Andersen *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2006).

1.4.2. Proteínas serina/treonina fosfatases

A família de proteínas serina/treonina fosfatases compreende duas subfamílias de enzimas conhecidas como fosfoproteínas fosfatases (PPP) e proteínas fosfatases dependentes de magnésio (PPM), as quais apresentam em comum similaridade de estrutura primária (Van Hoof and Goris, 2003; Garcia *et al.*, 2003). A subfamília das PPPs apresenta-se subdividida em PP1, PP2A (incluindo PP4 e PP6), PP2B (também conhecida como calcineurina), PP5 e PP7, de acordo com características de especificidade por substratos e sensibilidade diferencial a inibidores e ativadores específicos (Van Hoof and Goris, 2003). De uma maneira geral, PP1, PP2A, PP4 (PPX), PP5, PP6 e PP7 são caracterizadas por serem inibidas por toxinas como ácido okadaico e microcistina (Garcia *et al.*, 2003), sendo que PP1, PP4, PP5 e PP6 mostram-se mais sensíveis à inibição por ácido okadaico (inibidas em concentrações da ordem de nM) do que PP2A e PP2B (inibidas em concentrações da ordem de μM)-(Klumpp and Krieglstein, 2002). PP2C, único membro da família das PPMs, não é afetada por toxinas como ácido

okadaico e microcistina, apresentando como característica específica a dependência de magnésio para sua atividade catalítica relacionada à resposta celular ao estresse (Klumpp and Krieglstein, 2002; Aoyama, *et al*, 2003).

Proteína PP2A: Enzima chave no processo apoptótico

A fosforilação reversível de proteínas constitui importante mecanismo de regulação da morte celular. Como muitos processos fisiológicos, o comprometimento celular com o processo apoptótico é regulado por mecanismo pós-traducional, através da fosforilação reversível de proteínas sinalizadoras de apoptose e, portanto, controlado por um balanço entre a atividade de proteínas quinases e proteínas fosfatases.

A proteína fosfatase tipo 2 (PP2A) é a principal proteína serina/treonina fosfatase envolvida na regulação de vias de transdução de sinais e de vários processos celulares como progressão do ciclo celular, replicação do DNA, transcrição gênica e síntese de proteínas (Van Hoof and Goris, 2003; Yu *et al.*, 2004; Janssens, 2005). Tal diversidade de funções é explicada em parte pela sua complexidade estrutural e regulatória. A estrutura central da enzima é composta por uma subunidade estrutural (A) e uma subunidade catalítica (C) que pode encontrar-se em forma livre ou associar-se a uma terceira unidade denominada subunidade regulatória (B), formando o complexo trimérico da holoenzima. Atualmente, têm sido descritas três classes de subunidades regulatórias B, sendo que cada uma delas existe na forma de pelo menos duas isoformas diferentes. A existência de múltiplas classes e isoformas das subunidades regulatórias B é consistente com a hipótese de que diferentes complexos de PP2A executem específicas e distintas funções fisiológicas graças às especificidades de substrato e localização celular conferidas pelas diferentes subunidades B (Hahn, 2004).

A fosforilação de proteínas intracelulares geralmente ocorre em resíduos de serina e treonina e a PP2A é responsável por significativa fração da atividade serina/treonina fosfatase na maioria das

células, sendo inclusive responsável pelo controle de pelo menos 50 proteínas quinases (Van Hoof and Goris, 2003; Yu *et al.*, 2004; Janssens *et al.*, 2005).

PP2A está envolvida tanto na regulação quanto na resposta celular à apoptose, agindo tanto “upstream” quanto “downstream” de caspases efetoras. Provavelmente, várias holoenzimas de PP2A com distintas subunidades regulatórias, especificidades por substratos e localizações subcelulares, parecem estar implicadas em diferentes níveis da via de sinalização apoptótica (Van Hoof and Goris, 2003). A função pró-apoptótica de PP2A é consistente com seu papel na progressão do ciclo celular, crescimento e sobrevivência celulares, inibindo direta ou indiretamente a quinase cdc2, MAPKs e PKB/Akt, respectivamente. Além de regular negativamente o crescimento celular, a atividade de PP2A também contribui para a natureza transiente das ativações de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) por fatores de crescimento, o que evita uma ativação constitutiva suficiente para causar transformação tumorigênica (Schöntal, 2001).

A relação da PP2A com a regulação do processo apoptótico envolve, entre outras ações, a desfosforilação de proteínas da família Bcl-2. A família de proteínas Bcl-2 é formada por membros pró e anti-apoptóticos, muitos dos quais residindo ancorados à membrana mitocondrial externa. Integrando sinais de sobrevivência e estímulos de morte, membros dessa família guardam os “portões” mitocondriais, controlando a liberação de fatores apoptóticos e a subsequente ativação de caspases efetoras. A regulação da atividade dessas proteínas envolve principalmente a ação coordenada de quinases e fosfatases como MAPKs e serina/treonina fosfatases (PP1 e PP2A), respectivamente.

A ação de PP2A na regulação do processo apoptótico também ocorre através da regulação negativa de vias de sinalização relacionadas a estímulos de sobrevivência. A via de sinalização da proteína quinase ativada por mitógeno ERK está relacionada a estímulos de proliferação e sobrevivência celulares sendo, também, conhecida sua ação inibitória de apoptose mediada por citocinas como Fas, TNF α , e TRAIL. PP2A regula negativamente a via de sinalização MEK/ERK

desfosforilando e inativando MEK e ERK e, portanto, estimulando o processo apoptótico (Chiang *et al.*, 2003).

Outra proteína alvo da ação pró-apoptótica de PP2A é a serina treonina quinase PKB, mediadora chave da sobrevivência celular. Quando ativa, PKB fosforila proteínas envolvidas na cascata apoptótica e regula a expressão de várias proteínas relacionadas ao mecanismo de morte celular. Entre os alvos apoptóticos de PKB encontram-se as proteínas Bad, Bid, IKK α e caspase 9, entre outras (Song *et al.*, 2005). A fosforilação de Bad leva ao seu seqüestro no citosol por proteínas 14-3-3 e à conseqüente inativação de sua atividade pró-apoptótica. Bid, outro membro pró-apoptótico da família Bcl-2 relacionado à apoptose estimulada por Fas, quando fosforilado por PKB, torna-se inacessível para ser clivado e ativado pela caspase 8. Além de regular a fosforilação e disponibilidade dos substratos de caspases, PKB também age diretamente sobre a caspase 9, fosforilando Ser-196 e inibindo sua atividade. Por fim, PKB fosforila e ativa IKK α , quinase que regula a atividade I κ B (proteína inibitória de NF κ B) e leva à translocação nuclear e ativação do fator nuclear NF κ B, relacionado à transcrição de uma variedade de fatores de sobrevivência (Kimpinski *et al.*, 1999; Cross *et al.*, 2000; Allen and Tresini, 2000; Klumpp and Krieglstein, 2002; Haddad, 2004).

A atividade de PKB é regulada negativamente pela ação da caspase 3 que cliva e inativa a enzima. PKB também pode ser inativada pela ação indireta da caspase 3 que cliva a subunidade regulatória A α de PP2A, levando ao aumento de sua atividade e à dramática mudança no estado de fosforilação da célula. PP2A é a principal fosfatase que desfosforila e inativa PKB, além de controlar o “status” de fosforilação de substratos de caspases, como exemplificado pelo caso da proteína Bid (Van Hoof and Goris, 2003; Klumpp and Krieglstein, 2002).

O conhecimento das atuações de PP2A no processo apoptótico e vários trabalhos mostrando sua atuação como inibidora da proliferação celular contribuíram para a hipótese de que PP2A agiria

como uma verdadeira proteína supressora de tumor e que sua regulação poderia ser alvo de intervenção terapêutica. Contudo, essa visão deve ser refinada pois, como já mencionado, existem vários tipos de holoenzimas de PP2A com funções e locais de atuação diferentes. Assim, ao mesmo tempo em que vários trabalhos mostram a ação supressora de tumor de PP2A, outros demonstram sua ação como fator estimulador de crescimento e sobrevivência celulares, resultados que indicam participação de holoenzimas diferentes em cada processo (Hahn, 2004; Janssens, 2005).

1.5. Proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs)

As células são continuamente expostas a uma variedade de estímulos e estresses ambientais, o que requer que detenham a capacidade de integrar sinais externos e internos e “decidir”, com base no tipo e intensidade de estresse, seu próprio destino. Essas decisões são feitas através de uma variedade de vias sinalizadoras usadas para a transmissão de sinais da superfície celular para o citoplasma e núcleo a fim de obter uma resposta celular. Geralmente, essas vias são formadas por múltiplos componentes e funcionam através de etapas de fosforilações seqüenciais controladas por proteínas quinases e fosfatases (Sharrocks *et al.*, 2000; Wada and Penninger, 2004).

Proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) fazem parte da grande família de proteínas serina/treonina quinases da qual também são membros a proteína quinase dependente de AMP cíclico (PKA), proteína quinase B ou Akt (PKB/Akt) e a proteína quinase C (PKC)-(Cano and Mahadevan, 1995; Cross *et al.*, 2000). As MAPKs são enzimas conservadas evolutivamente, únicas em eucariotos, que conectam receptores de superfície celular a alvos regulatórios dentro das células. Através de uma via de sinalização constituída por receptores com atividade tirosina quinase intrínseca e receptores acoplados à proteína G, proteínas adaptadoras e fosforilações seqüenciais de proteínas quinases, as MAPKs respondem a uma variedade de estímulos ambientais, tais como fatores de crescimento ou proliferação, citocinas e estresse químico ou físico, controlando, portanto, eventos tão

distintos quanto sobrevivência, morte, transformação ou adaptações celulares (Haneda *et al.*, 1999; Cross *et al.*, 2000; Nebreda and Porras, 2000; Chang and Karin, 2001; Wada and Penninger, 2004).

A ampla variedade de funções desempenhadas por MAPKs é mediada através da fosforilação de vários substratos, incluindo fosfolipases, fatores de transcrição e tradução, moléculas do ciclo celular, proteínas adaptadoras e proteínas de citoesqueleto, entre outras. MAPKs também catalisam a fosforilação e ativação de várias proteínas quinases denominadas “proteínas quinases ativadas por MAPKs” (MAPKAPKs), entre as quais podemos destacar RSKs (quinases S6 ribossomais), MSKs (mitogen and stress activated kinases), MNKs (MAPK-interacting kinases) e MAPKAPKs 2, 3 e 5 (Wada and Penninger, 2004; Roux and Blenis, 2004).

Dentro da grande família das MAPKs, três grupos têm sido caracterizados em mamíferos: a família das “extracellular signal-regulated kinases” (ERKs), “c-Jun NH₂ terminal kinases” (JNKs) e a família das p38 MAPKs. Uma MAPK adicional denominada ERK5 foi recentemente clonada e caracterizada, sendo candidata a membro de uma nova família de MAPKs (“Big MAPKs”) que também deve incluir ERK7 e ERK8, enzimas cujas funções e vias de ativação ainda não foram bem caracterizadas (Johnson and Lapadat, 2002; Roux and Blenis, 2004; Wada and Penninger, 2004).

Cada família de proteínas MAPKs opera através de cascatas de sinalização caracterizadas por alta especificidade e funcionamento paralelo (Schenk and Snaar-Jagalska, 1999). Embora cada MAPK tenha suas características próprias, um grande número de características é compartilhado por suas vias sinalizadoras. Cada via de sinalização é composta por um conjunto de três quinases conservadas evolutivamente e ativadas em reações seqüenciais, mecanismo que possibilita a amplificação dos sinais e a regulação fina do processo através de “feedback” e “cross-talk” entre vias (Johnson *et al.*, 2005). A MAPK, uma serina/treonina quinase, é ativada por uma MAPK quinase (MAPKK) de especificidade dual que fosforila tanto em serina/treonina quanto em tirosina em um motivo Thr-X-Tyr (onde X é glutamato, prolina ou glicina para ERK, JNK e p38, respectivamente) da MAPK alvo. As MAPKKs, por sua vez, são

fosforiladas e ativadas por MAPK quinase quinases (MAPKKKs) que recebem sinais de receptores da superfície celular ativados por um estímulo ou através de interações com proteínas de ligação a GTP da família de Ras ou Rho e/ou outras quinases (Cowan and Storey, 2003; Torres, 2003; Kolch *et al.*, 2005).

Na ausência de sinais, os constituintes das cascatas de MAPKs retornam ao estado desfosforilado e inativo, sugerindo papel essencial de proteínas fosfatases na regulação de MAPKs. Serina/treonina fosfatases, tirosina fosfatases e fosfatases de especificidade dual têm sido implicadas na regulação dessas vias, destacando-se o papel de MAPK fosfatases (MAPKPs) como MAPKP-1, MAPKP-2, MAPKP-3 e serina treonina fosfatases como PP1 e PP2A (Haneda *et al.*, 1999; Tamura *et al.*, 2002).

A via das ERKs geralmente está relacionada ao crescimento celular, diferenciação e sinais de sobrevivência (Kolch *et al.*, 2005), enquanto as MAPKs das famílias JNK e p38 relacionam-se primariamente com sinais pró-apoptóticos e inibidores do crescimento, também participando de respostas pró-inflamatórias. Contudo, a ativação de MAPKs específicas e as conseqüências no destino celular não podem ser analisadas de uma maneira simplificada, como exposto acima. Em geral, a resposta celular à ativação de uma determinada MAPK dependerá de um conjunto de fatores que envolvem o tipo celular, a intensidade, amplitude e tempo de estímulo até a integração do novo estímulo frente às vias sinalizadoras previamente ativas (Kolch *et al.*, 2005). Logo, o que determinará a ativação de uma MAPK e sua ação intracelular será um somatório de fatores justificando, assim, dados da literatura que mostram casos nos quais p38 MAPKs e JNKs também parecem estar envolvidas com estímulos anti-apoptóticos, de proliferação e sobrevivência celulares (Liu and Lin, 2005).

As diversas funções das MAPKs regulam a trajetória do desenvolvimento celular e, como descrito, podem tanto controlar a sobrevivência, transformação ou morte celular. Quando o delicado balanço entre ciclo celular, proliferação, diferenciação e apoptose é desregulado por fatores ambientais e/ou genéticos, podem ocorrer transformações malignas, gênese de doenças neurodegenerativas e

outras condições patológicas onde, geralmente, cascatas sinalizadoras de MAPKs encontram-se desreguladas (Johnson *et al.*, 2005).

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

2. OBJETIVOS

O câncer é considerado a principal causa de morte no mundo, tendo sido responsável por 13% (7,6 milhões) do total de mortes ocorridas no ano de 2005. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde, o número de mortes em decorrência da doença tende a continuar aumentando ao longo do tempo sendo esperados 9 milhões de mortes em 2015 e 11,4 milhões em 2030. No Brasil, estimativas do INCA para o ano de 2006 apontam uma incidência de 472.050 novos casos de câncer, sendo que os mais incidentes, à exceção de pele não melanoma, serão os de próstata e pulmão no sexo masculino e mama e colo do útero no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada no mundo.

No mundo todo, o câncer de próstata é o mais prevalente entre homens representando 15,3% de todos os casos incidentes de câncer em países desenvolvidos e 4,3% dos casos em países em desenvolvimento. No Brasil o número de casos novos de câncer de próstata estimados para 2006 é de 47.280, correspondendo a um número estimado de 51 casos novos a cada 100 mil homens. Embora o câncer prostático seja considerado tipo tumoral de bom prognóstico, a detecção da doença em estágios mais avançados ou metastáticos é responsável direta pelas altas taxas de mortalidade em decorrência da neoplasia. Nesses casos, embora a terapia hormonal (universalmente aceita como tratamento inicial) produza bons resultados na maioria dos pacientes, um grande número das pessoas tratadas sofre recidiva da doença numa etapa em que o tumor freqüentemente se torna de difícil tratamento em decorrência da aquisição de resistência à manipulação hormonal.

Assim como nos casos avançados de tumores prostáticos, a aquisição de resistência frente aos tratamentos antitumorais convencionais constitui o principal obstáculo no tratamento das leucemias, que somente no Brasil têm uma taxa de incidência estimada de 9.550 novos casos para o ano de 2006, atingindo principalmente crianças onde demonstra ser o câncer infantil de maior prevalência.

Desta forma, a elucidação dos mecanismos que conferem resistência às células tumorais a fármacos com diferentes alvos e estruturas químicas, “multidrug resistance” (MDR), a determinação de alvos moleculares e a busca por potenciais agentes antitumorais e terapias mais eficazes para o tratamento do câncer, têm sido as principais metas dos pesquisadores nos últimos 35 anos. O presente trabalho visa à avaliação do potencial antitumoral de dois compostos naturais, riboflavina e fisetin, constituindo também uma tentativa de contribuição para o maior conhecimento molecular do ambiente intracelular de tumores prostáticos e leucemias e identificação de potenciais alvos terapêuticos para o combate dessas malignidades. Para isso, foram estabelecidos os seguintes objetivos:

- 1) Avaliar o potencial citotóxico e antiproliferativo da riboflavina e fisetin sobre células HL60 e PC3;
- 2) Determinar o mecanismo molecular de ação da riboflavina e fisetin nos modelos tumorais estudados, identificando possíveis candidatos a alvos terapêuticos;
- 3) Identificar alvos moleculares específicos relacionados à proliferação, resistência e capacidade metastática nos modelos tumorais prostático e leucêmico.

3. CAPÍTULO 1

RIBOFLAVINA: UMA VITAMINA MULTIFUNCIONAL

Ana Carolina Santos de Souza, Carmen Veríssima Ferreira, Marilena Bezerra Jucá e Hiroshi Aoyama*

Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, CP 6109, 13083-970 Campinas - SP

Alexandre D. Martins Cavagis e Maikel P. Peppelenbosch

Department of Cell Biology, University of Groningen, Antonius Deusinglaan 1, NL-9713 AV, Groningen, The Netherlands

Recebido em 17/8/04; aceito em 5/11/04; publicado na web em 13/4/05

RIBOFLAVIN: A MULTIFUNCTIONAL VITAMIN. Riboflavin, a component of the B₂ vitaminic complex, plays important roles in biochemistry, especially in redox reactions, due to the ability to participate in both one- and two-electron transfers as well as acting as a photosensitizer. Accordingly, low intakes of this vitamin have been associated with different diseases, including cancer and cardiovascular diseases. Riboflavin is thought to contribute to oxidative stress through its capacity to produce superoxide but, interestingly, it can also promote the reduction of hydroperoxides. This peculiar and multifunctional behavior allows riboflavin to take part in various biochemical pathways as a nucleophile and an electrophile, turning it into a versatile and important biological compound.

Keywords: riboflavin; electron transfer; oxidative stress.

INTRODUÇÃO

A riboflavina foi isolada (apesar de não purificada) pela primeira vez em 1879 pelo químico inglês A. Wynter Blyth. Em seus estudos relacionados à composição do leite de vaca ele relatara a identificação de um pigmento amarelo brilhante que chamou de "lactocromo" e que hoje nós conhecemos como sendo a riboflavina. Depois desse anúncio, quase cinquenta anos se passaram até que algum avanço significativo ocorresse com o recém descoberto pigmento amarelo-laranja. Então, ao final dos anos 20 e início da década de 30 do século XX, uma grande evolução científica aconteceu e pigmentos amarelos semelhantes com um brilho esverdeado fluorescente foram isolados de uma ampla variedade de fontes¹. O interesse por eles tornou-se ainda maior quando o tal pigmento amarelo foi reconhecido como sendo um constituinte da vitamina do complexo B, sendo a purificação da própria vitamina amplamente facilitada uma vez que se percebeu que o potencial vitamínico estava intimamente correlacionado à fluorescência da riboflavina. Alguns dos principais químicos da época como Richard Kuhn, em Heidelberg, e Paul Karrer, em Zurich, entraram em uma corrida acirrada para determinar a estrutura, bem como para prová-la através de síntese química, sendo que ambos obtiveram sucesso neste intento quase que concomitantemente. Vários nomes foram propostos para o então caracterizado composto, tais como lactoflavina e ovoflavina a fim de estabelecer correlação com a fonte através da qual o composto havia sido isolado. Mas o prefixo ribo foi consagrado no nome pelo qual conhecemos o composto atualmente, por causa da cadeia ribitol e da cor amarela característica proveniente do sistema π conjugado nos anéis isoaloxazina¹⁻³.

RIBOFLAVINA E SUAS FUNÇÕES BIOLÓGICAS

A riboflavina, 7,8-dimetil-10-ribitol-isoaloxazina, é uma vitamina hidrossolúvel pertencente ao complexo vitamínico B₂, apresenta coloração amarela e é fluorescente. Além do leite que, como

mencionado, foi uma das primeiras fontes de obtenção, a riboflavina é encontrada também em carne, peixe e, principalmente, em vegetais de cor verde-escura⁴. A riboflavina proveniente da dieta encontra-se na forma das coenzimas flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN) ligadas a proteínas; no entanto, quando o bolo alimentar chega ao estômago, o meio ácido propicia a liberação das coenzimas. As coenzimas livres sofrerão a ação das pirofosfatases e fosfatases, presentes no intestino delgado, levando à liberação da riboflavina. Observou-se em nosso laboratório que a riboflavina é um importante produto das reações catalisadas pelas fosfatases ácidas (proteína tirosina fosfatases) de baixa massa molecular relativa, purificadas de rim⁵ e pulmão⁶ bovinos, uma vez que a FMN é um potencial substrato fisiológico destas enzimas. A riboflavina liberada pode ser absorvida por transporte ativo ou facilitado⁶⁻⁸.

A riboflavina é de fundamental importância em organismos aeróbios, sendo precursora de importantes coenzimas participantes da cadeia transportadora de elétrons como a FAD e FMN^{4,7,8}. Também origina muitas das flavinas que se encontram ligadas a diversas enzimas, as quais atuam na catálise de um grande número de importantes reações como, por ex., as relacionadas ao reparo do DNA. A fórmula estrutural da riboflavina é mostrada na Figura 1.

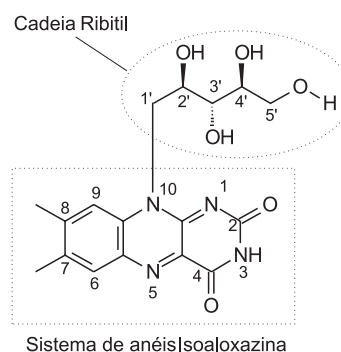


Figura 1. Estrutura da riboflavina (RF). Em destaque, a cadeia ribitol e o sistema de anéis isoaloxazina, que apresenta o sistema π conjugado

*e-mail: aoyama@unicamp.br

O metabolismo de lipídios necessita de derivados da riboflavina, assim como a degradação de drogas e outros compostos químicos exógenos (xenobióticos) via sistema de hidroxilação microsomal. Cofatores de riboflavina são requeridos para o metabolismo do ácido fólico, piridoxina e niacina, além de serem utilizados por enzimas de eritrócitos, como a glutatona redutase que é uma enzima importante pertencente ao sistema de proteção contra as espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas nessas células⁹.

Curiosamente, a riboflavina pode tanto contribuir quanto inibir o estresse oxidativo através da sua dupla habilidade de produzir superóxido e, ao mesmo tempo, poder estar envolvida na redução de hidroperóxidos¹.

Estudos recentes têm correlacionado a riboflavina ao mecanismo de transdução de sinais de células apoptóticas, bem como à regulação do relógio biológico^{1,10}.

Conseqüências da deficiência alimentar

Atualmente, a dose recomendada de ingestão de riboflavina varia desde 0,4 mg (na infância) a 1,3 mg/dia para adultos sendo que, para mulheres grávidas, recomenda-se uma dose suplementar de 0,3 mg/dia durante a gestação e 0,5 mg/dia durante o período de lactação, já que estudos mostram que durante o terceiro trimestre de gestação há uma queda progressiva nos níveis de riboflavina^{11,12}.

Como participa de diversas reações de óxido-redução importantes no metabolismo através dos cofatores FMN e FAD, os quais atuam como carregadores de elétrons, dietas inadequadas de riboflavina poderiam levar a distúrbios no metabolismo intermediário. Em ratos, a deficiência em riboflavina foi associada a uma redução tecido-específica na atividade da succinato oxidoredutase (succinato desidrogenase), efeito este que pode ter implicações na produção de energia através da fosforilação oxidativa. Além disto, a β -oxidação de ácidos graxos também é dependente de flavinas como aceptores de elétrons¹³.

Em animais, estudos demonstraram que a deficiência de riboflavina está relacionada a desenvolvimentos anormais no feto e, em humanos, vários estudos correlacionam a deficiência de riboflavina com quadros hematológicos, principalmente com aqueles relacionados ao sistema hematopoiético. Atualmente, a influência hematológica da deficiência de riboflavina tem sido associada a sua interferência no metabolismo do ferro, já que a mobilização de ferro a partir da proteína intracelular ferritina é um processo redutivo e flavinas reduzidas podem agir reduzindo o ferro da ferritina e, desta maneira, mobilizá-lo em vários tecidos em concentrações fisiologicamente relevantes. Sintomas de neurodegeneração e neuropatia têm sido documentados em vários estudos de dietas deficientes em riboflavina em diferentes espécies, apesar de haver pouca informação com relação à relevância desses resultados em humanos, mas sabe-se que a riboflavina apresenta uma função no metabolismo da tiroxina e sua carência poderia contribuir com a patofisiologia de algumas doenças mentais¹⁴⁻¹⁶.

Pesquisas na área de saúde pública relatam a importância da riboflavina como fator de proteção contra doenças cardiovasculares e processos tumorais. Trabalhos publicados durante as décadas de 70 e 80 indicaram que ela poderia apresentar efeitos protetores contra danos teciduais gerados por oxidação. Devido a sua não toxicidade, a riboflavina é um forte candidato como agente redutor do ferro presente no grupo heme de proteínas, atuando como protetor de danos oxidativos em determinados tecidos. No entanto, o potencial terapêutico desta vitamina neste contexto deve ainda ser amplamente investigado, já que a maioria dos estudos até o presente momento foi realizada em modelos animais⁶.

Com relação à visão, sabe-se que a riboflavina é um compo-

nente normal das lentes do olho humano e que apresenta uma atividade fotossensibilizadora muito forte quando exposta à luz. Desta forma, radiações com comprimentos de onda abaixo de 400 nm levariam a uma excitação luminosa que acarretaria, nessas circunstâncias, danos à visão. Vascularização e opacidade na córnea e até mesmo cataratas têm sido relacionadas em animais alimentados com dietas pobres em riboflavina. Acredita-se que fotorreceptores dependentes de riboflavina (criptocromos) desempenham uma função importante na adaptação ao escuro e, portanto, a dieta de riboflavina poderia influenciar na adaptação ao escuro através desses fotorreceptores por interação com a vitamina A ou de forma independente^{17,18}.

Finalmente, a deficiência de riboflavina pode interferir no metabolismo de outros nutrientes, principalmente no metabolismo de outras vitaminas B, tais como folato, cianocobalamina (vitamina B₁₂) e piridoxina (vitamina B₆)¹³.

RIBOFLAVINA E CÂNCER

A deficiência de riboflavina tem sido correlacionada como um fator de risco para o câncer, embora este fato ainda não esteja satisfatoriamente estabelecido em humanos, sendo que a influência de dietas deficientes em riboflavina na gênese e progressão do câncer tem sido assunto controverso no meio científico onde existem relatos provando, tanto sua ação estimulatória em certos casos, quanto inibitória em outros. Em geral, a deficiência de riboflavina parece estar relacionada à diminuição do desenvolvimento de tumores espontâneos em animais experimentais mas também, paradoxalmente, ao aumento da carcinogênese provocada por certos agentes⁶.

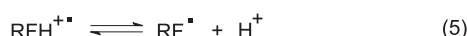
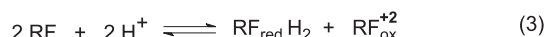
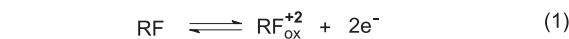
A correlação entre riboflavina e câncer é bastante complexa e pode ser exemplificada nos inúmeros efeitos desta vitamina no metabolismo de drogas. Por ser precursora de flavocoenzimas do sistema microsomal de hidroxilação de drogas, a carência de riboflavina pode retardar a inativação de carcinógenos e, portanto, aumentar sua distribuição aos tecidos susceptíveis. Por outro lado, se a droga tiver menor atividade carcinogênica que seus metabólitos, a deficiência de riboflavina, possivelmente, terá efeito inibitório sobre a carcinogênese. Deve-se lembrar também que o mesmo raciocínio pode ser aplicado em relação aos quimioterápicos em situações nas quais estes podem, não somente ter seu metabolismo afetado pela disponibilidade de cofatores derivados de riboflavina, como também a sua própria disponibilidade e captação celular afetadas, visto que a riboflavina pode complexar-se com certas substâncias e, também, agir como fator regulatório de sua entrada na célula. Drogas antifolato também podem ter efeito influenciado pela disponibilidade de riboflavina, uma vez que cofatores de flavina estão relacionados ao metabolismo do ácido fólico. Tem sido difícil, contudo, obter evidências que suportem ou refutem essas hipóteses e as pesquisas agora mudam seu foco para a obtenção de dados sobre a real disponibilidade de riboflavina nas células neoplásicas. Células neoplásicas parecem perder certos mecanismos que regulam o metabolismo de riboflavina em tecidos normais e caracterizam-se por resistir à deficiência de riboflavina, o que leva à manutenção de altas concentrações de FAD, através de mecanismos ainda não determinados^{9,19,20}.

Durante a década de 1990, uma nova abordagem ao tratamento do câncer foi estudada e, mais uma vez, a riboflavina assumiu um papel de destaque devido a sua característica peculiar de composto fotossensível. Além disso, demonstrou-se que a riboflavina pode apresentar importante função no transporte e liberação controlada de drogas. Este novo aspecto da utilização da riboflavina veio ampliar e consolidar, de maneira significativa, a importância biológica e fisiológica deste composto²¹⁻²⁴.

ALGUMAS PROPRIEDADES QUÍMICAS FUNDAMENTAIS DA RIBOFLAVINA

A riboflavina, bem como as flavinas em geral, apresenta uma característica muito importante para o seu papel biológico que é a capacidade de participar de reações químicas com transferência tanto de dois como também de um elétron, o que implica, neste último caso, a existência de estados de semiquinona¹.

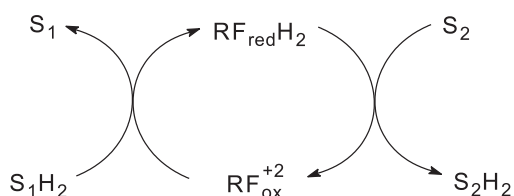
Em soluções aquosas e na ausência de qualquer tipo de enzima, ocorre um equilíbrio entre a forma oxidada e a forma reduzida da riboflavina (auto-redox) sendo que, neste processo, uma certa quantidade de radical é formada:



Esquema 1. Equilíbrios químicos da riboflavina semiquinona. RF = riboflavina; ox = oxidada; red = reduzida

Para maior clareza, apresentamos as semi-reações de oxidação (1) e redução (2) da riboflavina, sendo que a Equação 3 corresponde ao processo global. Os equilíbrios 4 e 5, em soluções aquosas de riboflavina livre da presença de qualquer enzima, são quase que totalmente deslocados para a esquerda. Para se ter uma referência, partindo de uma mistura equimolar de riboflavina oxidada e reduzida, em pH 7,0, apenas 5% de radical é estabilizado. Contudo, é importante ressaltar que a presença de enzimas torna possível uma ampla variedade de estados de oxidação para a riboflavina, uma vez que as energias de ativação de diversas reações redox envolvendo a riboflavina são significativamente reduzidas em sistemas enzimáticos. Essa versatilidade de estados de oxidação permite monitorar eventos que ocorrem em catálise utilizando a riboflavina como um marcador, já que suas reações sempre são caracterizadas por semi-reações, que podem ser acompanhadas separadamente.

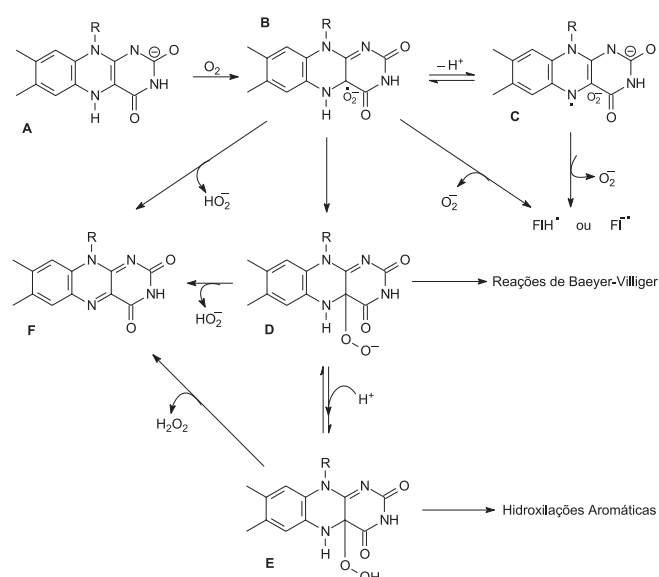
Na maior parte dos casos em que a riboflavina é reduzida, o processo pode ocorrer de duas maneiras distintas. A primeira seria através da transferência de dois elétrons por um substrato (S₁) que é então desidrogenado, gerando uma flavina reduzida, a qual pode ser subsequentemente reoxidada, através de desidrogenação, por outro substrato (S₂), conforme ilustrado no Esquema 2.



Esquema 2. Semi-reações da riboflavina oxidada e reduzida. RF = riboflavina; red = reduzida; ox = oxidada

A segunda maneira é através de transferência de um único elétron, gerando um intermediário semiquinona. Em alguns casos, o oxigênio molecular é o substrato fisiológico mas, devido à reatividade inespecífica do O₂ com flavinas em geral, o estudo de algumas reações deve ser realizado em condições anaeróbicas¹.

O Esquema 3 mostra reações químicas que podem ocorrer entre riboflavina reduzida e oxigênio:



Esquema 3. Reações entre riboflavina reduzida e oxigênio. R = cadeia ribitol

A reação inicial é uma redução de O₂ que se dá através da transferência de um único elétron da flavina reduzida (A), gerando um par radicalar formado pela flavina neutra e ânion superóxido (B). O par radicalar gerado pode, então, seguir várias rotas alternativas como, por ex., levar à formação de uma peroxirriboflavina (D) que é um nucleófilo. Este intermediário pode, por sua vez, ser protonado, gerando um hidroperóxido de características eletrofílicas (E). Além disso, as espécies peroxiconjugadas de riboflavina podem eliminar peróxido de hidrogênio e gerar a riboflavina oxidada (F) ou participar de processos oxidativos, como hidroxilações aromáticas ou reações de Baeyer-Villiger que são oxidações de substratos que possuem grupamentos cetônicos e aldeídos para, respectivamente, ésteres e ácidos carboxílicos. Uma outra possibilidade é a dissociação do par radicalar (B) gerando o radical de riboflavina e o radical superóxido, o qual pode reagir com peróxido para formar radical hidroxil ou com óxido nítrico para formar peroxinitrito. Acredita-se que o radical hidroxil seja um dos principais responsáveis por estresse oxidativo e danos teciduais, em grande parte através da reação com lipídios que levam à produção de hidroperoxilipídios. Além disso, trabalhos recentes têm sugerido que o peroxinitrito é um agente importante no processo de apoptose^{1,25}.

Riboflavina: um fotossensibilizador biológico eficiente

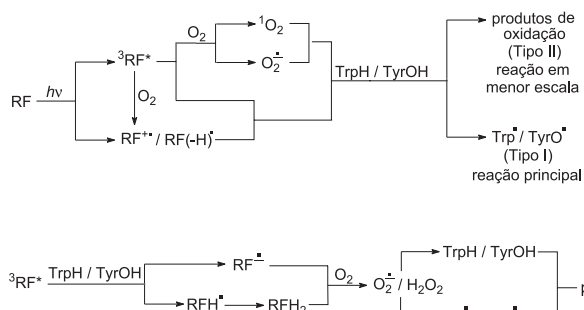
Como já comentado, a riboflavina desempenha um importante papel biológico como sensibilizador fotoquímico. Apresenta, como característica, sensibilidade à radiação UV e visível^{26,27} sendo que, ao absorver luz, alcança o estado triplete excitado que pode tanto interagir com o oxigênio molecular gerando oxigênio singlete (chamado de mecanismo tipo II) ou agir diretamente sobre um substrato levando à fotoxidação deste e à conseqüente geração de radicais intermediários (mecanismo tipo I), além de espécies reativas de oxigênio, tais como ânion superóxido, radical hidroxil e peróxido de hidrogênio^{20,28}. Essa capacidade pode ser útil ao organismo como no caso de enzimas que necessitam de luz visível para o desempenho de suas atividades catalíticas, tais como enzimas participantes do processo de fotossíntese e enzimas de reparo do DNA, DNA

liases, cujos grupos prostéticos atuam como substratos para o triplete excitado de riboflavina²⁹.

A capacidade fotossensibilizadora da riboflavina em sistemas biológicos está relacionada ao alto potencial redox de sua forma triplete ativada. Embora o potencial redox da riboflavina seja $-0,3$ V, em pH 7,0³⁰, sua irradiação e ativação ao estado triplete eleva o potencial redox a 1,7 V que é bem maior que o potencial redox de importantes biomoléculas como aminoácidos, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos que, desta forma, podem sofrer fotodegradação em presença de riboflavina^{31,32}. Desta maneira, após a excitação, a transferência de elétrons dos aminoácidos mencionados para formar os respectivos radicais e, conseqüentemente, gerar a riboflavina reduzida acaba sendo termodinamicamente favorecida.

A riboflavina irradiada reage com os aminoácidos triptofano (TrpH), tirosina (TyrOH) e, em menor extensão, com fenilalanina (PheH) [neste texto, a fim de tornar mais claras as indicações em reações químicas, utilizaremos uma abreviatura para os aminoácidos diferente do padrão internacional de uma ou três letras]. Como resultado da fotoxidação dos aminoácidos mencionados, formam-se espécies reativas de oxigênio e outros fotoprodutos tóxicos para as células. Nas proteínas, resíduos de triptofano (TrpH) e tirosina (TyrOH) apresentam potenciais redox de 1,5 e 0,93 V, respectivamente, que os tornam substratos susceptíveis às reações de fotoxidação em presença de riboflavina irradiada^{33,34}. Durante essas reações, além da formação de fotoprodutos, como mencionado, também pode haver formação de fotoadutos entre a flavina excitada e seu substrato, como no caso da reação entre riboflavina e TrpH, na qual se observa o aparecimento de fotoadutos indol-flavina e indol-indol, entre outros³⁵.

O Esquema 4 mostra possíveis reações importantes na fotossensibilização de triptofano e tirosina pela riboflavina:

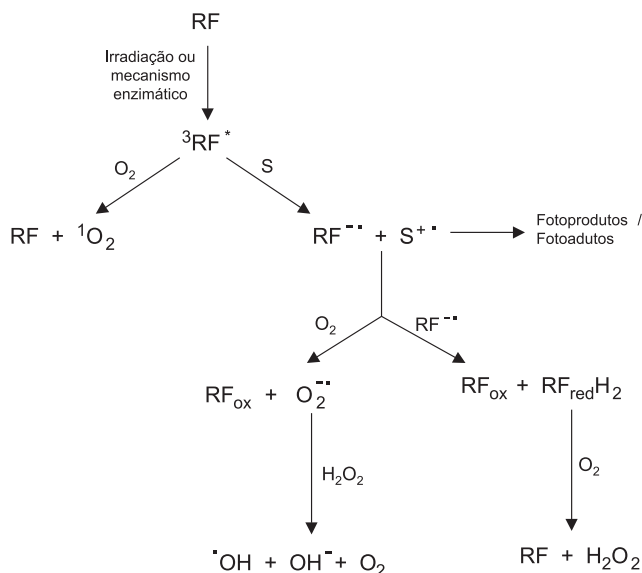


Esquema 4. Possíveis interações importantes para a fotossensibilização de triptofano e tirosina pela riboflavina atuando como fotossensibilizador

A presença de TrpH e riboflavina tem sido correlacionada a disfunções hepáticas produzidas por nutrição parenteral³⁶ e os fotoprodutos da reação têm mostrado exercer efeitos letais em culturas de células animais^{35,37}.

Vários estudos têm revelado que a irradiação de células tumorais com luz visível em presença de riboflavina induz a morte celular. Quando células F9 de teratocarcinoma e NSO/2 murinas foram irradiadas em meio de cultura enriquecido com TrpH e riboflavina, alterações morfológicas similares às descritas para células apoptóticas foram observadas. O efeito citotóxico foi atribuído à formação de espécies reativas de oxigênio tais como ânion superóxido e oxigênio singlete, gerados através de um mecanismo relativamente complexo (Esquema 5), misto dos mecanismos tipo I e tipo II^{17,22}. Além da produção de ROS, também constatou-se a formação de outros fotoprodutos citotóxicos originados de reações en-

volvendo o radical ânion de riboflavina e radical cátion indol do TrpH. Tais fotoprodutos constituem-se, basicamente, de formas agregadas de riboflavina, produtos indólicos associadas a flavinas, produtos indólicos com peso molecular maior que o do TrpH, bem como outros produtos da fotodecomposição deste aminoácido²⁸.



Esquema 5. Misto de mecanismos tipo I e tipo II em presença de oxigênio molecular (S representa um composto alvo da riboflavina irradiada)

Os efeitos da riboflavina irradiada em presença de TrpH também são observados em culturas de células não irradiadas, as quais não sofrem os efeitos deletérios das espécies reativas de oxigênio transientes formadas durante a irradiação do meio. Tais efeitos são atribuídos aos demais fotoprodutos gerados, cujas citotoxicidades são ainda mais evidentes em experimentos realizados em atmosfera anaeróbica, em que predomina o mecanismo de reação tipo I^{22,38}. Fotoprodutos derivados do ácido 3-indolacético irradiado em presença de riboflavina demonstraram causar severos danos em cultura de células humanas HL60 e células tumorais murinas NOS/2³⁷. Tais efeitos foram mais acentuados que os anteriormente descritos para os fotoprodutos do triptofano, além de aumentarem de acordo com a elevação da concentração dos fotoprodutos²². Com base em estudos de microscopia eletrônica e análises de citometria de fluxo, demonstrou-se que tais fotoprodutos induzem morte celular por mecanismo apoptótico. Postula-se que o mecanismo de ativação apoptótica esteja relacionado à atuação dos fotoprodutos I₃A-RF como ligantes sinalizadores de morte, agindo na superfície celular. Tal afirmação baseia-se no fato de que uma certa quantidade de riboflavina adicionada ao meio é incorporada pela célula, comportamento que, analogamente, também pode ser atribuído aos fotoprodutos.

Outro aspecto importante na atuação da riboflavina é sua capacidade de gerar efeitos citotóxicos mesmo quando não exposta à irradiação. O estado excitado de flavina triplete também pode ser alcançado em ausência de luz por um mecanismo enzimático mediado por peroxidases³⁹, o que explica a ocorrência de efeitos citotóxicos promovidos pela riboflavina não irradiada²².

Atualmente, a riboflavina e outras substâncias com capacidade fotossensibilizadora têm sido alvos de estudos na área de tratamentos e prevenção de doenças com emprego de luz. Na área oncológica, destaca-se o estudo da chamada Terapia Fotodinâmica, uma forma de fotoquimioterapia onde uma substância fotossensibilizadora é acumulada em um tecido tumoral especificamente ilu-

minado e, subsequentemente, destruído²². Além disso, trabalhos recentes têm demonstrado, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, a iniciação de apoptose induzida por Terapia Fotodinâmica⁴⁰⁻⁴².

AGRADECIMENTOS

À FAPESP pela Bolsa de Doutorado à A. C. S. de Souza (Proc. no. 2002/12539-7), e de Pós-Doutorado no Exterior à C. V. Ferreira (Proc. no. 2002/03842-8).

Os autores são gratos também ao Prof. Dr. J. de A. Simoni, do Instituto de Química da UNICAMP, pelas orientações durante a revisão final.

REFERÊNCIAS

- Massey, V.; *Biochem. Soc. Trans.* **2000**, *28*, 283.
- Kuhn, R.; Reinemund, K.; Weygand, F.; *Ber.* **1934**, *67*, 1460.
- Karrer, P.; Schopp, K.; Benz, F.; *Helv. Chim. Acta* **1935**, *18*, 426.
- Powers, J. H.; *Am. J. Nutr.* **2003**, *77*, 1352.
- Granjeiro, J. M.; Ferreira, C. V.; Jucá, M. B.; Taga, E. M.; Aoyama, H.; *Biochem. Mol. Biol. Int.* **1997**, *41*, 1201.
- Buzalaf, M. A. R.; Taga, E. M.; Granjeiro, J. M.; Ferreira, C. V.; Lourenção, V. A.; Ortega, M. M.; Poletto, D. W.; Aoyama, H.; *Exp. Lung Res.* **1998**, *24*, 269.
- Edwards, A. M.; Bueno, C.; Saldaño, A.; Silva, E.; Kassab, K.; Polo, L.; Jori, G.; *J. Photochem. Photobiol., B* **1999**, *48*, 36.
- Merrill, A. H.; Lambeth, J. D.; Edmondson, D. E.; McCornick, D. B.; *Annu. Rev. Nutr.* **1981**, *1*, 281.
- Rivlin, R. S.; Shils, M. E.; Sherlock, P.; *Am. J. Med.* **1983**, *75*, 843.
- Souza, A. C. S., comunicação pessoal.
- World Health Organization; *WHO handbook on human nutritional requirements*, 1974, Monograph series 61, Geneva.
- EC Scientific Committee for Food Report; *Nutrient and energy intakes for the European Community*, Luxembourg, Directorate-General, Industry, 1993, 31st series.
- McCornick, D. B.; Innis, W. S. A.; Merrill, A. H. Jr; Browers-Komro, D. M.; Oka, M.; Chastain, J. L. Em *Flavin and Flavoproteins*; Edmondson, D. E.; McCornick, D. B., eds; Walter de Gruyter: New York, 1988, p. 459-471.
- Decker, K.; Dotis, B.; Glatzle, D.; Hinselmann, M.; *Nutr. Metab.* **1977**, *21*, 17.
- Buzina, R.; Jusic, M.; Milanovic, N.; Sapurnar, J.; Brubacher, G.; *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **1979**, *49*, 136.
- Powers, H. J.; Bates, C. J.; Prentice, A. M.; Lamb, W. H.; Jepson, M.; Bowman, H.; *Hum. Nutr. Clin. Nutr.* **1983**, *37C*, 413.
- Mancini, M.; Edwards, A. M.; Becker, M. I.; De Ioannes, A.; Silva, E.; *J. Photochem. Photobiol., B* **2000**, *55*, 9.
- Takami, Y.; Gong, H. Q.; Amemiya, T.; *Ophthalmic Res.* **2004**, *36*, 156.
- Rivlin, R. S.; *Cancer Res.* **1973**, *33*, 1977.
- Edwards, A. M.; Silva, E.; *J. Photochem. Photobiol., B* **2001**, *63*, 126.
- Holladay, S. R.; Yang, Z.; Kennedy, M. D.; Leamon, C. P.; Lee, R. J.; Jayamani, L. M.; Mason, T.; Low, P. S.; *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1426*, 195.
- Edwards, A. M.; Silva, E.; Jofré, B.; Becker, M. I.; De Ioannes, A. E.; *J. Photochem. Photobiol., B* **1994**, *24*, 179.
- Silva, E.; Fürst, S.; Edwards, A. M.; Becker, M. I.; De Ioannes, A. E.; *Photochem. Photobiol.* **1995**, *62*, 1041.
- Agarwal, M. L.; Clay, M. E.; Harvey, E. J.; Evans, H. H.; Antúnez, A. R.; Oleinick, N. L.; *Cancer Res.* **1991**, *51*, 5993.
- Wyllie, A. H.; Kerr, J. F. R.; Curie, A. R.; *Int. Rev. Cytol.* **1980**, *68*, 251.
- La Rochette, A.; Silva, E.; Birlouez-Aragon, I.; Mancini, M.; Edwards, A. M.; Morlière, P.; *Photochem. Photobiol.* **2000**, *76*, 815.
- Ahmad, I.; Fasihullah, Q.; Vaid, F. H. M.; *J. Photochem. Photobiol., B* **2004**, *75*, 13.
- Silva, E.; Ugarte, R.; Andrarde, A.; Edwards, A. M.; *J. Photochem. Photobiol., B* **1994**, *23*, 43.
- Sancar, G. B.; *Mutat. Res.* **2000**, *451*, 25.
- Meisel, D.; Neta, P.; *J. Phys. Chem.* **1975**, *79*, 2459.
- Joshi, P. C.; *Toxicol. Lett.* **1985**, *26*, 211.
- Suzuki, Y.; Miura, T.; Ogiso, T.; *Pharmacobiodynamics* **1982**, *5*, 568
- Harriman, A.; *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 6102
- Yoshimura, A.; Ohno, T.; *Photochem. Photobiol.* **1988**, *48*, 561.
- Silva, E.; *J. Photochem. Photobiol., B* **1992**, *14*, 142.
- Vileisis, R. A.; Sorensen, K.; González-Crussi, F.; Hunt, C. E.; *J. Pediatr.* **1982**, *100*, 88.
- Nixon, B. T.; Wang, R. J.; *Photochem. Photobiol.* **1977**, *26*, 589.
- Edwards, A. M.; Barredo, F.; Silva, E.; De Ioannes, A. E.; Becker, M. I.; *Photochem. Photobiol.*, **1999**, *70*, 645.
- Rojas, J.; Silva, E.; *Photochem. Photobiol.* **1988**, *47*, 467.
- Zaidi, S. I. A.; Oleinick, N. L.; *Photochem. Photobiol.* **1993**, *58*, 771.
- Luo, Y.; Chang, C. K.; Kessel, D.; *Photochem. Photobiol.* **1996**, *63*, 528.
- He, X. Y.; Sikes, R. A.; Thomsen, S.; Chun, L. W. K.; Jacques, S. L.; *Photochem. Photobiol.* **1994**, *59*, 468.

4. CAPÍTULO 2

A promising action of riboflavin as a mediator of leukaemia cell death

Ana Carolina Santos de Souza · Liudmila Kodach ·
Fernanda R. Gadelha · Carina L. Bos ·
Alexandre D. Martins Cavagis · Hiroshi Aoyama ·
Maikel P. Peppelenbosch · Carmen Veríssima Ferreira

Published online: 21 August 2006
© Springer Science + Business Media, LLC 2006

Abstract Besides having a pivotal biological function as a component of coenzymes, riboflavin appears a promising antitumoral agent, but the underlying molecular mechanism remains unclear. In this work, we demonstrate that irradiated riboflavin, when applied at μM concentrations, induces an orderly sequence of signaling events finally leading to leukemia cell death. The molecular mechanism involved is dependent on the activation of caspase 8 caused by overexpression of Fas and FasL and also on mitochondrial amplification mechanisms, involving the stimulation of ceramide production by sphingomyelinase and ceramide synthase. The activation of this cascade led to an inhibition of mitogen activated protein kinases: JNK, MEK and ERK and survival mediators (PKB and IAP1), upregulation of the proapoptotic Bcl2 member Bax and downregulation of cell cycle progression regulators. Importantly, induction of apoptosis by irradiated riboflavin was leukaemia cell specific, as normal human lymphocytes did not respond to the compound with cell death. Our data indicate that riboflavin selectively activates Fas cascade and also constitutes a death receptor-

engaged drug without harmful side effects in normal cells, bolstering the case for using this compound as a novel avenue for combating cancerous disease.

Keywords Riboflavin · Photosensitizer · Apoptosis · Myeloid leukaemic cells · Signal transduction

Abbreviations

ERK	extracellular signal-regulated kinase
Fas (CD95)	Fas receptor
FasL (CD95L)	Fas ligand
HL60	human myeloid leukemia cell line
IAP1	inhibitory apoptosis protein type 1
JNK	c-jun-NH ₂ -terminal protein kinase
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MEK	MAPK/ERK kinase
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PKB	protein kinase B
PP2A	phosphoprotein phosphatase 2A
RF	riboflavin
STAT	signal transducer and activator of transcription
TNF	tumor necrosis factor
TNFR	tumor necrosis factor receptor
TRAF	receptor-associated factor.

A. C. S. de Souza · F. R. Gadelha · A. D. M. Cavagis ·
H. Aoyama · C. V. Ferreira (✉)
Department of Biochemistry, State University of Campinas,
Brazil
e-mail: carmenv@unicamp.br

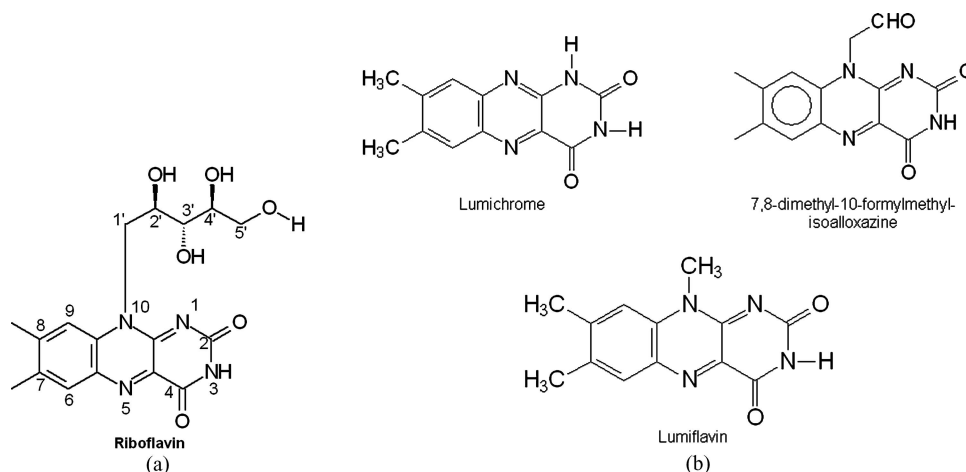
L. Kodach · C. L. Bos
Laboratory of Experimental Internal Medicine, Academic
Medical Center, Meibergdreef 9,
NL-1105 AZ Amsterdam, The Netherlands

M. P. Peppelenbosch
Department of Cell Biology, University Medical Center
Groningen, A. Deusinglaan 1,
NL-9713 AV Groningen, The Netherlands

Introduction

Photodynamic therapy (PDT) is based on the activation of a photosensitizer by illumination with visible or UV light, leading to photochemical tissue destruction. Since 1993 this procedure has been approved for the treatment of several oncological and nononcological disorders worldwide [1]. Nevertheless, the molecular mechanisms by which the

Fig. 1 Chemical structure of riboflavin and its photoproducts



photostimulation of photosensitizers induces cell death remains poorly understood, but are of obvious importance for the development of a new therapy having enhanced specificity for deviant tissue as to non-pathological cells.

Riboflavin (Fig. 1), 7,8-dimethyl-10-ribityl-isoalloxazine, one of the components of the B₂ vitamin complex, is an efficient photosensitizer that has been used in several photodynamic therapy studies [2]. Riboflavin is particularly sensitive to UV and visible light and acts via the generation of singlet oxygen (type II mechanism) or via radical species (type I mechanism), including reactive oxygen species such as the superoxide ion, hydroxyl radical and hydrogen peroxide [3]. Although the reduction potential of riboflavin is -0.3 V at pH 7.0, the redox potential of the excited triplet flavin can be shifted to 1.7 V [4] which is higher than the redox potential of important biomolecules such as amino acids, proteins, lipids and nucleic acids which can undergo photodegradation in the presence of riboflavin.

Recently, important advances on the effects of radiation on riboflavin chemistry have been achieved [5–7], demonstrating that this flavin is degraded through a variety of reactions including photolysis (intramolecular photoreduction) and photoaddition (intramolecular photoaddition) as major reactions. The photodegradation of riboflavin in aqueous solutions results in a number of products such as 7, 8-dimethyl-10-(formylmethyl) isoalloxazine, lumichrome and lumiflavin (Fig. 1). Additionally, near UV light and daylight fluorescent light irradiated riboflavin produces lethal effects on mammalian cells in culture and this cytotoxicity has been attributed to products of the riboflavin-sensitized photooxidation of Trp and/or Tyr such as a complex mixture of indolic, flavinic and indolic-flavin type aggregates (photoadducts) [8, 9]. The biological effects following these reactions are, however, much less clear. It has been suggested that irradiated-riboflavin induced formation of reactive oxygen species and stable photoproducts that lead to cell death,

although clear cut evidence is lacking [2, 5, 9, 10]. These considerations prompted us to investigate the effects of irradiated riboflavin on HL60 cells. In the present work we demonstrate that irradiated riboflavin induces Fas and FasL overexpression followed by activation of caspase 8, modulation of JNK, protein phosphatase and ceramide production. Irradiated riboflavin effects on leukaemia cell apoptosis were critically dependent on these events. Taken together, our results outline a molecular framework for riboflavin-mediated apoptosis.

Materials and methods

Cell line and reagents

HL60 cells were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). Polyclonal antibodies against, antiphospho-p38 mitogen-activated protein kinase p38, antiphospho-p42/44 (ERK1/2), antiphospho-c-jun-NH₂-terminal protein kinase (JNK), antiphospho-MAPK/ERK Kinase 1/2 (MEK1/2), antiphospho-PKB, cleaved caspase 8, antirabbit and antimouse peroxidase-conjugated antibodies were purchased from Cell Signalling Technology (Beverly, MA). Antibodies against phospho-PP2A, phosphotyrosine, phosphothreonine, p21, proliferating cell nuclear antigen (PCNA), signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) and 2 (STAT2), receptor-associated factor 1 (TRAF1) and 2 (TRAF2), Bcl2, Bax, TNF receptor 1 (TNFR1), TNF- α receptor-associated death domain (TRADD) and inhibitory apoptosis protein type 1 (IAP1) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Other antibodies used were anti-Fas receptor (Fas), anti-Fas ligand (FasL)—(BD Biosciences, San Diego, CA); Fas neutralizing antibody was from Upstate Biotechnology, Inc. (Lake Placid, NY).

Riboflavin, Safranin O, Succinate, Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) and Fumonisin B1 were from Sigma. Amplex Red Sphingomyelinase assay kit (Molecular Probes Inc., Eugene, OP#A-12220). Caspase 3 and Caspase 9 Colorimetric Assay Kits were obtained from R&D Systems (Minneapolis).

Cell culture

HL60 cells were routinely grown in suspension in RPMI 1640 medium supplemented with 2 mM glutamine, 100 IU/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin and 10% heat-inactivated fetal bovine serum, at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. In all experiments, 7×10^5 cells/ml were treated for 24 h with different concentrations of irradiated riboflavin.

Irradiation of riboflavin and treatment of HL60 cells

Solutions of riboflavin (25, 50, 75, 100, 150, 200 and 250 μ M) were diluted in RPMI 1640 culture medium and irradiated with UV light for 15 min. Afterwards, a suspension of 7×10^5 cells/ml was added to the samples so that the following final concentrations of riboflavin: 5, 10, 15, 20, 30, 40 and 50 μ M were reached. The cells were also pre-treated with 25 μ M fumonisin B1 or anti-Fas 10 μ g/mL for 1 h and then, treated with riboflavin. Cell viability was assessed by trypan blue dye exclusion and MTT reduction assays.

MTT reduction assay

The medium containing irradiated riboflavin was removed and 1.0 ml of MTT solution (0.5 mg MTT/ml of culture medium) was added to each well. After incubation for 4 h at 37°C, the medium was removed and the formazan released by solubilisation in 1.0 ml of ethanol. The plate was shaken for 5 min on a plate shaker and the absorbance measured at 570 nm [11, 12].

Mitochondrial membrane potential determination ($\Delta\Psi$)

Mitochondrial $\Delta\Psi$ was estimated through fluorescence changes of Safranin O [13], on a Hitachi F4500 spectrofluorometer with excitation and emission wavelengths of, respectively, 495 and 586 nm, with 2.5 nm slit. After treatment with different concentrations of irradiated riboflavin for 24 h, 3×10^6 cells/ml (viable cells as detected by trypan blue exclusion) were incubated in 125 mM sucrose, 65 mM KCl, 2 mM potassium phosphate, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, pH 7.2, 1 mM EGTA, 1 mg/ml serum albumin bovine, 5 mM succinate and 5 μ M safranin O. Additions of Digitonin (17 μ M) and CCCP (1 μ M) are depicted at the graphics.

Determination of sphingomyelinase activity

Cells were treated with irradiated riboflavin and the sphingomyelinase activity was determined using Amplex Red Sphingomyelinase assay kit. In this enzyme-coupled assay, SMase activity was monitored indirectly using 10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (Amplex Red reagent), a sensitive fluorogenic probe for H₂O₂. The fluorescence intensity was read with a fluorescence microplate reader. The activity of acid SMase was determined at pH 5.5.

Western blotting analysis

Cells (3×10^7) were lysed in 200 μ L of lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1% Tween 20, 0.25% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF and protease inhibitors (1 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/ml leupeptin, and 1 mM 4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl-fluorid-hydrochloride)] for 2 h in ice. Protein extracts were cleared by centrifugation and protein concentrations were determined using the Lowry method [14]. An equal volume of 2X sodium dodecyl sulphide (SDS) gel loading buffer [100 mM Tris-HCl (pH 6.8), 200 mM DTT, 4% SDS, 0.1% bromophenol blue and 20% glycerol] was added to samples which were subsequently boiled for 10 min. Cell extracts, corresponding to 3×10^5 cells, were resolved by SDS-polyacrylamide gel (12%) electrophoresis (PAGE) and transferred to PVDF membranes. Membranes were blocked in 1% fat-free dried milk or bovine serum albumin (2%) in Tris-buffered saline (TBS)-Tween 20 (0.05%) and incubated overnight at 4°C with appropriate primary antibody at 1:1000 dilution. After washing in TBS-Tween 20 (0.05%), membranes were incubated with antirabbit or antimouse horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies, at 1:2000 dilutions (in all Western blotting assays), in blocking buffer for 1 h. The detection was made using enhanced chemiluminescence (ECL).

Caspases 3 and 9 activity assays

Caspase activities were determined by the measurement at 405 nm of *p*-nitroaniline released from the cleavage of caspase 3 (Ac-DEVD-*p*NA) and caspase 9 (LEHD-*p*NA) substrates. The enzyme activities were expressed in pmol/min and the extinction coefficient of *p*NA was 10,000 M⁻¹ cm⁻¹.

Annexin V and 7-amino-actinomycin D Assays

Control and riboflavin-treated cells were collected and re-suspended in 1X binding buffer (0.01 M HEPES/NaOH, pH 7.4, 0.14 mM NaCl and 2.5 mM CaCl₂) at the concentration of 1×10^6 cells/ml. Subsequently, 100 μ l of cell suspension were transferred to a 5 ml tube and Annexin V FITC (5 μ l)

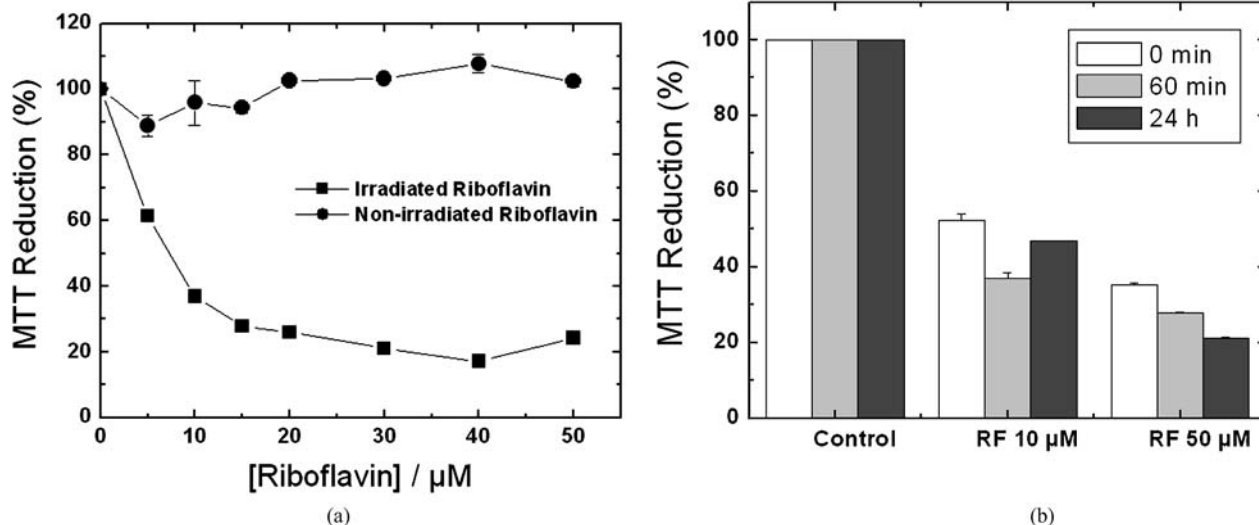


Fig. 2 Irradiated riboflavin induces toxic effects in HL60 cells. (A) Cells were treated with different concentrations of irradiated and non-irradiated riboflavin in RPMI medium. (B) The effect of photoproducts was also evaluated after 1 h and 24 h after irradiation for 15 min.

and 7-amino-actinomycin D (7-AAD) - (10 μl) were added. The cells were incubated at room temperature for 15 min, after which 400 μl of 1X binding buffer were added and apoptosis assessed by flow cytometry.

Statistical analysis

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

Results

Irradiated riboflavin but not non-irradiated riboflavin affects HL60 cells viability

HL60 cells were treated with non and irradiated riboflavin in concentrations up to 50 μM . Cell viability was not affected by non-irradiated riboflavin (Fig. 2(A)), while irradiated riboflavin had a strong cytotoxic effect with an IC_{50} value of 10 μM (Fig. 2(A)).

Additionally, the effect of irradiated riboflavin was evaluated 1 h and 24 h after its irradiation. The results showed that the cytotoxic profile remained the same, indicating that the anti-proliferative activity of the irradiated com-

pound is related to the formation of stable photoproducts (Fig. 2(B)).

Mitochondrial membrane potential was determined in these cells after treatment for 24 h with different concentrations of irradiated riboflavin (Fig. 3). Although no significant

changes were observed in the mitochondrial membrane potential after treatment with irradiated riboflavin, the results showed that the cytotoxic profile remained the same, indicating that the anti-proliferative activity of the irradiated com-

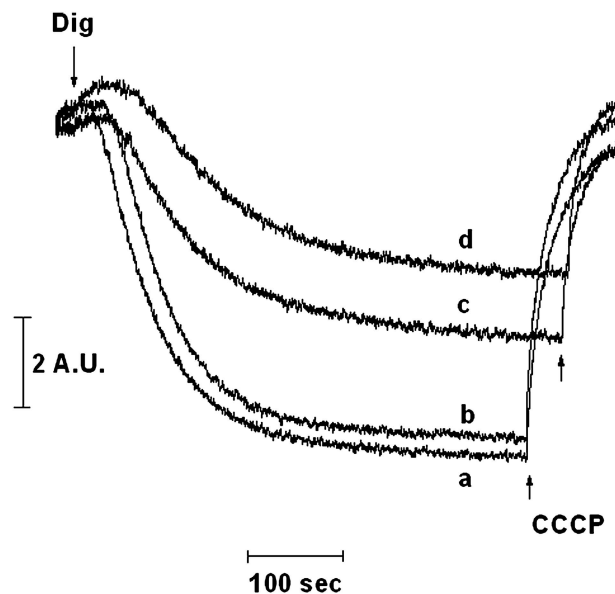


Fig. 3 Irradiated riboflavin decreases mitochondrial membrane potential. Cells (3×10^6 cells/ml) were added to a reaction media containing 125 mM sucrose, 65 mM KCl, 2 mM potassium phosphate, 1 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES, pH 7.2, 1 mM EGTA, 1 mg/ml serum albumin bovine, 5 mM succinate and 5 μM safranin O. Digitonin (17 μM) and CCCP (1 μM) were added to all traces where indicated by the arrows. Traces: (a) control and cells treated with irradiated riboflavin at: (b) 5 μM , (c) 10 μM and (d) 50 μM . The results shown are representative of three experiments

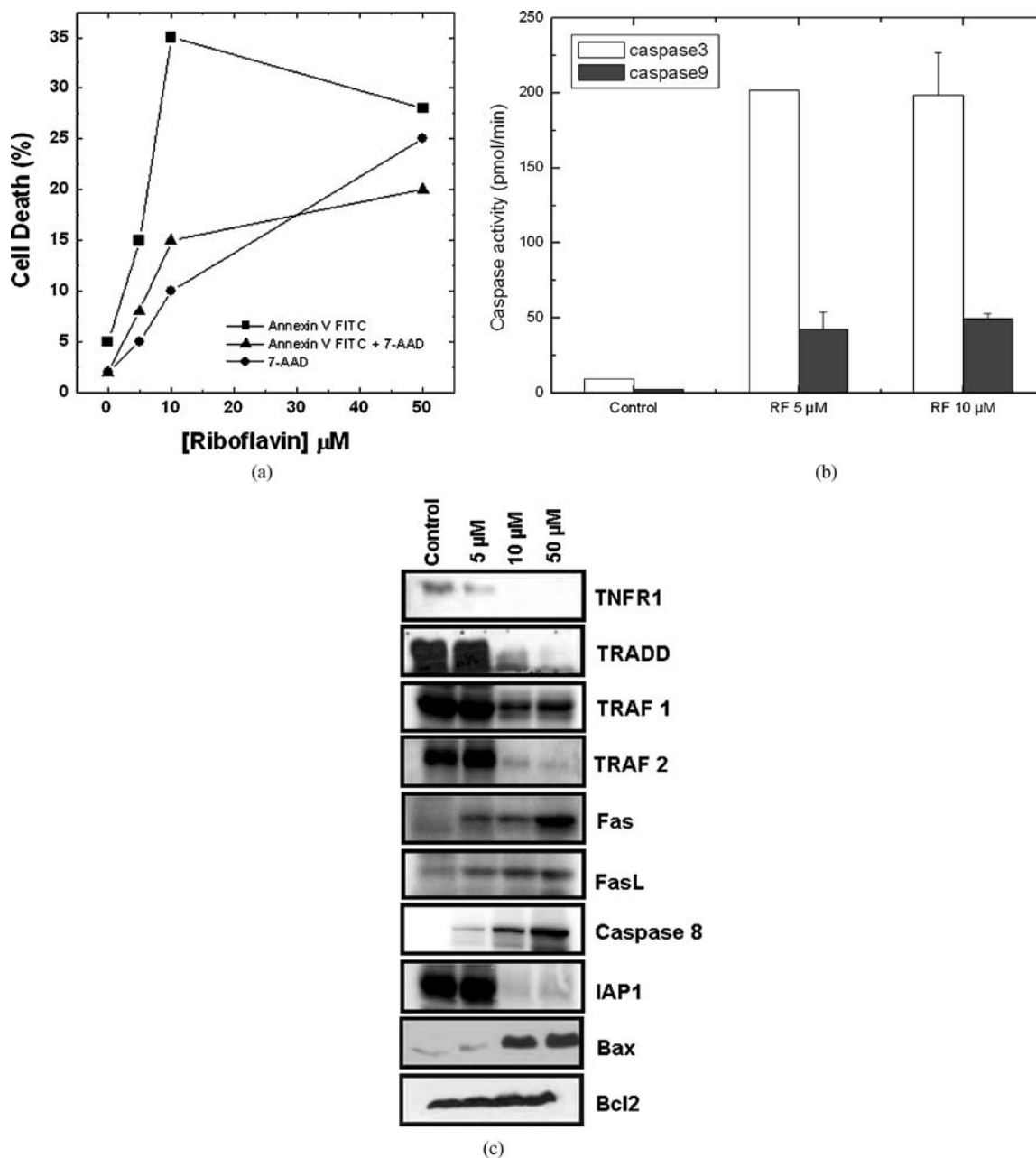


Fig. 4 Apoptosis analysis of HL60 cells treatment with riboflavin. (A) Cell samples were prepared as described in Methods and Annexin V-positive, 7-AAD-positive and Annexin V/7-AAD-positive populations were analyzed by flow cytometry. (B) Colorimetric assay was

performed to determine caspases 9 and 3 activities. (C) Western blot analysis was performed to assess different set of proteins involved in cell death cascades

effect on mitochondrial membrane potential was detected at a concentration of 5 μM (Fig. 3(b)), this concentration induced a slower safranin uptake and a decrease of mitochondrial membrane potential which became even more pronounced when higher irradiated riboflavin concentrations were employed (Fig. 3(c)–(d)). Thus, irradiated riboflavin seems to induce mitochondrial-dependent cytotoxicity at concentrations in excess of 5 μM .

Irradiated riboflavin-dependent cytotoxicity is mediated by apoptosis

When analyzed by flow cytometry, the exposure of phosphatidylserine concomitantly with the 7-AAD exclusion of the HL60 cells population demonstrated that apoptosis is the dominant mode of cell death induced by irradiated riboflavin reaching a maximum value (35%) at 10 μM of

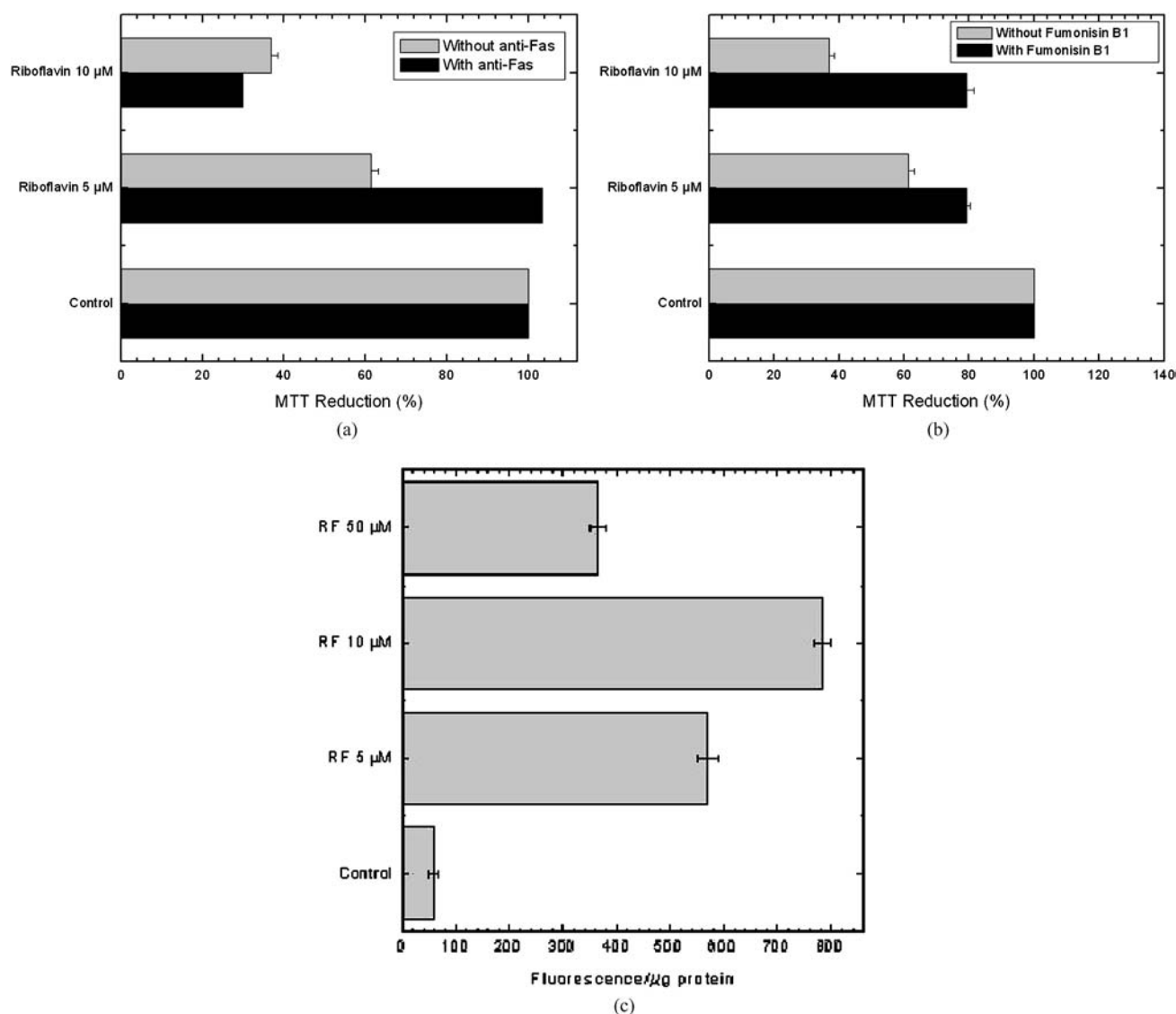


Fig. 5 Effects of Fas neutralising and fumonisin B1 on riboflavin action. Cells (7×10^5 /ml) were incubated with antibody Fas neutralising 10 µg/ml (A) or 25 µM Fumonisin B1 (B) for 1 h and subsequently treated with irradiated riboflavin for 24 h and the cell viability

determined by MTT reduction assay. (C) ASMase activity was determined at pH 5.5 using 10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (Amplex Red reagent). Results represent the means \pm standard error of 3 experiments run in triplicate ($P < 0.05$)

riboflavin. When the cells were treated with a higher concentration of riboflavin (50 µM), apart from apoptosis, also substantial necrosis was induced, in addition to an increase in the Annexin-V/7-AAD double positive compartment (Fig. 4(A)). In apparent agreement, the activation of the direct markers for apoptosis caspase 8, 9 and 3 (Fig. 4(B) and (C)) was also observed at all the riboflavin concentrations used. Furthermore, an increase in the ratio Bax/Bcl2 and down regulation of inhibitory apoptosis protein type 1 (IAP1) was also detected, effects being most pronounced at riboflavin concentration of 10 and 50 µM (Fig. 4(C)).

Subsequently, experiments were initiated to establish the molecular mechanism underlying the activation of the apoptotic machinery by irradiated riboflavin. For this, we as-

sessed the possible involvement of the death receptor Fas in the cytotoxic action of riboflavin. Irradiated riboflavin caused overexpression of Fas and FasL. Together with the above-described strong activation of caspase 8, these data infer that the extrinsic pathway mediates, at least, part of the pro-apoptotic effects of irradiated riboflavin. On the other hand, TNFR1 and its downstream adaptor molecule TRADD were downregulated in response to concentrations of irradiated riboflavin higher than 5 µM (Fig. 4(C)). Importantly, pre-treatment of the cells with Fas neutralising antibodies prevented apoptosis induction by riboflavin at 5 µM concentration suggesting a critical role of this death receptor in the riboflavin-induced apoptosis at this concentration—(Fig. 5(A)). On the other hand fumonisin B1, a known

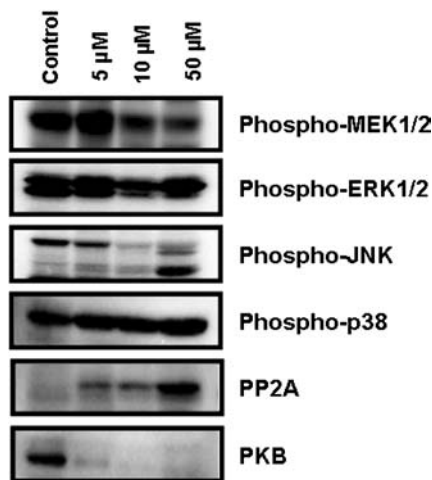


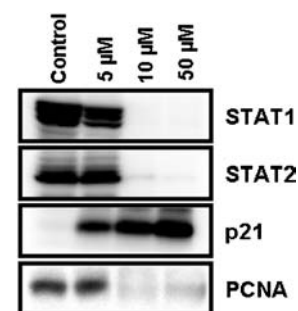
Fig. 6 Effects of irradiated riboflavin on kinases and protein phosphatases in HL60 cells. Cells were treated with irradiated riboflavin (5, 10 and 50 μ M) and the phosphorylation of kinases, as well as inhibitory phosphorylation of PP2A were evaluated by immunoblotting. Soluble lysates were matched for protein content and analyzed on Western blot

inhibitor of the enzyme ceramide synthase involved in *de novo* synthesis of ceramide in the endoplasmic reticulum and mitochondria, also prevented HL60 cells death when riboflavin was used at the concentrations of 10 and 50 μ M (Fig. 5(B)). In the presence of the ceramide *de novo* synthesis inhibitor, cell viability remained around 80%, the same value found for the treatment with riboflavin 5 μ M. Additionally, we also observed that cells treated with irradiated riboflavin had an increase on acid sphingomyelinase activity, a plasma membrane enzyme responsible for the production of ceramide through sphingomyelin hydrolysis (Fig. 5(C)). Thus, both Fas and ceramide pathways are essential for mediating the effect of irradiated riboflavin on leukaemia cell apoptosis.

Mitogen activated protein kinases, PKB and protein phosphatases regulation by riboflavin photoproducts

A prediction emanating from the results presented above is that irradiated riboflavin should produce decreased activity of survival and apoptotic relevant kinases. To test this prediction, the activation status of members of the MAP kinase family was evaluated. As evident from Fig. 6, treatment of HL60 cells with irradiated riboflavin produced inhibition of the cell survival relevant kinases phospho-JNK, phospho-MEK, phospho-ERK, whereas p38 MAP kinase phosphorylation, a kinase mainly relevant for pro-inflammatory responses, remained unchanged after the treatment. In addition, inhibition of the serine/threonine phosphatase PP2A and the anti-apoptotic kinase PKB was detected after treatment of HL60 cells with irradiated riboflavin.

Fig. 7 HL60 cell changes in cell proliferation relevant proteins corresponds with decreased cell proliferation. The expression of p21, PCNA, STAT1 and 2 was evaluated by immunoblotting. Soluble lysates were matched for protein content and analyzed on Western blot



Irradiated riboflavin diminishes expression of proteins important for leukaemia cell proliferation

The effects of irradiated riboflavin on the expression of a selected set of proteins involved in the regulation of cell proliferation were investigated. Substantial up-regulation of p21 was observed, concomitantly with down-regulation of PCNA and STATs 1 and 2 (Fig. 7), demonstrating that the diminished HL60 cell proliferation following treatment with irradiated riboflavin is reflected in appropriate changes in the expression of proteins relevant for leukaemia cell proliferation.

Discussion

Improving chemotherapy for neoplastic disease constitutes one of the most important challenges in biomedical research. In relation to leukaemia, the chemotherapeutic treatment outcome for most adults with acute myeloid leukaemia remains unacceptable.

Previously, Edwards group has demonstrated that irradiated riboflavin causes HL60 cells death by apoptosis, which was attributed to the formation of reactive oxygen species and stable photoproducts [2, 9, 10]. In the present study, we describe in detail the molecular mechanism by which irradiated riboflavin acts as an anti-leukaemic agent. We demonstrate that riboflavin, irradiated 24 h before its application to the HL60 cells has similar cytotoxic capacity as freshly irradiated riboflavin. As reactive oxygen species are unstable, it is difficult to envision how our results can be compatible with a major role for reactive oxidation products or other electron donors in irradiated riboflavin cytotoxicity. Thus our results uncover a new mode of action for this photosensitizer. This result closely corresponds with those of the Edwards' group [2, 15] who similarly demonstrate that reactive oxygen species generated during irradiation cannot affect the cells after the irradiation is interrupted, due either to their short lifetimes in aqueous solution or to the low concentration, as is the case for H_2O_2 .

In order to delineate the molecular details concerning the cell death induced by irradiated riboflavin, we investigated

the possible molecular mechanisms involved. Our results showed strong activation of caspases 3 and 8 when compared to caspase 9, indicating that the intrinsic pathway is not the major signaling pathway responsible for the induction of the apoptotic process. In agreement with this notion, cytotoxicity at a 5 μ M irradiated riboflavin concentration was sensitive to inhibition of the extrinsic (extracellular) pathway by anti-Fas neutralizing antibodies, whereas such treatment also induced strong upregulation of both Fas and FasL expression. Since the apoptosis induction was completely prevented by the anti-Fas neutralizing in the 5 μ M and partially at higher riboflavin concentrations, our data fit best with the hypothesis that irradiated riboflavin effects are mediated primarily by the extrinsic pathway dependent on Fas death receptor system. We feel that a contribution of TNFR1 for extrinsically-induced apoptosis is not likely, expression of components of the TNFR1/TRADD/TRAF signaling pathway does not correlate with the induction of apoptosis and seems in our system to correlate with the expression of the p65 subunit of NF- κ B (data not shown), more in agreement with a anti-apoptotic effect of this signaling system rather as the dominant pro-apoptotic signal delivered by the FasL/Fas system. Thus, these results demonstrate a specific activation of FasL/Fas signaling in HL60 cells in response to irradiated riboflavin.

Interestingly, our results show that the inhibition of ceramide synthase by Fumonisin B1 with the higher riboflavin concentrations was able to counteract cell death. In fact, increase in ceramide generation at the mitochondria, controlled by the ceramide synthase and ceramidase activities, seems to occur prior to the execution phase of apoptosis. Recent evidence suggests that this event is due to, at least in part, the ability of ceramide to form protein-permeable channels in the outer mitochondrial membrane inducing then release of cytochrome *c* and apoptogenic proteins such as Smac/DIABLO, HtrA2/Omi, and others [16]. In agreement, our results show an increase in Bax/Bcl2 ratio and downregulation of the Smac/DIABLO target IAP1 at the higher riboflavin concentrations, together with a decrease on mitochondrial membrane potential that becomes more pronounced at higher irradiated riboflavin concentrations. Therefore our results indicate that at higher concentrations the effects of riboflavin are partially mediated by the intrinsic pathway. Additionally, we also observed an increase of acid SMase activity after treatment of the cells with irradiated riboflavin. Since this enzyme is associated with hydrolysis of shingomyelin in the lysosomes and other membrane compartments, the results show that increase in the membrane ceramide generation is also important in the effects of irradiated riboflavin. These results suggest that riboflavin-induced HL60 cell death is associated with activation of Fas receptor induced via a ceramide-dependent pathway or vice versa. Interestingly, previous data from the literature have

pointed out ceramide as a second lipid messenger that is involved in the reorganization of lipid rafts into ceramide-enriched platforms responsible for the increase of Fas clustering and its activation [17–20] and also as a regulator of JNK [21], but conversely Fas ligation has been described to lead to ceramide release [22]. Hence, cross-stimulation of both pro-apoptotic systems may be important. The sphingomyelin pathway, an ubiquitous signaling system that links specific cell surface receptors and environmental stress to cellular responses, has been shown to mediate apoptosis in HL60 cells induced by ionizing radiation and anti-cancer drugs. Ceramide, the hydrolyzed product of sphingomyelin, was found to accumulate before the onset of apoptosis and is often linked to the activation of caspase-3 activity and Fas receptor/ligand system [22].

Mitochondrial membrane potential was determined under the treatment conditions described above and a dose-dependent decrease on $\Delta\Psi$ was observed indicating mitochondria involvement in irradiated-riboflavin cytotoxicity. Similar results were also described recently for another photosensitizer, disulfonated diphthalimidomethyl phthalocyanine zinc (ZnPcS₂P₂) [23]. Additionally, we observed that the irradiated riboflavin leads to leukaemia cell proliferation inhibition as shown by the activation of p21 and downregulation of PCNA. p21 binds to and inactivates a variety of cyclin/CDK complexes and thereby regulates the cell proliferation. PCNA is a protein synthesized in early G1 and S phases of the cell cycle and participate in the cell cycle progression, DNA replication and DNA repair [24, 25]. As HL60 cells are p53 negative of homozygous deletions [26] and p53 is one of the activators of p21, we investigated if the expression of p21 could be regulated through STATs which mechanism is p53-independent and can occur in response to TNFR1 signaling [27]. Our results, however, indicate that the activation of p21 in HL60 cells treated with irradiated riboflavin is independent of STATs and TNFR1 signaling. Interestingly, activation of p21 in myelocytic cell lines such as HL60 are also related to terminal differentiation but the mechanism that regulates p21 expression in these p53-independent circumstances is not clear [28, 29].

The reversible phosphorylation of proteins, regulated by protein kinases and protein phosphatases, influences virtually all cellular functions and it is an essential mechanism in the control of proliferation, differentiation and transformation [30, 31]. The inhibition of the serine/threonine phosphatase PP2A observed after the treatment is in agreement with other work that shows induction of apoptosis by PP2A inhibitors [32]. Moreover, the inhibition of PP2A is correlated to differentiation of HL60 cells [33, 34] and indicates that the induction of death may be a result of a terminal differentiation induced by irradiated riboflavin.

The family of serine/threonine protein kinases MAPKs regulates diverse cellular activities running the gamut from

gene expression, mitosis and metabolism to motility, survival and apoptosis [35]. In order to evaluate the role of MAPKs in the induction of HL60 death by riboflavin the activation status of ERK, JNK and p38 MAPK was analyzed. Our results show that the cytotoxic effects of riboflavin photoproducts are related to downregulation of JNK and ERK1/2 phosphorylation, whereas no change in the p38 MAPK phosphorylation status was observed. ERK1/2 signaling has been implicated as a key regulator of cell proliferation and, for this reason, inhibitors of the ERK pathway are entering clinical trials as potential anticancer agents [36, 37]. In this paper we show that riboflavin photoproducts caused a slight reduction of ERK activity, which may also be related to the entry in

the terminal stage of differentiation in HL60 cells [38]. Furthermore, ERK1/2 pathway has been related to resistance of cell death triggered by death receptors and the inhibition of this cascade shows to sensitize cells to Fas signaling [39, 40]. HL60 cells are relatively resistant to Fas-induced death, hence, the downregulation of ERK1/2 by irradiated riboflavin is an important mechanism to sensitization of these cells by overexpression of Fas and FasL. Moreover, our results show inhibition of the PKB pathway, which is also important to influence in the sensitization of cell death by Fas [35].

Interestingly, the decrease in the JNK and ERK activation was simultaneously accompanied by downregulation

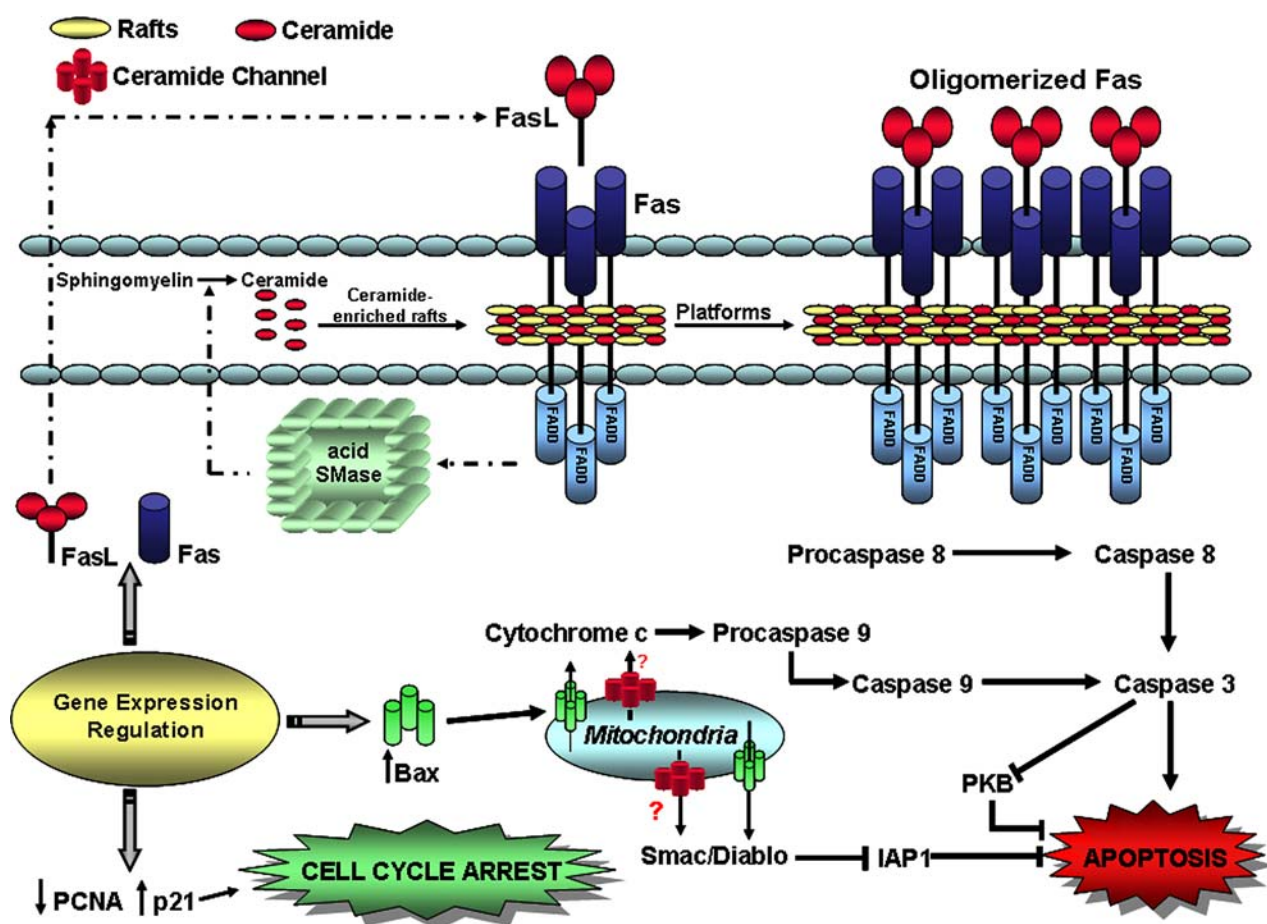


Fig. 8 Schematic representation of the molecular mechanism of flavins-induced HL60 cell death. Data presented in this report revealed that irradiated riboflavin induces apoptosis in HL60 cells via the extrinsic pathway through activation of the Fas signaling cascade associated to an increase in ceramide generation. Stimulation of Fas results in translocation of the vesicles containing acid SMase onto the extracellular leaflet of the cell membrane. Surface acid SMase releases ceramide that provides the driving force for the fusion of small rafts to large ceramide-enriched platforms, which mediates the clustering of activated receptor molecules and full activation of Fas receptors. Furthermore, the mechanism seems to be amplified by the intrinsic pathway mainly at higher riboflavin concentrations, where a decrease

on mitochondrial membrane potential, increased expression of Bax and downregulation of the protein IAP were observed. In fact, our results show increased cell viability through inhibition of ceramide synthase by fumonis B1 indicating that *de novo* ceramide production is also important for the effects of irradiated riboflavin at the mitochondrial level. As recent evidence show ceramide is able to form protein permeable channels in the mitochondrial membrane promoting the release of proapoptotic proteins such as cytochrome c and Smac/Diablo, the later an inhibitor of IAP [16]. Importantly, the irradiated riboflavin cytotoxicity also involves inhibition of cell proliferation and survival factors such as the protein PKB

of the anti-apoptotic signaling system molecules TNRF1/TRADD/TRAF that are implicated in the activation of ERK and JNK pathways.

The present work demonstrates that irradiated riboflavin is a potent inducer of apoptotic cell death in HL60 by activating the extrinsic pathway in a mechanism dependent of upregulation of Fas and FasL expressions and activation of ceramide metabolism. Furthermore, our study indicates that the apoptotic process is preceded by cell proliferation inhibition and terminal differentiation, but additional studies are necessary to give more detailed insight into riboflavin action (Fig. 8). Nevertheless, the results presented herein reinforce the potential of irradiated riboflavin as adjuvant therapeutic for myeloid leukaemia and contribute to a better knowledge towards the rational use of this photosensitizer for cancer treatment.

Acknowledgments The authors are grateful to Prof. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira (Zootecnia and Food Engineering Faculties, University of São Paulo) for donating Fumonisin B1. PhD scholarship from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo for A.C.S. Souza (proc. 02/12539-7) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (proc. 302304/2004-5).

References

- Peng Q, Nesland JM (2004) Effects of photodynamic therapy on tumor stroma. *Ultrastruct Pathol* 28:333–340
- Edwards AM, Barredo F, Silva E, De Ioannes AE, Becker MI (1999b) Apoptosis induction in nonirradiated human HL60 and murine NOS/2 tumor cells by photoproducts of indole-3-acetic acid and riboflavin. *Photochem Photobiol* 70:645–649
- Souza ACS, Cavagis ADM, Jucá MB, Ferreira CV, Aoyama H, Peppelenbosch MP (2005) Riboflavin: a multifunctional vitamin. *Quim Nova* 28:887–891
- Meisel D, Neta P (1975) One electron reduction potential of riboflavin studied by pulse radiolysis. *J Phys Chem* 79:2459–2461
- Ahmad I, Fasihullah Q, Noor A, Ansari IA, Ali QNM (2004a) Photolysis of riboflavin in aqueous solution: a kinetic study. *Int J Pharm* 280:199–208
- Ahmad I, Fasihullah Q, Vaid FHM (2004b) A study of simultaneous photolysis and photoaddition reactions of riboflavin in aqueous solution. *J Photochem Photobiol B: Biol* 75:13–20
- Holzer W, Shirdel J, Penzkofer AH, Deutzmann R, Hochmuth E (2005) Photo-induced degradation of some flavins in aqueous solution. *Chem Phys* 308:69–78
- Silva E, Ugarte R, Andrade A, Edwards AM (1994) Riboflavin-sensitized photoprocesses of tryptophan. *J Photochem Photobiol B: Biol* 23:43–48
- Edwards AM, Silva E (2001) Effect of visible light on selected enzymes, vitamins and amino acids. *J Photochem Photobiol B: Biol* 63:126–131
- Edwards AM, Bueno C, Saldaña A, Kassab K, Polo L, Jori G (1999a) Photochemical and pharmacokinetic properties of select flavins. *J Photochem Photobiol B: Biol* 48:36–41
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Meth* 65:55–63
- Denizot F, Lang R (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Meth* 89:71–77
- Akerman KE, Wikstrom MK (1976) Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. *FEBS Lett* 68:191–197
- Hartree EF (1972) Determination of proteins: a modification of Lowry method that give a linear photometric response. *Anal Biochem* 48:422–427
- Edwards AM, Silva E, Jofré B, Becker MI, De Ioannes AE (1994) Visible light effects on tumoral cells in a culture medium enriched with tryptophan and riboflavin. *J Photochem Photobiol B: Biol* 24:179–186
- Siskind LJ (2005) Mitochondrial Ceramide and the induction of apoptosis. *J Bioenergetics and Biomembranes* 37:143–153
- Cremesti AE, Goni FM, Kolesnick R (2002) Role of sphingomyelinase and ceramide in modulating rafts: do biophysical properties determine biologic outcome? *FEBS Lett* 531:47–53
- Huang ST, Yang RC, Chen MY, Pang JH (2004) *Phyllanthus urinaria* induces the Fas receptor/ligand expression and ceramide-mediated apoptosis in HL60 cells. *Life Sci* 75:339–351
- Miyaji M, Jin ZX, Yamaoka S, Amakawa R, Fukuhara S, Sato SB, Kobayashi T, Domae N, Mimori T, Bloom ET, Okazaki T, Umehara H (2005) Role of membrane sphingomyelin and ceramide in platform formation for Fas-mediated apoptosis. *J Exp Med* 202:249–259
- Rotolo JA, Zhang J, Donepudi M, Lee H, Fuks Z, Kolesnick R (2005) Caspase-dependent and -independent activation of acid sphingomyelinase signaling. *J Biol Chem* 280:26425–26434
- Verheij M, Bose R, Lin XH, Yao B, Jarvis WD, Grant S, Birrer MJ, Szabo E, Zon LI, Kyriakis JM, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, Kolesnick RN (1996) Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature* 380:75–79
- Hetz CA, Hunn M, Rojas P, Torres V, Leyton L, Quest AF (2002) Caspase-dependent initiation of apoptosis and necrosis by the Fas receptor in lymphoid cells: onset of necrosis is associated with delayed ceramide increase. *J Cell Sci* 115:4671–4683
- Huang H, Chen Y, Wu Y (2005) Mitochondria-dependent apoptosis induced by a novel amphipathic photochemotherapeutic agent ZnPcS2P2 in HL60 cells. *Acta Pharmacol Sin* 26:1138–1144
- Woods AL, Hall PA, Shepherd NA, Hanby AM, Waseem NH, Lane DP, Levison DA (1991) The assessment of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining in primary gastrointestinal lymphomas and its relationship to histological grade, S + G2 + M phase fraction (flow cytometric analysis) and prognosis. *Histopathology* 19:21–27
- Xia L, Zheng L, Lee HW, Bates SE, Federico L, Shen B, O'Connor TR (2005) Human 3-methyladenine-DNA glycosylase: effect of sequence context on excision, association with PCNA, and stimulation by AP endonuclease. *J Mol Biol* 346:1259–1274
- Steinman RA, Huang J, Yaroslavskiy B, Goff JP, Ball ED, Nguyen A (1998) Regulation of p21 (WAF1) expression during normal myeloid differentiation. *Blood* 91:4531–4542
- Wang Y, Wu TR, Cai S, Welte T, Chin YE (2000) Stat1 as a component of tumor necrosis factor alpha receptor 1-TRADD signaling complex to inhibit NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol* 20:4505–4512
- Das D, Pintucci G, Stern A (2000) MAPK-dependent expression of p21(WAF) and p27(kip1) in PMA-induced differentiation of HL60 cells. *FEBS Lett* 472:50–52
- Asada M, Ohmi K, Delia D, Enosawa S, Suzuki S, You A, Suzuki H, Mizutani S (2004) Brp2 functions as a cytoplasmic retention protein for p21 during monocyte differentiation. *Mol Cell Biol* 24:8236–8243
- Zhang ZY (2003) Chemical and mechanistic approaches to the study of protein tyrosine phosphatases. *Acc Chem Res* 36:385–92

31. Aoyama H, Silva TMA, Miranda MA, Ferreira CV (2003) Proteínas tirosina fosfatases: propriedades e funções biológicas. *Quim Nova* 26:896–900
32. McCluskey A, Ackland SP, Bowyer MC, Baldwin ML, Garner J, Walkom CC, Sakoff JA (2003) Cantharidin analogues: synthesis and evaluation of growth inhibition in a panel of selected tumor cell lines. *Bioorg Chem* 31:68–79
33. Uzunoglu S, Uslu R, Tobu M, Saydam G, Terzioglu E, Buyukkececi F, Omay SB (1999) Augmentation of methylprednisolone-induced differentiation of myeloid leukemia cells by serine/threonine phosphatase inhibitors. *Leuk Res* 23:507–512
34. Bhoola R, Hammond K (2000) Modulation of the rhythmic patterns of expression of phosphoprotein phosphatases in human leukaemia cells. *Cell Biol Int* 24:539–547.
35. Brantley-Finley C, Lyle CS, Du L, Goodwin ME, Hall TS, DK, G P, Chambers T (2003) The JNK, ERK and p53 pathways play distinct roles in apoptosis mediated by the antitumor agents vinblastine, doxorubicin, and etoposide. *Biochem Pharmacol* 66:459–469
36. Lee JT Jr, McCubrey JA (2002) The Raf/MEK/ERK signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in leukemia. *Leukemia* 16:486–507
37. Roux PP, Blenis J (2004) ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 68:320–344
38. Chen F, Wang Q, Wang X and Studzinski GP (2004) Up-regulation of Egr1 by 1,25-dihydroxyvitamin D3 contributes to increased expression of p35 activator of cyclin-dependent kinase 5 and consequent onset of the terminal phase of HL60 cell differentiation. *Cancer Res* 64:5425–5433
39. Holmstrom TH, Schmitz I, Soderstrom TS, Poukkula M, Johnson VL, Chow SC, Krammer PH, Eriksson JE (2000) MAPK/ERK signaling in activated T cells inhibits CD95/Fas-mediated apoptosis downstream of DISC assembly. *EMBO J* 19:5418–5428
40. Tran SE, Holmstrom TH, Ahonen M, Kahari VM, Eriksson JE (2001) MAPK/ERK overrides the apoptotic signaling from Fas, TNF, and TRAIL receptors. *J Biol Chem* 276:16484–1690

5. CAPÍTULO 3

Natural compounds as a source of protein tyrosine phosphatase inhibitors: Application to the rational design of small-molecule derivatives

Carmen V. Ferreira^{a,*}, Giselle Z. Justo^{a,1}, Ana C.S. Souza^a, Karla C.S. Queiroz^a, William F. Zambuzzi^a, Hiroshi Aoyama^b, Maikel P. Peppelenbosch^c

^a *Laboratory of Cell Signaling, Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), C.P. 6109, CEP 13083-970, Campinas, Sao Paulo, Brazil*

^b *Laboratory of Enzymology, Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, UNICAMP, C.P. 6109, CEP 13083-970, Campinas, Sao Paulo, Brazil*

^c *Department of Cell Biology, Groningen University Medical Centre, A. Deusinglaan 1, NL-9713 AV, Groningen, The Netherlands*

Received 4 January 2006; accepted 25 August 2006

Available online 15 September 2006

Abstract

Reversible phosphorylation of tyrosine residues is a key regulatory mechanism for numerous cellular events. Protein tyrosine kinases and protein tyrosine phosphatases (PTPs) have a pivotal role in regulating both normal cell physiology and pathophysiology. Accordingly, deregulated activity of both protein tyrosine kinases and PTPs is involved in the development of numerous congenitally inherited and acquired human diseases, prompting obvious pharmaceutical and academic research interest. The development of compound libraries with higher selective PTP inhibitory activity has been bolstered by the realization that many natural products have such activity and thus are interesting biologically lead compounds, which properties are widely exploited. In addition, more rational approaches have focused on the incorporation of phosphotyrosine mimetics into specific peptide templates (peptidomimetic backbones). Additional factors furthering discovery as well as therapeutic application of new bioactive molecules are the integration of functional genomics, cell biology, structural biology, drug design, molecular screening and chemical diversity. Together, all these factors will lead to new avenues to treat clinical disease based on PTP inhibition.

© 2006 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Protein tyrosine phosphatases; PTP inhibitors; Natural compounds; Peptidomimetics

1. Introduction

The ubiquitous nature of protein phosphorylation/dephosphorylation underscores its key role in cell signaling metabolism, growth and differentiation. In fact, cells respond to internal and external stimulus through integrated networks of intracellular signaling pathways that act via cascades of sequential phosphorylation or dephosphorylation reactions which are governed by the action of protein kinases (PKs) and protein phosphatases (PPs), respectively [1,2].

PPs have been classified by structure and substrate specificity into protein serine/threonine phosphatases (PSTPs) and protein tyrosine phosphatases (PTPs) [3,4].

PTPs are key regulatory enzymes that dephosphorylate phosphotyrosine residues and are critical regulators of signal transduction under normal and pathological conditions. In conjunction with protein tyrosine kinases (PTKs), they regulate the reversible phosphorylation of tyrosine residues in proteins and thereby control fundamental physiological processes such as cell growth and differentiation, cell cycle, metabolism, immune response and cytoskeletal function. Furthermore, interfering with the delicate balance between counteracting PTKs and PTPs is involved in the development of numerous inherited and acquired human diseases such as autoimmunity, diabetes and cancer [5,6].

* Corresponding author. Tel: +55 19 3788 6659; fax: +55 19 3788 6129.

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

¹ These authors contributed equally to the preparation of the manuscript.

2. PTPs classification

Classically, PTPs were divided into four classes: receptor type PTPs, non-receptor PTPs, dual-specificity PTPs and low molecular weight PTPs. However, some authors, have challenged this classification in very well-designed reviews and proposed an alternative way to classify this enzyme family, which is based on the amino acid residues of their catalytic domains [5,7]. In fact, comparison of the crystal structure of the PTPs that have been solved to date demonstrates that the PTPs domains are conserved in both sequence and structure. Additionally the sequences (domains) outside the catalytic domain are diverse and may regulate PTP activity and/or function (Fig. 1).

Class I cysteine-based PTPs catalyze the enzymatic reaction in which an active-site cysteine group plays a central role and which confers PTP susceptibility to oxidant agents that can lead to the oxidation of the key cysteine and inhibition of PTP activities. This class constitutes the “classical” PTPs and the “dual specificity” protein phosphatases (DSPs), both enzymes evolved from a common ancestor. The “classical PTPs” members are strictly tyrosine specific and according to their subcellular localization can be further divided into intracellular PTPs (PTP1B and SHP) and receptor-like PTPs (CD45, PTP α and PTP γ), both containing one or two catalytic domain(s) of approximately 240 amino acids. The DSPs (VH1-like enzymes) are the most diverse group in terms of substrate specificity and can be distinguished by their ability to hydrolyze pSer/pThr as well as pTyr residues and non-protein substrates, such as inositol phospholipids. The DSP family contains, amongst others, highly specialized types of phosphatases, for instance members of this family include mitogen activated protein kinases phosphatases (MKPs), members of the myotubularin family, RNA triphosphatases, and PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10) type phosphatase [5,8].

Class II cysteine-based PTPs are especially common in bacteria and enzymes of this class appear to be more ancient than class I PTPs. In humans this class is represented by an 18 kDa tyrosine-specific low M_r phosphatase (LMPTP). LMPTP is able to dephosphorylate tyrosine kinases and their substrates but its biological functions remain unclear. The correlation between expression and activity of variants of this PTP with some human diseases, including cancer, indicates that this phosphatase may be involved in pivotal processes in cell physiology [9].

Class III cysteine-based PTPs are tyrosine/threonine specific phosphatases and probably evolved from a bacterial rhodanese-like enzyme. In humans this class is represented by the group of Cdc25 phosphatases: Cdc25A, Cdc25B and Cdc25C. These three cell cycle regulators act by a dephosphorylation of Cdks at their inhibitory N-terminal phosphor-Thr/Tyr motifs; a reaction that is required for the activation of these kinases to drive progression of the cell cycle [10,11].

The fourth class of PTPs is represented by aspartate-based PTPs, which use a different catalytic mechanism with a key aspartic acid and dependence on a cation [12].

3. Mechanisms of PTP catalysis

Different experimental approaches, such as X-ray crystallography, directed site mutagenesis and circular dichroism, have contributed to our understanding of catalysis and substrate recognition by PTPs. Although the PTPs have conserved catalytic domains and share a common mechanism of action, individual PTPs may display substantial substrate specificity, thus resulting in these enzymes to regulate highly specialized and often fundamentally important processes.

PTP family shares a strictly conserved active site comprising the “P-loop” residues (H/V)C(X)₃R(S/T) and a conserved acidic residue [13–15]. In all structurally characterized PTPs to date, the three-dimensional structure of the active-site components is also highly conserved suggesting a common catalytic mechanism. In general, the catalytic site is located in a groove at the protein surface, whose size is responsible for explaining the higher substrate selectivity of classical PTPs [5].

In vitro studies based on model substrates, such as phenyl phosphate or *p*-nitrophenyl phosphate, have provided much of the information on the mechanistic aspects of catalysis. In particular, it is well established that the enzyme completes its action in two major steps. In the first step, the phosphoryl group from the substrate is transferred to the nucleophilic cysteine, forming a phosphoenzyme intermediate. In the second step, this intermediate is hydrolyzed, leading to the regeneration of the enzyme and the release of an inorganic phosphate [3,16]. Although this two-step mechanism is well established, some aspects still need to be clarified, such as regulatory and inhibitory mechanisms.

4. PTPs: key players in normal and pathological conditions

Since the reversible phosphorylation of tyrosine residues in proteins critically controls many fundamental physiological processes, especially the regulation of signal transduction cascades, it is clear that control of PTK and PTP activities must be tightly controlled. In fact, impaired functions of these enzymes are involved in the development of numerous inherited and acquired human diseases such as autoimmunity, infections, diabetes, cancer, cardiovascular and neurological diseases [17]. Consequently, both academia and the pharmaceutical industry devote substantial research effort in establishing the basic underlying molecular mechanisms and for the identification of novel, potentially, clinically useful modulators of their activity. Strikingly, proportionately much more research has been focused on PTKs and PTPs were neglected. In recent years, however, studies on PTPs have substantially increased. From these studies it has emerged that the importance of the PTP superfamily of proteins may actually supercede PTKs, PTP having specific and even dominant roles in setting the net level of tyrosine phosphorylation. This has kindled interest in this family as potential pharmacological targets.

This development is best highlighted by the discovery of PTP1B as a major drug target for diabetes and obesity. Studies have shown that mice in which this PTP is deleted are healthy

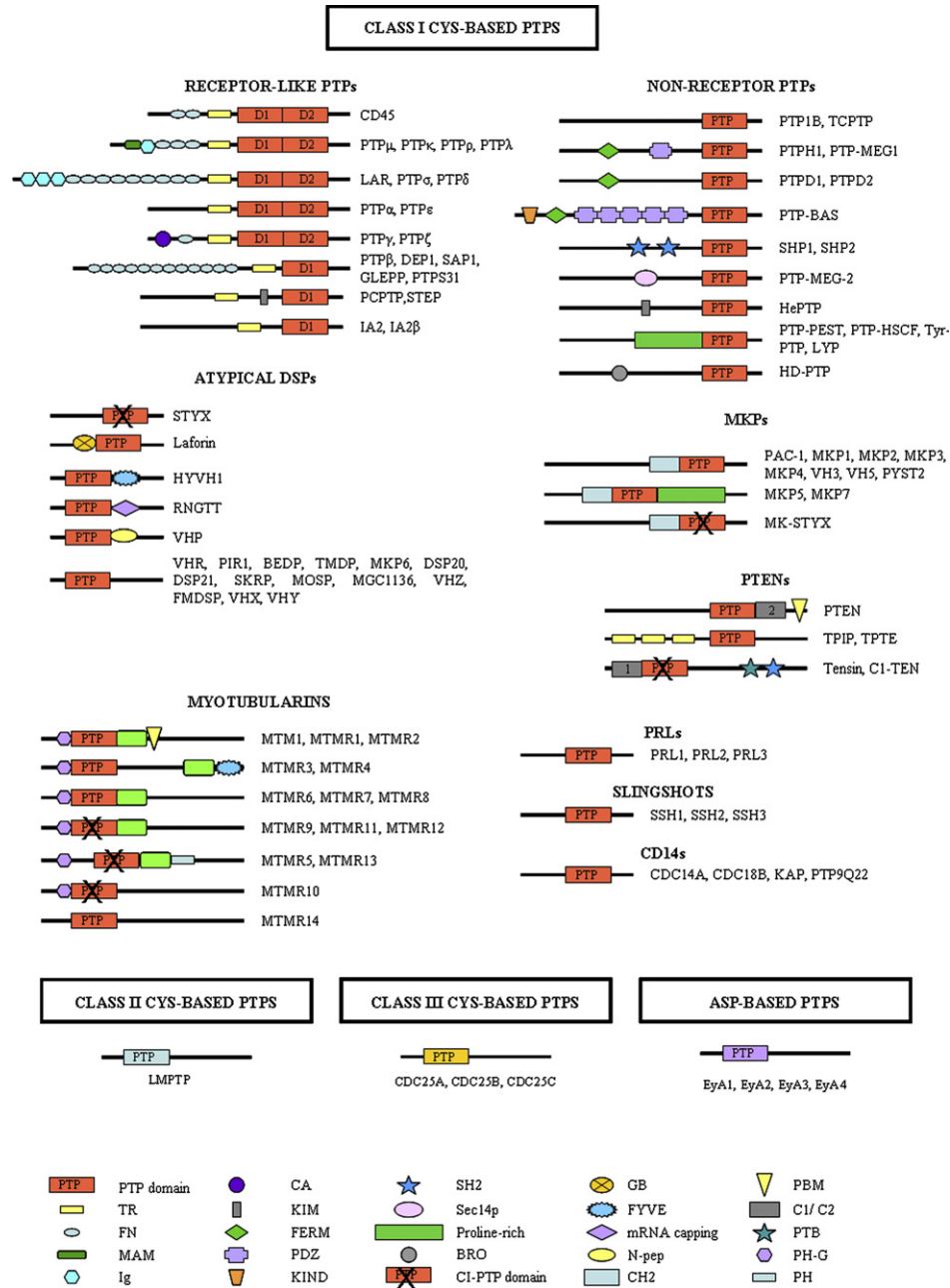


Fig. 1. Classification and domain structure of the PTP superfamily. According to the amino acid sequences of the catalytic region the PTPs can be classified into four families. The sequences (domains) outside the catalytic region are diverse and may regulate PTP activity and/or function. Abbreviation: TR, transmembrane domain; FN, fibronectin-like; MAM, meprin, A2, RPTP μ homology; Ig, immunoglobulin-like; CA, carbonic anhydrase like; KIM, kinase interaction motif; FERM, band 4.1/ezrin/radixin/moesin homology; PDZ, postsynaptic density-95/discs large/Z01 homology; KIND, kinase N-lobe-like domain; SH2, src homology 2; Sec14p, sec14p homology (or CRAL/TRIO); BRO, baculovirus BRO homology; CI-PTP domain, catalytically inactive PTP domain; GB, glycogen binding; FYVE, Fab1/Yotb/Vac1p/early endosomal antigen-1 homology; N-pep, N-terminal peptidase-like; CH2, cdc25 homology region 2; PBM, PDZ binding motif; C1/C2, protein kinase C conserved region 1/protein kinase C conserved region 2; PTB, phosphotyrosine-binding domain; PH-G, pleckstrin homology-GRAM domain; PH, pleckstrin motif.

but lean and obesity-resistant, and have reduced plasma levels of insulin and glucose, a phenotype associated to enhanced signaling through the insulin and leptin receptors [1,18,19]. Another phosphatase, PTEN, is also related to insulin pathway. *In vivo* antisense experiments have validated PTEN as a *bona fide* target in diabetes. Furthermore, this enzyme is a major tumor suppressor (up to half of all human tumors have deleted or mutated PTEN genes). Hence the use of

PTEN inhibition in diabetes must be weighed against a potential pro-oncogenic effect [1].

PTPs are also involved in immunity and infections; by exerting both activating and inhibitory influences on the signaling pathways active in the immune system they are required for a proper physiological immune response, as evident from the deregulated antigen receptor-mediated lymphocyte activation and cytokine-induced differentiation following PTP

inhibition [20]. This is further highlighted by the observation that all cells of the immune system have high levels of tyrosine phosphorylation and express more genes encoding PTKs and PTPs than any other cell type, with the possible exception of neurons. In fact, together cells of the immune system express at least half of the 107 PTP genes in the human genome.

CD45 is specifically expressed in lymphocytes and appears to function as a positive regulator of the lymphocyte T-cell receptor and B-cell immunoglobulin receptor signaling by dephosphorylating the C-terminal negative regulatory tyrosine residue of the SRC-family PTKs. Thus, blocking CD45 could be therapeutically useful in autoimmune and inflammatory disorders, and graft rejection [1,20]. Similar to CD45, two other PTPs, SHP2 and LMPTP, also seem to have mainly positive influence on lymphocyte activation. Recent studies have identified activating mutations in human SHP2 as the cause of the inherited disorder Noonan syndrome and some forms of leukemia [21–23].

In contrast to CD45, SHP2, and LMPTPs, other PTPs appear involved in the suppression of the lymphocyte activation. Important examples include SHP1, LYP (lymphoid specific PTP), PTP-PEST, PTH1 and PTP-HSCF (PTP haematopoietic stem-cell fraction), but many other exist [20]. A missense polymorphism in *PTPN22* which encodes LYP is associated with type 1 diabetes and with rheumatoid arthritis, SLE and Graves disease [24–28]. Additionally, the allelic polymorphism in the gene encoding LMPTP correlates with increased IgE levels and atopy [29].

Many other PTPs are candidate drug targets for inflammation and immunological diseases. PTP- β could be an effective drug target in inflammation as an inhibitor of neutrophil and macrophage extravasation while PTP- ϵ is a potential target in septic shock and osteoporosis [1,30]. PTP- ϵ has also been suggested as a target in osteoporosis since the osteoporosis drug alendronate is a PTP- ϵ inhibitor. Another potential target of inhibition for osteoporosis treatment is the PTP GLEPP1 (glomerular epithelial protein-1 precursor) as this enzyme is a positive regulator of osteoclastic resorption inducing anabolic effects in osteoporosis [31].

Recent evidences have shown that PTPs have both tumor-suppressor and oncogenic effects on cancer-associated signaling process, and that the deregulation of PTP function is associated with tumorigenesis in different types of human cancer [32]. Indeed some PTPs function in a positive manner in growth-stimulatory signaling pathways triggered by cell-surface receptors. Accordingly gain-of-function mutations in these PTPs seem likely to have oncogenic effects, as in the case of SHP2 which transduces mitogenic and pro-migratory signals from various types of receptors. SHP2 activity has been associated with the transforming capacity of constitutively active forms of EGFR, FGFR3 and BCR–ABL and also has been implicated in *Helicobacter pylori*-induced gastric cancer mediating the transformation of gastric epithelial cells by interacting with the CagA protein, which is a *H. pylori* virulence factor [33–36].

In addition to SHP2, other PTPs related to oncogenic transformation have been studied as potential drug targets for

cancer treatment. Ptl-3 protein tyrosine phosphatase is specifically amplified and overexpressed when primary tumors metastasize, and is a new and exciting target. Cdc25B is overexpressed in a high proportion (> 30%) of primary breast tumors and is currently being explored by several companies as a potential drug target [1]. PTP- α dephosphorylates and activates protooncogene Src-family kinases, leading to cell transformation. In agreement, increased PTP- α mRNA levels were demonstrated in late-stage colorectal tumors and high PTP- α protein levels are present in about one-third of primary breast carcinoma, which indicates that blocking PTP- α could be beneficial in these cases [37,38]. Interestingly, overexpression of PTP- α in breast carcinomas is also correlated with reduced tumor aggressiveness, demonstrating the complexity of PTP functions in cellular signaling and highlighting the difficulties in predicting whether a specific PTP will be a good target for cancer, also as a consequence of the cellular context and tumor type-specific effects of PTPs.

PTPs can also function as tumor-suppressor agents and mutation with loss-of-function effects in PTPs has been correlated with transformation of different cells. PTPBAS, PTPD2, PTPH1, PTP ρ , LAR and PTP γ inactivating mutations were identified in samples of colorectal cancer [39] while overexpression of DEP1 seems able to revert the transformed phenotype of different tumor cells as breast cancer, pancreatic, thyroid and colon cancer cells [40–43]. The latter observation has been attributed to the antagonistic role of DEP1 in growth signaling through the direct dephosphorylation of tyrosine kinase receptors such as PDGFR β [44] as well as to its involvement in stabilization of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 promoting cell cycle arrest [41]. Furthermore, DEP1 seems to have pro-apoptotic functions which contribute to its tumor-suppressor activity. Finally, SHP1 can act as an antagonist of growth-factor signaling in epithelial and haematopoietic cells and its inactivation has been described in T-cell lymphomas, anaplastic large-cell lymphoma, in different forms of leukemia, and in multiple myeloma [45–48].

From the aforementioned examples it is clear that PTPs are involved in a multitude of physiological processes and in many cases their impaired functions is directly responsible for disease, making PTPs attractive potential targets for drug development. Development of PTP inhibitors in this fashion will require to obtain a better understanding of the exact role of PTPs in the regulation of signaling pathways both in normal cellular physiology and under pathogenic conditions. Additionally, for PTPs-based treatments further insight must be gained into the role of the cellular context for the effects of PTP inhibition, as such inhibition may produce different and even opposite effects of PTPs depending on these conditions, in order to minimize unwanted side effects and increase the success of PTP inhibition therapy.

5. Medicinal chemistry of PTP inhibitors

Protein kinases have been a major focus of recent molecular targeted drug discovery efforts, producing drugs such as imatinib mesylate (Gleevec[®]) and gefitinib (Iressa[®]), and the

success of these drugs has prompted a substantial effort to target other kinases. Based on their roles in a multitude of signaling pathways and altered expression in disease state, there has been increasing interest in identifying PTP inhibitors that are more potent and selective than the general tyrosine phosphatase inhibitor sodium orthovanadate [7]. Such targeted agents may provide value as therapeutics for cancer and other diseases. Despite the strikingly conserved nature of the PTPs active site, several groups have identified lead compounds with favorable selectivity, making phosphatase-selective inhibition plausible.

5.1. Natural compounds and derivatives as PTP inhibitors

Nature is an inexhaustible source of natural compounds with interesting biological activities [49]. In the literature there are many compounds from plants, algae and microorganisms that inhibit different types of enzymes, including PTPs. Despite acting at low concentrations, natural compounds generally have low stability, which limits their use. However, these natural molecules are attractive starting points for the synthesis of analogues with higher stability and selectivity [50,51].

One of the most attractive therapeutic targets for the development of potent and selective inhibitors is PTP1B, which has been shown to play a role in diabetes and obesity, which are linked diseases [1,52].

Type 2 diabetes is common and its incidence is rapidly increasing. In more than 90% of patients, the disease is characterized by either abnormal insulin secretion or impaired insulin bioactivity. Insulin resistance is central to type 2 diabetes and is known to involve decreased tyrosine phosphorylation of insulin receptors despite normal insulin levels [52]. Insulin signaling begins with the activation of the insulin receptor (IR) via tyrosine phosphorylation and culminates in the uptake of glucose into cells by the glucose transporters (GLUTs) via a phosphoinositol-3-kinase (PI3K) catalyzed pathway. The activated IR must then be deactivated and returned to a basal state, a process that involves the direct interaction with PTP1B [53]. Therefore, the use of specific PTP1B inhibitors represents a novel strategy for the treatment of type 2 diabetes [54].

The natural product dephostatin, a 2,5-dihydroxynitrosoaniline, isolated from *Streptomyces* spp., was found to be a competitive PTP inhibitor, active in a micromolar dose [55,56]. However, sufficient amounts of dephostatin were difficult to obtain from the natural source; thus, chemical synthesis of dephostatin and more stable derivatives were required. Studying the structure–activity relationship of dephostatin revealed that the two hydroxyl groups were indispensable for binding of these classes of compounds to the active site of PTPases and that substitution of these functional groups also influenced dephostatin bioactivity. Among the derivatives produced, those having an alkyl side chain bind well to the pharmacological target PTP1B, the alkyl groups essentially functioning as tyrosine mimics. An example of this class of synthetic derivatives

is the Et-3,4-dephostatin (compound 1, Fig. 2), which has been evaluated as an antidiabetic agent [50]. Et-3,4-dephostatin enhanced insulin-related signal transduction and showed antidiabetic activity and no toxicity after oral administration in an animal model. It was found to activate the PI3K-independent pathway leading to Glut4 translocation, thus enhancing cellular glucose uptake and lowering blood glucose levels. Since Et-3,4-dephostatin contains the potentially carcinogenic nitrosamine moiety, nitrosamine-free dephostatin analogues were designed by molecular modeling, using the concept of CH/ π interaction. Methoxime- and hexyl-methoxime-3,4-dephostatin activated insulin-related signal transduction and showed antidiabetic activity *in vivo*, suggesting that the CH/ π interaction molecular design approach may be useful in the design of clinically bioactive molecules [50] for PTP1B inhibition.

A series of novel benzofuran isoxazolines via 1,3-dipolar cycloaddition reaction using karanjin and kanjone (compounds 2 and 3, respectively, Fig. 2) was synthesized by Ahmad et al. [57]. Karanjine was isolated from *Pongamia pinnata* fruits and previously shown to possess antihyperglycemic activity *in vivo*. Based on this property, a novel synthetic strategy to couple the benzofuranoid moiety from active compound 2 to the known PTPase inhibitor isoxazoline pharmacophore was designed. Among the synthesized compounds, analogues 4 and 5 (Fig. 2) displayed promising inhibitory activity against PTP1B (IC_{50} = 80.4 and 79.6 μ M, respectively) when

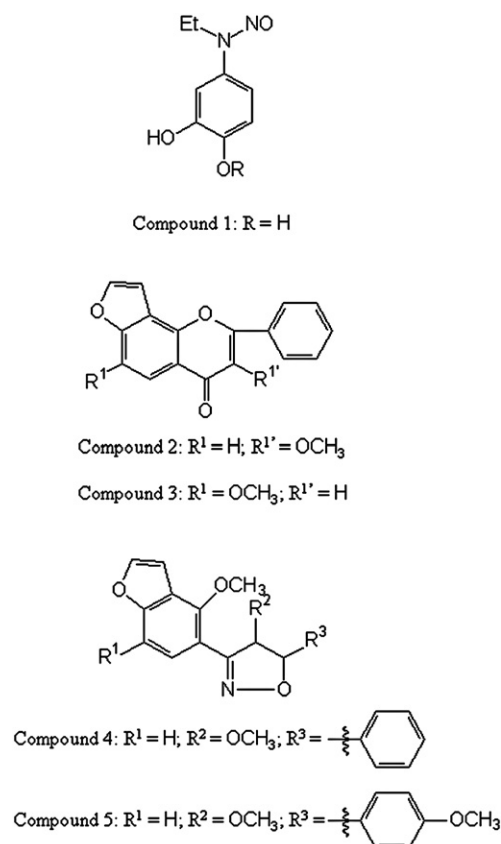


Fig. 2. Natural product-derived PTP inhibitors. Et, ethyl group; Me, methyl group; Ph, phenyl group.

compared to the reference compound sodium vanadate ($IC_{50} = 56.2 \mu M$) [57].

Recently, Wiesmann et al. [58] proposed allosteric inhibition as a promising strategy for selectively targeting PTP1B and enhance insulin signaling in cells. A novel binding site located at $\sim 20 \text{ \AA}$ from the catalytic site was identified through the crystallographic studies of PTP1B/allosteric inhibitor complexes. Allosteric inhibitors binding to this novel site prevent the formation of the active form of the enzyme by blocking mobility of the catalytic loop. The conservative nature of PTP structure arouses hopes that a similar strategy may enable the identification of novel inhibitors for other PTPs.

The strong evidence indicating a relationship between Cdc25 overexpression and oncogenic transformation has stimulated research on the development of inhibitors of this protein class. Progression through the cell cycle is achieved by dephosphorylation and activation of the cyclin-dependent kinases (Cdk) by Cdc25 phosphatases [59]. A number of natural products with diverse chemical structures, as well as their derivatives, have been reported as inhibitors of the dual-specificity phosphatases Cdc25 and VHR (vaccinia virus phosphatase VH1-related protein) [11,59,60]. The sesterterpene dysidiolide (compound 6, Fig. 3), isolated from the marine sponge *Dysidea etheria*, was the first natural inhibitor of the dual specificity phosphatase Cdc25A ($IC_{50} = 9.4 \mu M$), thereby preventing G1/S transition and inducing cell cycle arrest [61]. This was consistent with the observed antitumoral activity *in vitro* at micromolar concentrations [60,61]. The hydrophilic residue γ -hydroxybutenolide of the compound was suggested to act as a phosphate surrogate, whereas the octahydronaphthalene framework occupies a hydrophobic binding pocket of Cdc25A [50,61]. In addition to asymmetric total

synthesis of dysidiolide [62,63], new unnatural derivatives with inhibitory activity against Cdc25A and B were synthesized [62,64,65]. Based on these findings, combinatorial synthesis of dysidiolide analogues was obtained and a library of such analogues was screened against Cdc25C and several tumor cell lines, showing that the anticancer activity of these analogues did not necessarily parallel that of phosphatase inhibition [66,67]. Recent studies have shown that substitution of the hydrophobic residue of dysidiolide with certain steroid framework, by structural hybridization with vitamin D3, generated a new class of potent inhibitors of Cdc25A ($IC_{50} = 0.44\text{--}0.89 \mu M$) [50]. Koch et al. [68] used a different approach for the development of a small library of γ -hydroxybutenolides and closely related α,β -unsaturated five-membered lactones derived from the naturally occurring inhibitor dysidiolide. Exploiting protein structure similarity clustering and natural product frameworks with multiple biological activities, they identified biologically relevant and drug-like ligands for Cdc25A with IC_{50} values that range between 0.35 and 2.3 μM .

Wright et al. [69] isolated a bicyclic, sulphated sesquiterpenoid with an aliphatic chain terminating in a furan (sulfircin – compound 7, Fig. 3) from a deep-water sponge of the genus *Ircinia*, which exhibited phosphatase inhibitory activity against Cdc25A ($IC_{50} = 7.8 \mu M$) and VHR ($IC_{50} = 4.7 \mu M$) [70]. In addition, sulfircin analogues were synthesized in order to study the importance of its three core structures namely, the sesquiterpenoid tricycle, the alkylfuryl moiety and the sulphate group. This study indicated that the length of the aliphatic chain, the sulphate group and the sesquiterpenoid core were crucial for the activity [70].

Some authors have indicated vitamin K and derivatives as potent PTP inhibitors [71–74]. Menadione (Vitamin K₃ – compound 8, Fig. 4) was found to inactivate the Cdc25B ($IC_{50} = 3.6 \mu M$) in an irreversible manner by covalently binding to its active site [72,75]. Moreover, an antiproliferative activity of menadione, either alone or in combination with other antitumor agents, was shown in parental cancer cell lines and their multidrug-resistant derivatives. Its lower level of toxicity *in vivo* compared with other quinone-type chemotherapeutics suggests the potential utility of this agent in cancer therapy [71,76–78].

A number of other PTP inhibitors have been shown to possess a quinone as a functional group, which is capable of redox cycling. In addition, compounds with quinone moieties have demonstrated the highest potency as well as considerable specificity in DSPase screens [59]. Two tricyclic polyketide orthoquinone antibiotics, nocardiones A and B (compounds 9 and 10, respectively, Fig. 4), were found to inhibit the activity of Cdc25B with an IC_{50} of 17 μM , although selectivity over other PTPs was poor. The benzoquinone antibiotics dnacins (compounds 11 and 12, Fig. 4) were isolated from the *Nocardia* strain C-14482 (N-1001). Kinetic analysis indicated that the dnacins modestly inhibited Cdc25B in a non-competitive manner. In addition, a covalent modification of the enzyme by a 1,4-Michael-type nucleophilic addition must occur [79]. Another class of inhibitors which has been explored for its ability

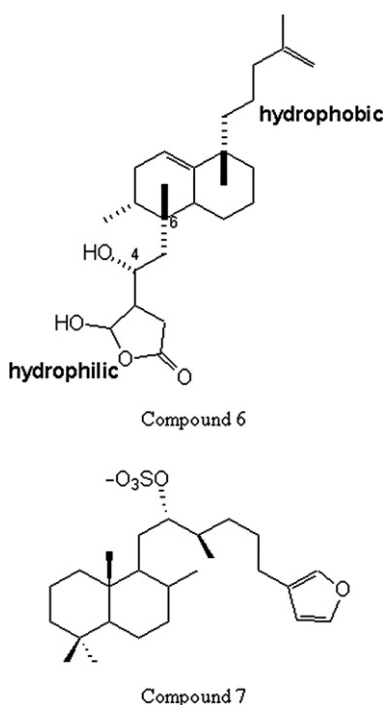


Fig. 3. Natural product-derived PTP inhibitors.

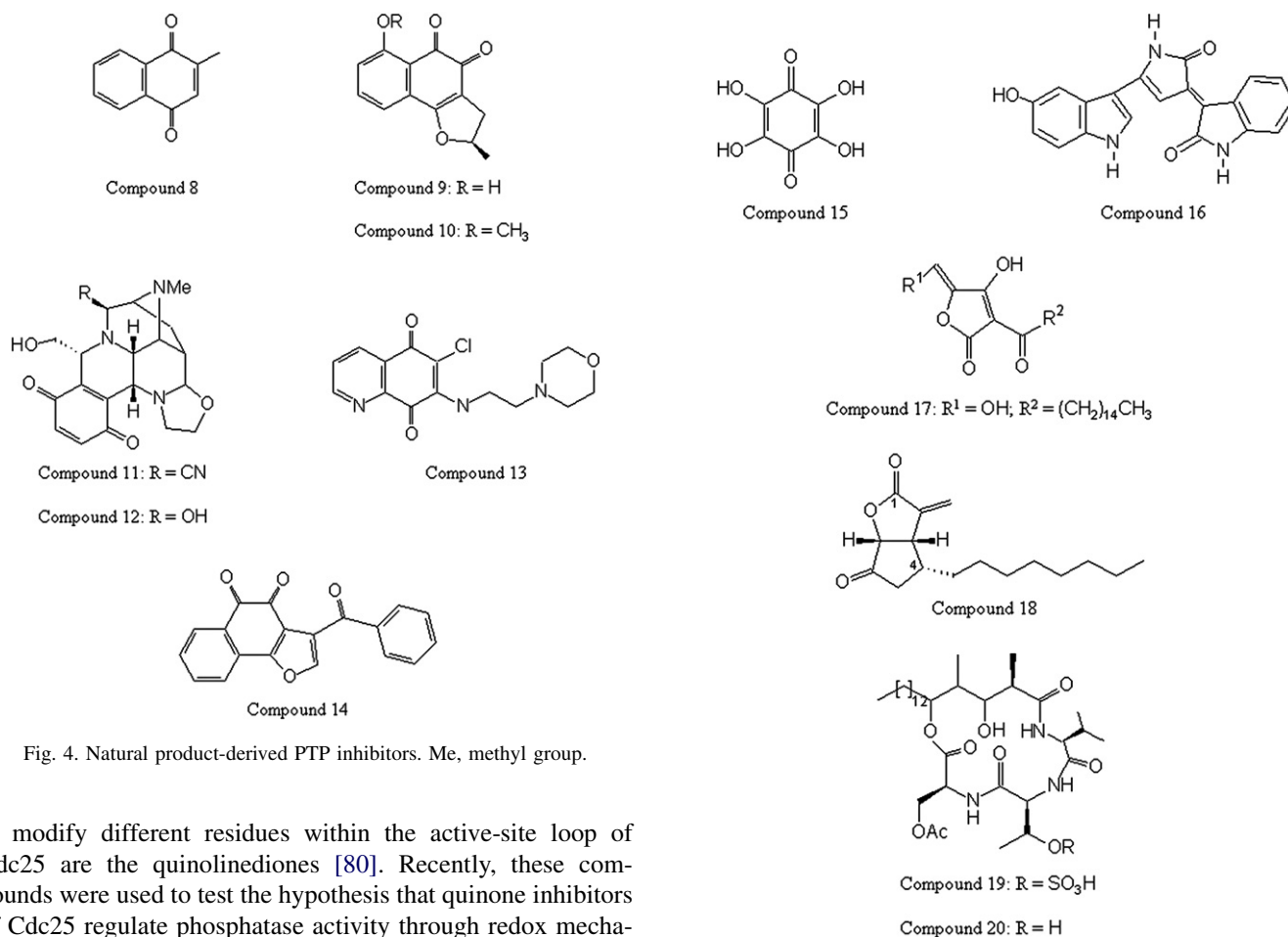


Fig. 4. Natural product-derived PTP inhibitors. Me, methyl group.

to modify different residues within the active-site loop of Cdc25 are the quinolinediones [80]. Recently, these compounds were used to test the hypothesis that quinone inhibitors of Cdc25 regulate phosphatase activity through redox mechanisms [81], showing selective inhibition of Cdc25 phosphatases *in vitro* in an irreversible and time-dependent manner, and cell cycle arrest in the G1 and G2/M phase. In addition, these compounds rapidly induced intracellular reactive oxygen species production. Analysis of Cdc25B by mass spectrometry revealed sulfonic acid formation on the catalytic cysteine of Cdc25B after *in vitro* treatment with compound 13 (Fig. 4), suggesting that irreversible oxidation of the catalytic cysteine of Cdc25B is indeed a mechanism by which these quinolinediones inactivate this protein phosphatase. The newest structurally distinct class of Cdc25 inhibitor with cellular activity described is the naphthofurandione group, which has *in vitro* IC₅₀ values of 2.5–11 μM against recombinant Cdc25 [82]. These compounds cause reversible inhibition of Cdc25B and display competitive inhibitor kinetics. Moreover, docking studies suggest they also bind in the pocket adjacent to the active site. In cell-based assays, the naphthofurandione 3-benzoyl-naphtho[1,2-b]furan-4,5-dione (compound 14, Fig. 4) induced G1/S and G2/M arrest and caused a concomitant increase in the inhibitory phosphorylation of Cdk1.

A series of compounds containing the ortho-quinone functional group were characterized as competitive and reversible inhibitors of the CD45. Cavagis et al. [83] reported that tetrahydroxyquinone (compound 15, Fig. 5) generated the formation of significant amounts of H₂O₂, which was responsible for a reduction in leukemic cell survival. This action was correlated with the inhibition of PTPs. In this same direction,

Fig. 5. Natural product-derived PTP inhibitors. Ac, acetyl group.

violacein (compound 16, Fig. 5), a purple-coloured pigment produced by one of the Amazonian strains of *Chromobacterium violaceum*, caused inhibition of PTPs as observed by the profile of phosphorylated proteins in tyrosine residues, which was higher in HL60 treated cells [84,85]. A series of compounds, namely phenanthrenediones was shown to inhibit CD45 at micromolar concentrations. In addition, they were also active against cathepsin L and S [86].

The hexadecanoyl-5-hydroxymethyl tetronic acid RK-682 (compound 17, Fig. 5), isolated from the *Streptomyces* strain 88-682, was identified as a more potent competitive inhibitor than vanadate toward VHR and CD45. RK-682 also blocked the cell cycle progression at G1 phase in mammalian cells, but not the phosphatase activity of Cdc25B [87]. In fact, RK-682 exhibited some selectivity toward VHR (IC₅₀ = 2.0 μM) over the related enzyme Cdc25B (IC₅₀ > 100 μM) [87,88]. Similar to the benzoquinones (compounds 11 and 12, Fig. 4), RK-682 might also interact with the enzyme by a Michael addition, resulting in a covalent modification of the enzyme. Moreover, structure–activity relationship studies demonstrated that the highly acidic 3-acetyltetronic acid residue of the molecule functions as a phosphate mimic. The alkyl side chain at C3 and the enolic hydroxyl group at C4 were important for VHR inhibition, whereas the hydroxy group at C5 did not

interfere with inhibition [88]. Based on the crystallographic structure of VHR, molecular modeling studies and detailed kinetic analysis, a model in which the acyltetronic acid anion is a phosphate mimic with multiple hydrogen bonds to the active-site loop (Cys124–R 130) was proposed [89]. A second molecule of tetronic acid is involved in the inhibition and interacts with an arginine residue (Arg158) in a second sequence region that is less conserved among various phosphatases. Both alkyl side chains interact with the hydrophobic site of the enzyme [89]. Based on these studies, a dimeric inhibitor was designed. This approach conferred increased inhibitory potency as compared to the natural compound and constitutes a second generation of highly selective PTP inhibitors [88,89].

The 4-isoavenaciolide (compound 18, Fig. 5) was identified as a potent irreversible PTP inhibitor, binding to the SH group of cysteine residues by a Michael addition. This compound was isolated as a stereoisomer of avenaciolide from a fungal strain of *Neosartorya* sp. [90], and it irreversibly inhibits VHR phosphatase activity with an IC_{50} of 1.2 μ M. In addition, 4-isoavenaciolide potently inhibits other non-receptor type phosphatases, such as VHR, Cdc25, and PTP1B, although no effects on receptor type phosphatases (CD45 and LAR [leukocyte common antigen-related]) have been described yet. Detailed investigation of the inhibitory mechanism of 4-isoavenaciolide against VHR showed that two molecules of the compound covalently bind to cysteine residues located in two different fragments of VHR: the catalytic domain (Cys124) and the α helix positioned surface domain (Cys171) [90].

The stevastelins (compounds 19 and 20, Fig. 5), a class of depsipeptides isolated from *Penicillium* spp. [91], have been shown to possess calcineurin-independent immunosuppressive properties and to inhibit the dual-specificity phosphatase VHR, thus promoting cell cycle arrest [7]. Even though compound 19 was more potent against VHR *in vitro* than compound 20 (IC_{50} = 2.7 and 19.8 μ M, respectively), it showed little effect on cellular preparations. These results were attributed to a poor permeability of compound 19 across the cell membrane, whereas the uncharged compound 20 can be activated intracellularly by either sulfatation or phosphorylation of the threonyl hydroxyl group [7,60].

5.2. Peptidomimetics development: a rational concept in the design of PTP inhibitors

Natural products have been a rich source of PTP inhibitors, providing interesting biologically lead compounds for the development of compound libraries with higher selective phosphatase inhibitory activity. However, more rational approaches have focused on the incorporation of phosphotyrosine mimetics into specific peptide templates (peptidomimetic backbones). Interestingly, only recently, the development of selective small-molecule PTP inhibitors has emerged as a growing field of investigation, fostered by the observation that gene disruption of PTP1B acts as a negative regulator of insulin signaling, raising hopes that a small-molecule inhibitor of this PTP would be an effective therapeutic agent [18,92]. Thus, the chemical design of competitive and reversible PTP inhibitors can be

extremely useful in delineating the role of target PTPs in cellular signaling and may constitute a valuable approach for therapeutic development. In this context, *in silico* docking, NMR-based methods, high-throughput crystallization and specific chemistry have been successfully applied in the development of specific small-molecule inhibitors against PTPs [7,93,95,97–99].

Early studies were based on the design of competitive inhibitors that target the active site of PTP1B [1,7,93–97]. A number of mimetic structures containing a nonhydrolyzable phosphotyrosine group have been developed through the replacement of the phosphotyrosyl group by sulfotyrosyl [100], thiophosphoryltyrosyl [101], *o*-dithiophosphoryltyrosyl [102], *o*-boranophosphoryltyrosyl [102], phosphonomethylphenylalanine [Pmp] [103], *o*-malonyltyrosyl [104], fluoro *o*-malonyltyrosyl [105], and difluorophosphonomethylphenylalanine (F₂Pmp) groups [106–108]. The last one showed increased binding affinity due to the hydrogen bonds formed between the fluorines in F₂Pmp and the active site of PTP [106].

Despite their strong PTP inhibitory activity, most polyanionic phosphotyrosine mimetics displayed poor permeability through the cell membrane and are not suitable for cell-based studies or more physiologically relevant settings, such as animal models. In addition, their nondrug-like properties could prevent them from reaching the required level of bioavailability. Therefore, studies have been conducted to develop successful inhibitors able to translate their potencies into desirable *in vivo* effects.

Dufresne et al. [109] have described a series of difluoromethylphosphonate derivatives with IC_{50} values toward PTP1B in the nanomolar range. Even though *in vivo* efficacy in a diet-induced obesity model and oral bioavailability were obtained with compound 21 (Fig. 6), only poor selectivity over the closely related phosphatase T-cell PTP (TCPTP) was observed. Although it is not evident that co-inhibition of TCPTP (with PTP1B) will result in serious adverse effects, mice lacking the TCPTP gene die within 3–5 weeks after birth from defects in hematopoiesis and immune function [110]. Hence, it is highly desirable to design PTP1B inhibitors that are selective over TCPTP as potential therapeutic agents particularly as type 2 diabetes is a chronic disease.

Leung et al. [111] incorporated the difluoromethylenesulfonic acid (F₂Smp) into peptides and compared it with other phosphate mimetics in the same template, such as the F₂Pmp. PTP inhibitors with benzofuran or benzothiophene rings, with IC_{50} values of 20–50 nM and oral glucose lowering effects, were developed by Malamas et al. [112]. Among them, compound 22 (Fig. 6) was identified as a selective PTP1B inhibitor (IC_{50} = 0.32 μ M), having promising *in vivo* activity. It was shown that it normalizes plasma glucose levels after oral administration at 25 mg/kg and intraperitoneal administration at 1 mg/kg. Investigation of the structural interaction between PTP1B and the inhibitor by X-ray crystallographic studies revealed that the carboxylic acid group acts as a phosphate mimic of the substrate, since it binds to two water molecules that bridge the guanidine group of Arg221, which normally bonds the phosphate group of the substrate. The binding of the

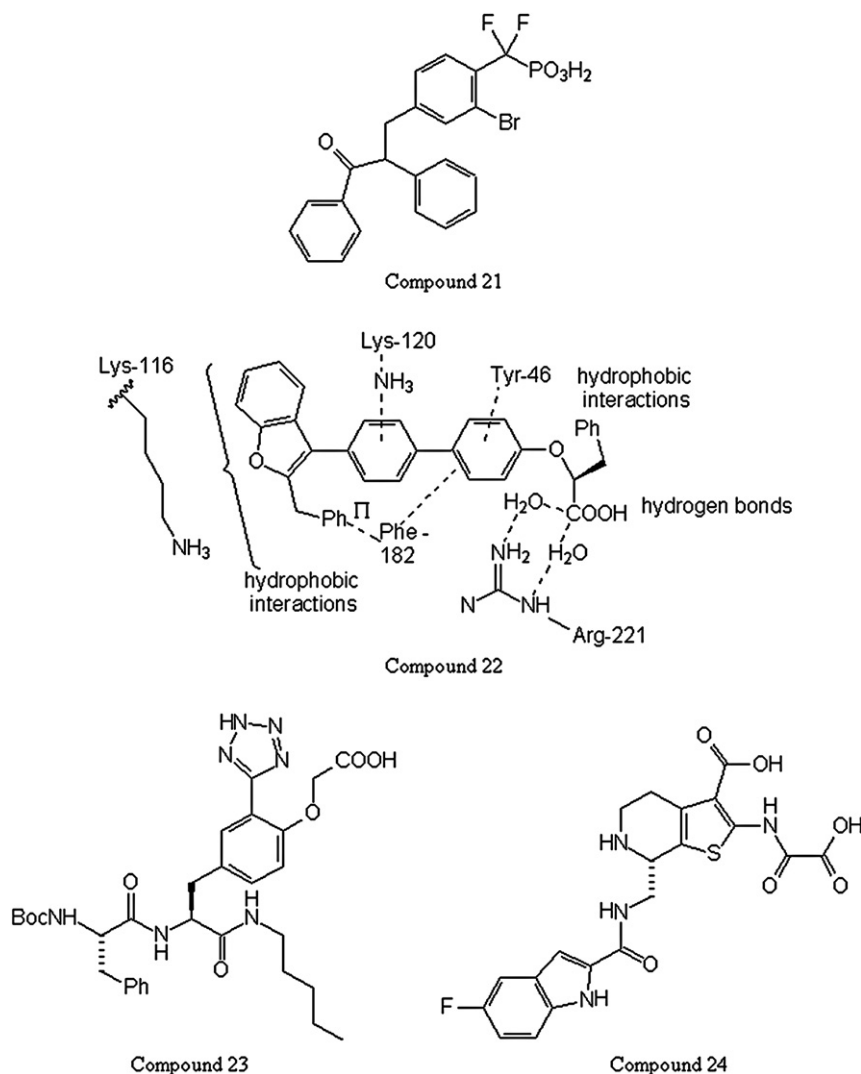


Fig. 6. Synthetic PTP inhibitors. Ph, phenyl group.

biphenyl ring close to the carboxylic acid to Tyr46 and Phe182 resembles the binding of the phenyl ring to phosphotyrosine substrates. Hydrophobic interactions that also contribute to the high affinity of the inhibitor are the bindings of the second biphenyl ring to the ammonium group of Lys120 and the 2-benzyl-benzofuran residue to Lys116 and the aromatic ring of Phe182 [112].

Other researchers reported a series of small-molecule peptidomimetics containing novel phosphotyrosine bioisostere with K_i values against PTP1B in the submicromolar range and improved insulin-stimulated glucose transport by L6 myocytes [113–115]. In order to improve permeability and potency, one carboxylic acid residue of the phosphotyrosine mimic *o*-carboxymethoxybenzoic acid group was replaced by a tetrazole moiety, rendering a tetrazole analogue (compound 23, Fig. 6) that was equipotent to the corresponding dicarboxylic acid ($K_i = 2 \mu\text{M}$). Moreover, the compounds showed selectivity over other PTP enzymes (LAR and SH2 domain-containing phosphatases [SHP2]). The combination of high-throughput screening, X-ray crystallography studies and

rational drug design allowed Novo Nordisk to develop similar phosphotyrosine mimetics, the 2-(oxalylamino)-thiophenecarboxylic acid series, with strong PTP1B inhibition (K_i in the nanomolar range) and good oral bioavailability in rats [116,117]. The PTP1B inhibitor 24 (Fig. 6) has a reported K_i of 18 nM.

A major problem in the design of specific PTP inhibitors is the highly conserved nature of the PTP active site. Kinetic and structural studies of PTP1B with pTyr-containing peptides showed that pTyr alone is not sufficient for high-affinity binding, and that additional binding pockets positioned in the vicinity of the conserved active site may be targeted to enhance affinity and selectivity [16,118–120]. These studies led to the development of more potent and specific bidentate ligands, which interact with both independent sites, the pTyr catalytic site and a peripheral site, which is less conserved among phosphatases [121]. A combinatorial library/high-throughput screening approach was used to yield potent PTP1B inhibitors. This approach has led to the identification of the most potent corresponding nonhydrolyzable phosphate

mimetic (compound 25, Fig. 7) against PTP1B ($K_i = 2.4$ nM), which exhibited exquisite selectivity over other PTPs, including TCPTP (10-fold). This specificity was further confirmed by crystallographic studies of a related analogue bound to PTP1B [122]. Whereas the active-site-targeting phenyldifluoromethylphosphonyl group bound the active site in the expected fashion, the authors found that the aspartic acid linker and the distal difluoromethylphosphonyl group developed interactions mainly with Lys41, Arg47 and Asp48. Finally, cell permeable and fluorescent analogues were synthesized to study PTP1B function in insulin signaling pathways [98]. The results demonstrated that PTP1B inhibitors can act synergistically with insulin to increase the phosphorylation levels of insulin receptor (IR β) and insulin receptor substrate 1 (IRS-1). In addition, the compound also increased activation of Akt and extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 (Erk1/2) either alone or in combination with insulin. Consistent with the positive effect on Akt, the inhibitor also

boosted basal glucose uptake in a dose-dependent manner, in different insulin-sensitive cell lines [98,123].

This same approach was employed by other researchers, which identified an oxalylarylaminobenzoic acid series by NMR-based screening, which inhibited other PTPs such as LAR, SHP2 and CD45 at much higher concentrations [124,125]. Although good phosphatase inhibitors, the compounds showed poor cellular membrane permeability. Therefore, a prodrug approach was used, leading to the identification of a diester (compound 26, Fig. 7), which demonstrated increased insulin-induced protein kinase B phosphorylation of FAO cells [126]. Furthermore, a 30-fold increase in selectivity over TCPTP and no inhibition of other phosphatases (LAR, CD45, Cdc25 and SHP2) up to 300 μ M was obtained when the oxamic acid moiety was replaced by isoxazole carboxylic acid, rendering one of the most selective PTP1B inhibitors (compound 27, Fig. 7) with cellular activity in COS-7 cells, reported to date [127].

Even though a remarkable advance in the development of more potent inhibitors of PTPs was achieved using this strategy, there has been some reservation concerning the issue of selectivity, as some of the residues involved in the binding of the second aryl moiety (especially Arg47) are also present in phosphatases other than PTP1B, in particular TCPTP. Therefore, other structural determinants between PTP1B and TCPTP, which may be exploited alone or in conjunction with other selectivity determinants to increase potency and elicit selectivity, have been targets of research [128]. In this regard, a recent study has successfully exploited the conservative Leu119 (PTP1B) to Val substitution between the two enzymes to synthesize a PTP1B inhibitor (compound 28, Fig. 7) that is an order of magnitude more selective over TCPTP [129]. Structural analyses of PTP1B/inhibitor complexes showed a conformation-assisted inhibition mechanism, *i.e.* the ability to induce an ordered conformation out of the otherwise unstructured loop 110–121 upon the inhibitor binding, as the basis for selectivity. As the structured loop residues 110–121 is positioned fairly close to the active site of PTP1B, targeting Leu119 should facilitate the design and synthesis of selective inhibitors that are less bulky compared to inhibitors designed to target the secondary phosphotyrosine-binding site denoted by Phe52 (PTP1B numbering). Such inhibitors will have a better chance of achieving oral bioavailability, another important issue associated with the design and synthesis of PTP1B inhibitors as therapeutic agents.

6. Concluding remarks

The efficient characterization of more selective and specific small molecules that modulate PTP function *in vitro* and *in vivo* is at the heart of chemical biology and medicinal chemistry research and the development of new therapies and diagnostics for disease. In this review we have presented a few structurally different classes of natural products as well as synthetic molecules that have been described in the literature as PTP inhibitors. If one compares both types of inhibitors, increased interest has been paid to synthetic nonhydrolyzable phosphotyrosine

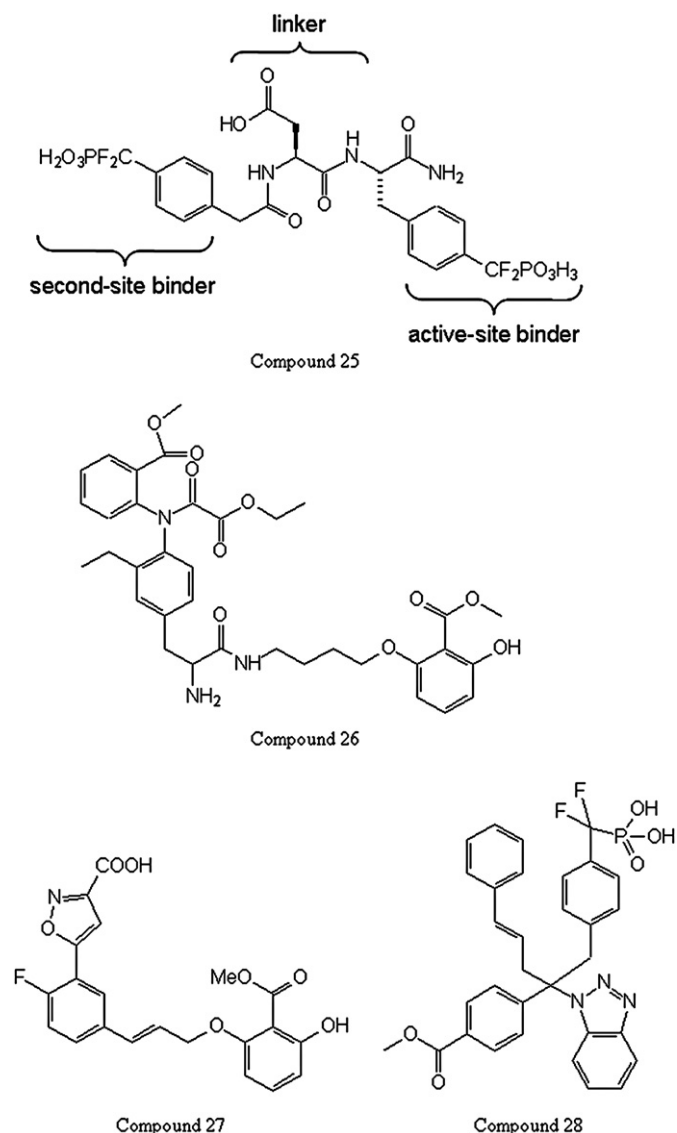


Fig. 7. Synthetic PTP inhibitors. Me, methyl group.

mimetics. However, in most cases these compounds exhibit non-drug-like properties due to the highly charged phosphotyrosine moiety or adjacent binding sites that increase their molecular weight and/or their lipophilicity and could lead to solubility or metabolic problems, thus preventing them from reaching desirable bioavailability [61]. Natural products, on the other hand, may have undesirable structural complexity, being prone to undesired contaminants, and having technical problems with regard to assay development and optimization to be truly competitive with chemical collections [130,131]. Nevertheless, natural products offer a potentially infinity source of chemical diversity unmatched by any synthetic chemical collection or combinatorial chemistry approach and their exploitation have greatly enhanced our understanding of biology, and have led to the development of many of today's drugs [131,132]. Furthermore, the underlying structures of evolutionary selected natural products define structural prerequisites for binding to proteins. Their structural scaffolds represent the biologically relevant and prevalidated fractions of chemical structure space explored by nature so far [132,133]. Consequently, the probability that compound libraries designed to mimic the structures and properties of natural products will be useful is high, and it is also to be expected that natural product-guided compound library design [133,134] will prove to be a rationale key for the identification of small molecules as truly PTP inhibitors for drug development. Additionally, more direct methods that allow the study of the interaction between protein partners in their natural subcellular compartment, as for example recently described for PTP1B and the insulin receptor using bioluminescence or fluorescence resonance energy transfer (BRET and FRET, respectively) [53,135], are promising tools to follow in real time the dynamics of these interactions in the presence of PTP inhibitors.

In summary, the discovery of new natural bioactive molecules, facilitated by a deeper understanding of the nature of the regions of chemical space that are relevant to biology, integrated with the powerful tool of combinatorial chemistry and compound library development will advance our knowledge of biological processes and lead to new strategies to treat disease based on PTP inhibition.

Acknowledgements

Studies conducted by the authors are supported by research grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq). The authors thank Miss E.F. dos Anjos for preparing Figs. 2–7. A.C.S.S., K.C.S.Q. and W.F.Z. have PhD grants from FAPESP (proc. 02/12539-7, 04/12072-7 and 04/14906-2, respectively).

References

- [1] R. Hooft van Huijsduijnen, A. Bombrun, D. Swinnen, Selecting protein tyrosine phosphatases as drug targets, *Drug Discov. Today* 7 (2002) 1013–1019.
- [2] N.K. Tonks, Redox redux: revisiting PTPs and the control of cell signaling, *Cell* 121 (2005) 667–670.
- [3] H. Aoyama, T.M.A. Silva, M.A. Miranda, C.V. Ferreira, Protein tyrosine phosphatases: properties and biological functions, *Quím. Nova* 26 (2003) 896–900.
- [4] G.E. Gee, I.M. Mansuy, Protein phosphatases and their potential implications in neuroprotective processes, *Cell. Mol. Life Sci.* 62 (2005) 1120–1130.
- [5] A. Alonso, J. Sasin, N. Bottini, I. Friedberg, I. Friedberg, A. Osterman, A. Godzik, T. Hunter, J. Dixon, T. Mustelin, Protein tyrosine phosphatases in the human genome, *Cell* 117 (2004) 699–711.
- [6] J.N. Andersen, P.G. Jansen, S.M. Echwald, O.H. Mortensen, T. Fukada, R. Del Vecchio, N.K. Tonks, N.P. Moller, A genomic perspective on protein tyrosine phosphatases: gene structure, pseudogenes, and genetic disease linkage, *FASEB J.* 18 (2004) 8–30.
- [7] L. Bialy, H. Waldmann, Inhibitors of protein tyrosine phosphatases: next-generation drugs? *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 44 (2005) 3814–3839.
- [8] M.J. Wishart, J.E. Dixon, PTEN and myotubularin phosphatases: from 3-phosphoinositide dephosphorylation to disease, *Trends Cell Biol.* 12 (2002) 579–585.
- [9] F. Malentacchi, R. Marzocchini, S. Gelmini, C. Orlando, M. Serio, G. Ramponi, G. Raugei, Up-regulated expression of low molecular weight protein tyrosine phosphatases in different human cancers, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334 (2005) 875–883.
- [10] B.T. Hoffman, M.R. Nelson, K. Burdick, S.M. Baxter, Protein tyrosine phosphatases: strategies for distinguishing proteins in a family containing multiple drug targets and anti-targets, *Curr. Pharm. Des.* 10 (2004) 1161–1181.
- [11] K. Kristjansdottir, J. Rudolph, Cdc25 phosphatases and cancer, *Chem. Biol.* 11 (2004) 1043–1051.
- [12] J.P. Rayapureddi, C. Kattamuri, B.D. Steinmetz, B.J. Frankfort, E.J. Ostrin, G. Mardon, R.S. Hegde, Eyes absent represents a class of protein tyrosine phosphatases, *Nature* 426 (2003) 295–298.
- [13] J.M. Denu, J.A. Stuckey, M.A. Saper, J.E. Dixon, Form and function in protein dephosphorylation, *Cell* 87 (1996) 361–364.
- [14] E.B. Fauman, M.A. Saper, Structure and function of the protein tyrosine phosphatases, *Trends Biochem. Sci.* 21 (1996) 413–417.
- [15] Z.-Y. Zhang, Chemical and mechanistic approaches to the study of protein tyrosine phosphatases, *Acc. Chem. Res.* 36 (2003) 385–392.
- [16] Z.-Y. Zhang, Structure, mechanism, and specificity of protein-tyrosine phosphatases, *Curr. Top. Cell. Regul.* 35 (1997) 21–68.
- [17] L. Tautz, M. Pellecchia, T. Mustelin, Targeting the PTPome in human disease, *Expert Opin. Ther. Targets* 10 (2006) 157–177.
- [18] L.D. Klaman, O. Boss, O.D. Peroni, J.K. Kim, J.L. Martino, J.M. Zabolotny, N. Moghal, M. Lubkin, Y.B. Kim, A.H. Sharpe, A. Stricker-Krongrad, G.I. Shulman, B.G. Neel, B.B. Kahn, Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice, *Mol. Cell. Biol.* 20 (2000) 5479–5489.
- [19] J.M. Zabolotny, K.K. Bence-Hanulec, A. Stricker-Krongrad, F. Haj, Y. Wang, Y. Minokoshi, Y.B. Kim, J.K. Elmquist, L.A. Tartaglia, B.B. Kahn, B.G. Neel, PTP1B regulates leptin signal transduction *in vivo*, *Dev. Cell* 2 (2002) 489–495.
- [20] T. Mustelin, T. Van, N. Bottini, Protein tyrosine phosphatases and the immune response, *Nat. Rev. Immunol.* 5 (2005) 43–57.
- [21] M. Tartaglia, E.L. Mehler, R. Goldberg, G. Zampino, H.G. Brunner, H. Kremer, I. van der Burgt, A.H. Crosby, A. Ion, S. Jeffery, K. Kalidas, M.A. Patton, R.S. Kucherlapati, B.D. Gelb, Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome, *Nat. Genet.* 29 (2001) 465–468.
- [22] R. Xu, Y. Yu, S. Zheng, X. Zhao, Q. Dong, Z. He, Y. Liang, Q. Lu, Y. Fang, X. Gan, X. Xu, S. Zhang, Q. Dong, X. Zhang, G.S. Feng, Overexpression of Shp2 tyrosine phosphatase is implicated in leukemogenesis in adult human leukemia, *Blood* 106 (2005) 3142–3149.
- [23] M. Bentires-Alj, J.G. Paez, F.S. David, H. Keilhack, B. Halmos, K. Naoki, J.M. Maris, A. Richardson, A. Bardelli, D.J. Sugarbaker, W.G. Richards, J. Du, L. Girard, J.D. Minna, M.L. Loh, D.E. Fisher, V.E. Velculescu, B. Vogelstein, M. Meyerson, W.R. Sellers, B.G. Neel, Activating mutations of the Noonan syndrome-associated

- SHP2/PTPN11 gene in human solid tumors and adult acute myelogenous leukemia, *Cancer Res.* 64 (2004) 8816–8820.
- [24] N. Bottini, L. Musumeci, A. Alonso, S. Rahmouni, K. Nika, M. Rostamkhani, J. MacMurray, G.F. Meloni, P. Lucarelli, M. Pellecchia, G.S. Fisenbarth, D. Comings, T. Mustelin, A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type 1 diabetes, *Nat. Genet.* 36 (2004) 337–338.
- [25] A.B. Begovich, V.E. Carlton, L.A. Honigberg, S.J. Schrod, A.P. Chokkalingam, H.C. Alexander, K.G. Ardlie, Q. Huang, A.M. Smith, J.M. Spoerke, M.T. Conn, M. Chang, S.Y. Chang, R.K. Saiki, J.J. Catanese, D.U. Leong, V.E. Garcia, L.B. MacAllister, D.A. Jeffery, A.T. Lee, F. Batliwalla, E. Remmers, L.A. Criswell, M.F. Seldin, D.L. Kastner, C.I. Amos, J.J. Sninsky, P.K. Gregersen, A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (*PTPN22*) is associated with rheumatoid arthritis, *Am. J. Hum. Genet.* 75 (2004) 330–337.
- [26] C. Kyogoku, C.D. Langefeld, W.A. Ortmann, A. Lee, S. Selby, V.E. Carlton, M. Chang, P. Ramos, E.C. Baechler, F.M. Batliwalla, J. Novitzke, A.H. Williams, C. Gillett, P. Rodine, R.R. Graham, K.G. Ardlie, P.M. Gaffney, K.L. Moser, M. Petri, A.B. Begovich, P.K. Gregersen, T.W. Behrens, Genetic association of the R620W polymorphism of protein tyrosine phosphatase *PTPN22* with human SLE, *Am. J. Hum. Genet.* 75 (2004) 504–507.
- [27] D. Smyth, J.D. Cooper, J.E. Collins, J.M. Heward, J.A. Franklyn, J.M. Howson, A. Vella, S. Nutland, H.E. Rance, L. Maier, B.J. Barratt, C. Guja, C. Ionescu-Tirgoviste, D.A. Savage, D.B. Dunger, B. Widmer, D.P. Strachan, S.M. Ring, N. Walker, D.G. Clayton, R.C. Twells, S.C. Gough, J.A. Todd, Replication of an association between the lymphoid tyrosine phosphatase locus (*LYP/PTPN22*) with type 1 diabetes, and evidence for its role as a general autoimmune locus, *Diabetes* 53 (2004) 3020–3023.
- [28] R. Hermann, K. Lipponen, M. Kiviniemi, T. Kakko, R. Veijola, O. Simell, M. Knip, J. Ilonen, Lymphoid tyrosine phosphatase (*LYP/PTPN22*) Arg620Trp variant regulates insulin autoimmunity and progression to type 1 diabetes, *Diabetologia* 49 (2006) 1198–1208.
- [29] N. Bottini, A. Otsu, P. Borgiani, P. Saccucci, L. Stefanini, E. Greco, L. Fontana, J.M. Hopkins, X.Q. Mao, Genetic control of serum IgE levels: a study of low molecular weight protein tyrosine phosphatase, *Clin. Genet.* 63 (2003) 228–231.
- [30] A. Schmidt, S.J. Rutledge, N. Endo, E.E. Opas, H. Tanaka, G. Wesolowsky, C.T. Leu, Z. Huang, C. Ramachandran, S.B. Rodan, G.A. Rodan, Protein-tyrosine phosphatase activity regulates osteoclast formation and function: inhibition by alendronate, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 (1996) 3068–3073.
- [31] S.M. Suhr, S. Pamula, D.J.K.H. Baylink, Antisense oligodeoxynucleotide evidence that a unique osteoclastic protein-tyrosine phosphatase is essential for osteoclastic resorption, *J. Bone Miner. Res.* 16 (2001) 1795–1803.
- [32] A. Östman, C. Hellberg, F.D. Böhmer, Protein tyrosine phosphatases and cancer, *Nat. Rev. Cancer* 6 (2006) 307–320.
- [33] M. Sattler, M.G. Mohi, Y.B. Pride, L.R. Quinlan, N.A. Malouf, K. Podar, F. Gesbert, H. Iwasaki, S. Li, R.A. Van Etten, H. Gu, J.D. Griffin, B.G. Neel, Critical role for *Gab2* in transformation by BCR–ABL, *Cancer Cell* 1 (2002) 479–492.
- [34] Y. Zhan, D.M. O'Rourke, SHP-2-dependent mitogen-activated protein kinase activation regulates EGFRvIII but not wild-type epidermal growth factor receptor phosphorylation and glioblastoma cell survival, *Cancer Res.* 64 (2004) 8292–8298.
- [35] Y.M. Agazie, N. Movilla, I. Ischenko, M.J. Hayman, The phosphotyrosine phosphatase SHP2 is a critical mediator of transformation induced by the oncogenic fibroblast growth factor receptor 3, *Oncogene* 22 (2003) 6909–6918.
- [36] M. Hatakeyama, Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein, *Nat. Rev. Cancer* 4 (2004) 688–694.
- [37] K. Tabiti, D.R. Smith, H.S. Goh, C.J. Pallen, Increased mRNA expression of the receptor-like protein tyrosine phosphatase alpha in late stage colon carcinomas, *Cancer Lett.* 93 (1995) 239–248.
- [38] E. Ardini, R. Agresti, E. Tagliabue, M. Greco, P. Aiello, L.T. Yang, S. Menard, J. Sap, Expression of protein tyrosine phosphatase alpha (*RPTPalpha*) in human breast cancer correlates with low tumor grade, and inhibits tumor cell growth *in vitro* and *in vivo*, *Oncogene* 19 (2000) 4979–4987.
- [39] Z. Wang, D. Shen, D.W. Parsons, A. Bardelli, J. Sager, S. Szabo, J. Ptak, N. Silliman, B.A. Peters, M.S. van der Heijden, G. Parmigiani, H. Yan, T.L. Wang, G. Riggins, S.M. Powell, J.K. Willson, S. Markowitz, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, V.E. Velculescu, Mutational analysis of the tyrosine phosphatome in colorectal cancers, *Science* 304 (2004) 1164–1166.
- [40] M.M. Keane, G.A. Lowrey, S.A. Ettenberg, M.A. Dayton, S. Lipkowitz, The protein tyrosine phosphatase DEP-1 is induced during differentiation and inhibits growth of breast cancer cells, *Cancer Res.* 56 (1996) 4236–4243.
- [41] F. Trapasso, R. Iuliano, A. Boccia, A. Stella, R. Visconti, P. Bruni, G. Baldassarre, M. Santoro, G. Viglietto, A. Fusco, Rat protein tyrosine phosphatase eta suppresses the neoplastic phenotype of retrovirally transformed thyroid cells through the stabilization of p27Kip1, *Mol. Cell. Biol.* 20 (2000) 9236–9246.
- [42] R. Iuliano, F. Trapasso, I. Le Pera, F. Schepis, I. Sama, A. Clodmiro, K.R. Dumon, M. Santoro, L. Chiariotti, G. Viglietto, A. Fusco, An adenovirus carrying the rat protein tyrosine phosphatase ϵ suppresses the growth of human thyroid carcinoma cell lines *in vitro* and *in vivo*, *Cancer Res.* 63 (2003) 882–886.
- [43] F. Trapasso, S. Yendamuri, K.R. Dumon, R. Iuliano, R. Cesari, B. Feig, R. Seto, L. Infante, H. Ishii, A. Vecchione, M.J. Dering, C.M. Croce, A. Fusco, Restoration of receptor-type protein tyrosine phosphatase ϵ function inhibits human pancreatic carcinoma cell growth *in vitro* and *in vivo*, *Carcinogenesis* 25 (2004) 2107–2114.
- [44] M. Kovalenko, K. Denner, J. Sandstrom, C. Persson, S. Gross, E. Jandt, R. Vilella, F. Bohmer, A. Ostman, Site-selective dephosphorylation of the platelet-derived growth factor β -receptor by the receptor-like protein-tyrosine phosphatase DEP-1, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 16219–16226.
- [45] Q. Zhang, P.N. Raghunath, E. Vonderheid, N. Odum, M.A. Wasik, Lack of phosphotyrosine phosphatase SHP-1 expression in malignant T-cell lymphoma cells results from methylation of the SHP-1 promoter, *Am. J. Pathol.* 157 (2000) 1137–1146.
- [46] T. Oka, M. Ouchida, M. Koyama, Y. Ogama, S. Takada, Y. Nakatani, T. Tanaka, T. Yoshino, K. Hayashi, N. Ohara, E. Kondo, K. Takahashi, J. Tsuchiyama, M. Tanimoto, K. Shimizu, T. Akagi, Gene silencing of the tyrosine phosphatase *SHP1* gene by aberrant methylation in leukemias/lymphomas, *Cancer Res.* 62 (2002) 6390–6394.
- [47] J.D. Khoury, G.Z. Rassidakis, L.J. Medeiros, H.M. Amin, R. Lai, Methylation of *SHP1* gene and loss of SHP1 protein expression are frequent in systemic anaplastic large cell lymphoma, *Blood* 104 (2004) 1580–1581.
- [48] C.S. Chim, T.K. Fung, W.C. Cheung, R. Liang, Y.L. Kwong, *SOCS1* and *SHP1* hypermethylation in multiple myeloma: implications for epigenetic activation of the Jak–STAT pathway, *Blood* 103 (2004) 4630–4635.
- [49] G.Z. Justo, C.V. Ferreira, Coagulation and cancer therapy: the potential of natural compounds, *Curr. Genom.* 6 (2005) 461–466.
- [50] K. Umezawa, M. Kawakami, T. Watanabe, Molecular design and biological activities of protein-tyrosine phosphatase inhibitors, *Pharmacol. Ther.* 99 (2003) 15–24.
- [51] R. Shimazawa, T. Suzuki, K. Dodo, R. Shirai, Design and synthesis of dysidiolide analogs from vitamin D3: novel class of Cdc25A inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14 (2004) 3291–3294.
- [52] E. Asante-Appiah, B.P. Kennedy, Protein tyrosine phosphatases: the quest for negative regulators of insulin action, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 284 (2003) E663–E670.
- [53] Y. Romsicki, M. Reece, J.-Y. Gauthier, E. Asante-Appiah, B.P. Kennedy, Protein tyrosine phosphatase-1B dephosphorylation of the insulin receptor occurs in a perinuclear endosome compartment in human embryonic kidney 293 cells, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 12868–12875.
- [54] R. Hoof van Huijsduijnen, W.H. Sauer, A. Bombrun, D. Swinnen, Prospects for inhibitors of protein tyrosine phosphatase 1B as antidiabetic drugs, *J. Med. Chem.* 47 (2004) 4142–4146.

- [55] M. Imoto, H. Kakeya, T. Sawa, C. Hayashi, M. Hamada, T. Takeuchi, K. Umezawa, Dephostatin, a novel protein tyrosine phosphatase inhibitor produced by *Streptomyces*. I. Taxonomy, isolation, and characterization, *J. Antibiot.* 46 (1993) 1342–1346.
- [56] H. Kakeya, M. Imoto, Y. Takahashi, H. Naganawa, T. Takeuchi, K. Umezawa, Dephostatin, a novel protein tyrosine phosphatase inhibitor produced by *Streptomyces*. II. Structure determination, *J. Antibiot.* 46 (1993) 1716–1719.
- [57] G. Ahmad, P.K. Mishra, P. Gupta, P.P. Yadav, P. Tiwari, A.K. Tamrakar, A.K. Srivastava, R. Maurya, Synthesis of novel benzofuran isoxazolines as protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16 (2006) 2139–2143.
- [58] C. Wiesmann, K.J. Barr, J. Kung, J. Zhu, D.A. Erlanson, W. Shen, B.J. Fahr, M. Zhong, L. Taylor, M. Randal, R.S. McDowell, S.K. Hansen, Allosteric inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11 (2004) 730–737.
- [59] A.P. Ducruet, A. Vogt, P. Wipf, J.S. Lazo, Dual specificity protein phosphatases: therapeutic targets for cancer and Alzheimer's disease, *Annu. Rev. Med.* 45 (2005) 725–750.
- [60] M.A. Lyon, A.P. Ducruet, P. Wipf, J.S. Lazo, Dual-specificity phosphatases as targets for antineoplastic agents, *Nature Rev. Drug Discov.* 1 (2002) 961–976.
- [61] S.P. Gunasekera, P.J. McCarthy, M. Kelly-Borges, E. Lobkovsky, J. Clardy, Dysidiolide: a novel protein phosphatase inhibitor from the Caribbean sponge *Dysidea etheria* de Laubenfels, *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 8759–8760.
- [62] M. Takahashi, K. Dodo, Y. Sugimoto, Y. Aoyagi, Y. Yamada, Y. Hashimoto, R. Shirai, Synthesis of the novel analogues of dysidiolide and their structure-activity relationship, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 10 (2000) 2571–2574.
- [63] H. Miyaoka, Y. Kajiwara, Y. Hara, Y. Yamada, Total synthesis of natural dysidiolide, *J. Org. Chem.* 66 (2001) 1429–1435.
- [64] K. Dodo, M. Takahashi, Y. Yamada, Y. Sugimoto, Y. Hashimoto, R. Shirai, Synthesis of a novel class of cdc25A inhibitors from vitamin D₃, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 10 (2000) 615–617.
- [65] H. Peng, W. Xie, D.M. Otterness, J.P. Cogswell, R.T. McConnell, H.L. Carter, G. Powis, R.T. Abraham, L.H. Zalkow, Syntheses and biological activities of a novel group of steroidal derived inhibitors for human Cdc25A protein phosphatase, *J. Med. Chem.* 44 (2001) 834–848.
- [66] D. Brohm, S. Metzger, A. Bhargava, O. Muller, F. Lieb, H. Waldmann, Natural products are biologically validated starting points in structural space for compound library development: solid-phase synthesis of dysidiolide-derived phosphatase inhibitors, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 41 (2002) 307–311.
- [67] D. Brohm, N. Philippe, S. Metzger, A. Bhargava, O. Muller, F. Lieb, H. Waldmann, Solid-phase synthesis of dysidiolide-derived protein phosphatase inhibitors, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 13171–13178.
- [68] M.A. Koch, L.O. Wittenberg, S. Basu, D.A. Jeyaraj, E. Gourzoulidou, K. Reinecke, A. Odermatt, H. Waldmann, Compound library development guided by protein structure similarity clustering and natural product structure, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (2004) 16721–16726.
- [69] A.E. Wright, P.J. McCarthy, G.K. Schulte, Sulfircin – a new sesterterpene sulfate from a deep-water sponge of the genus *Ircinia*, *J. Org. Chem.* 54 (1989) 3472–3474.
- [70] R.E. Cebula, J.L. Blanchard, M.D. Boisclair, K. Pal, N.J. Bockovich, Synthesis and phosphatase inhibitory activity of analogs of sulfircin, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 7 (1997) 2015–2020.
- [71] Y. Nishikawa, Z. Wang, J. Kerns, C.S. Wilcox, B.I. Carr, Inhibition of hepatoma cell growth in vitro by arylating and non-aryllating K vitamin analogs. Significance of protein tyrosine phosphatase inhibition, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 34803–34810.
- [72] K. Tamura, E.C. Southwick, J. Kerns, K. Rosi, B.I. Carr, C. Wilcox, J.S. Lazo, Cdc25 inhibition and cell cycle arrest by a synthetic thioalkyl vitamin K analogue, *Cancer Res.* 60 (2000) 1317–1325.
- [73] B.I. Carr, Z. Wang, S. Kar, K. vitamins, PTP antagonism, and cell growth arrest, *J. Cell. Physiol.* 193 (2002) 263–274.
- [74] M.P. Brun, E. Braud, D. Angotti, O. Mondesert, M. Quaranta, M. Montes, M. Miteva, N. Gresh, B. Ducommun, C. Garbay, Design, synthesis, and biological evaluation of novel naphthoquinone derivatives with CDC25 phosphatase inhibitory activity, *Bioorg. Med. Chem.* 13 (2005) 4871–4879.
- [75] S.W. Ham, J. Park, S.J. Lee, W. Kim, K. Kang, K.H. Choi, Naphthoquinone analogs as inactivators of cdc25 phosphatase, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8 (1998) 2507–2510.
- [76] K.N. Prasad, J. Edwards-Prasad, A. Sakamoto, Vitamin K3 (menadione) inhibits the growth of mammalian tumor cells in culture, *Life Sci.* 29 (1981) 1387–1392.
- [77] V. Noto, H.S. Taper, Y.H. Jiang, J. Janssens, J. Bonte, W. De Loecker, Effects of sodium ascorbate (vitamin C) and 2-methyl-1,4-naphthoquinone (vitamin K3) treatment on human tumor cell growth *in vitro*. I. Synergism of combined vitamin C and K3 action, *Cancer* 63 (1989) 901–906.
- [78] L.M. Nutter, A.L. Cheng, H.L. Hung, R.K. Hsieh, E.O. Ngo, T.W. Liu, Menadione: spectrum of anticancer activity and effects on nucleotide metabolism in human neoplastic cell lines, *Biochem. Pharmacol.* 41 (1991) 1283–1292.
- [79] T. Horiguchi, K. Nishi, S. Hakoda, S. Tanida, A. Nagata, H. Okayama, Dnacin A1 and dnacin B1 are antitumor antibiotics that inhibit cdc25B phosphatase activity, *Biochem. Pharmacol.* 48 (1994) 2139–2141.
- [80] L. Pu, A.A. Amoscato, M.E. Bier, J.S. Lazo, Dual G1 and G2 phase inhibition by a novel, selective Cdc25 inhibitor 6-chloro-7-(2-morpholin-4-ylethylamino)-quinoline-5,8-dione, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 46877–46885.
- [81] M. Brisson, T. Nguyen, P. Wipf, B. Joo, B.W. Day, J.S. Skoko, E.M. Schreiber, C. Foster, P. Bansal, J.S. Lazo, Redox regulation of Cdc25B by cell-active quinolinediones, *Mol. Pharmacol.* 68 (2005) 1810–1820.
- [82] M. Brisson, T. Nguyen, A. Vogt, J. Yalowich, A. Giorgianni, D. Tobi, I. Bahar, C.R. Stephenson, P. Wipf, J.S. Lazo, Discovery and characterization of novel small molecule inhibitors of human Cdc25B dual specificity phosphatase, *Mol. Pharmacol.* 66 (2004) 824–833.
- [83] A.D.M. Cavagis, C.V. Ferreira, H.H. Versteeg, C.F. Assis, C.L. Bos, A.S. Bleuming, S.H. Diks, H. Aoyama, M.P. Peppelenbosch, Tetrahydroquinone induces apoptosis of leukaemia cells through diminished survival signalling, *Exp. Hematol.* 34 (2006) 188–196.
- [84] C.V. Ferreira, C.L. Bos, H.H. Versteeg, G.Z. Justo, N. Durán, M.P. Peppelenbosch, Molecular mechanism of violacein-mediated human leukemia cell death, *Blood* 104 (2004) 1459–1464.
- [85] N. Bromberg, G.Z. Justo, M. Haun, N. Durán, C.V. Ferreira, Violacein cytotoxicity on human blood lymphocytes and effect in protein phosphatases, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 20 (2005) 449–454.
- [86] R.A. Urbanek, S.J. Suchard, G.B. Steelman, K.S. Knappenberger, L.A. Sygowski, C.A. Veale, M.J. Chapdelaine, Potent reversible inhibitors of the protein tyrosine phosphatase CD45, *J. Med. Chem.* 44 (2001) 1777–1793.
- [87] T. Hamaguchi, T. Sudo, H. Osada, RK-682, a potent inhibitor of tyrosine phosphatase, arrested the mammalian cell cycle progression at G phase, *FEBS Lett.* 372 (1995) 54–58.
- [88] M. Sodeoka, R. Sampe, S. Kojima, Y. Baba, T. Usui, K. Ueda, H.J. Osada, Synthesis of a tetronic acid library focused on inhibitors of tyrosine and dual-specificity protein phosphatases and its evaluation regarding VHR and cdc25B inhibition, *J. Med. Chem.* 44 (2001) 3216–3222.
- [89] T. Usui, S. Kojima, S. Kidokoro, K. Ueda, H. Osada, M. Sodeoka, Design and synthesis of a dimeric derivative of RK-682 with increased inhibitory activity against VHR, a dual-specificity ERK phosphatase: implications for the molecular mechanism of the inhibition, *Chem. Biol.* 8 (2001) 1209–1220.
- [90] K. Ueda, T. Usui, H. Nakayama, M. Ueki, K. Takio, M. Ubukata, H. Osada, 4-Isoavenaciolide covalently binds and inhibits VHR, a dual-specificity phosphatase, *FEBS Lett.* 525 (2002) 48–52.
- [91] T. Morino, M. Nishimoto, N. Itou, T. Nishikiori, NK372135s, novel antifungal agents produced by *Neosartoria fischeri*, *J. Antibiot.* 47 (1994) 1546–1548.
- [92] M. Elchebly, P. Payette, E. Michaliszyn, W. Cromlish, S. Collins, A.L. Loy, D. Normandin, A. Cheng, J. Himms-Hagen, C.C. Chan,

- C. Ramachandran, M.J. Gresser, M.L. Tremblay, B.P. Kennedy, Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene, *Science* 283 (1999) 1544–1548.
- [93] J.F. Tobin, S. Tam, Recent advances in the development of small molecule inhibitors of PTP1B for the treatment of insulin resistance and type 2 diabetes, *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 5 (2002) 500–512.
- [94] Z.-Y. Zhang, Protein tyrosine phosphatases: structure and function, substrate specificity, and inhibitor development, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 42 (2002) 209–234.
- [95] Z.-Y. Zhang, Functional studies of protein tyrosine phosphatases with chemical approaches, *Biochim. Biophys. Acta* 1754 (2005) 100–107.
- [96] Z. Pei, G. Liu, T.H. Lubben, B.G. Szczepankiewicz, Inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B as a potential treatment of diabetes and obesity, *Curr. Pharm. Des.* 10 (2004) 3481–3504.
- [97] X. Espanel, R. Hoof van Huijsduijnen, Applying the SPOT peptide synthesis procedure to the study of protein tyrosine phosphatase substrate specificity: probing for the heavenly match *in vitro*, *Methods* 35 (2005) 64–72.
- [98] S. Kumar, F. Liang, D.S. Lawrence, Z.-Y. Zhang, Small molecule approach to studying protein tyrosine phosphatase, *Methods* 35 (2005) 9–21.
- [99] L. Tautz, S. Bruckner, S. Sareth, A. Alonso, J. Bogetz, N. Bottini, M. Pellecchia, T. Mustelin, Inhibition of *Yersinia* tyrosine phosphatase by furanyl salicylate compounds, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 9400–9408.
- [100] A.S. Liotta, H.K. Kole, H.M. Fales, J. Roth, M. Bernier, A synthetic tris-sulfonyl dodecapeptide analogue of the insulin receptor 1146-kinase domain inhibits tyrosine dephosphorylation of the insulin receptor *in situ*, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 22996–23001.
- [101] K.T. Hiriyanna, W.R. Buck, S.S. Shen, T.S. Ingebritsen, Thiophosphorylated RCM-lysozyme, an active site-directed protein tyrosine phosphatase inhibitor, inhibits G2/M transition during mitotic cell cycle and uncouples MPF activation from G2/M transition, *Exp. Cell. Res.* 216 (1995) 21–29.
- [102] K.E. Jenkins, A.P. Higson, P.H. Seeberger, M.H. Caruthers, Solid-phase synthesis and biochemical studies of O-boranophosphopeptides and O-dithiophosphopeptides, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 6584–6593.
- [103] I. Marseigne, A. Dor, D. Begue, M. Reibaud, J.L. Zundel, J.C. Blanchard, D. Pelaprat, B.P. Roques, Synthesis and biological activity of CCK26-33-related analogues modified in position 31, *J. Med. Chem.* 31 (1988) 966–970.
- [104] H.K. Kole, M. Akamatsu, B. Ye, X. Yan, D. Barford, P.P. Roller, T.R. Burke Jr., Protein-tyrosine phosphatase inhibition by a peptide containing the phosphotyrosyl mimetic, L-O-malonyltyrosine, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 209 (1995) 817–822.
- [105] T.R. Burke Jr., B. Ye, M. Akamatsu, H. Ford Jr., X. Yan, H.K. Kole, G. Wolf, S.E. Shoelson, P.P. Roller, 4'-O-[2-(2-fluoromalonyl)]-L-tyrosine: a phosphotyrosyl mimic for the preparation of signal transduction inhibitory peptides, *J. Med. Chem.* 39 (1996) 1021–1027.
- [106] T.R. Burke Jr., H.K. Kole, P.P. Roller, Potent inhibition of insulin receptor dephosphorylation by a hexamer peptide containing the phosphotyrosyl mimetic F2Pmp, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204 (1994) 129–134.
- [107] L. Chen, L. Wu, A. Otaka, M.S. Smyth, P.P. Roller, T.R. Burke Jr., J. den Hertog, Z.-Y. Zhang, Why is phosphonodifluoromethyl phenylalanine a more potent inhibitory moiety than phosphonomethyl phenylalanine toward protein-tyrosine phosphatases? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 216 (1995) 976–984.
- [108] S. Desmarais, R.W. Friesen, R. Zamboni, C. Ramachandran, [Difluoro (phosphono)methyl]phenylalanine-containing peptide inhibitors of protein tyrosine phosphatases, *Biochem. J.* 337 (Pt 2) (1999) 219–223.
- [109] C. Dufresne, P. Roy, Z. Wang, E. Asante-Appiah, W. Cromlish, Y. Boie, F. Forghani, S. Desmarais, Q. Wang, K. Skorey, D. Waddleton, C. Ramachandran, B.P. Kennedy, L. Xu, R. Gordon, C.C. Chan, Y. Leblanc, The development of potent non-peptidic PTP-1B inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14 (2004) 1039–1042.
- [110] K.E. You-Ten, E.S. Muise, A. Itie, E. Michaliszyn, J. Wagner, S. Jothy, W.S. Lapp, M.L. Tremblay, Impaired bone marrow microenvironment and immune function in T cell protein tyrosine phosphatase-deficient mice, *J. Exp. Med.* 186 (1997) 683–693.
- [111] C. Leung, J. Grzyb, J. Lee, N. Meyer, G. Hum, C. Jia, S. Liu, S.D. Taylor, The difluoromethylenesulfonic acid group as a monoanionic phosphate surrogate for obtaining PTP1B inhibitors, *Bioorg. Med. Chem.* 10 (2002) 2309–2323.
- [112] M.S. Malamas, J. Sredy, C. Moxham, A. Katz, W. Xu, R. McDevitt, F.O. Adebayo, D.R. Sawicki, L. Seestaller, D. Sullivan, J.R. Taylor, Novel benzofuran and benzothiophene biphenyls as inhibitors of protein tyrosine phosphatase 1B with antihyperglycemic properties, *J. Med. Chem.* 43 (2000) 1293–1310.
- [113] J.E. Bleasdale, D. Ogg, B.J. Palazuk, C.S. Jacob, M.L. Swanson, X.Y. Wang, D.P. Thompson, R.A. Conradi, W.R. Mathews, A.L. Laborde, C.W. Stuchly, A. Heijbel, K. Bergdahl, C.A. Bannow, C.W. Smith, C. Svensson, C. Liljebriis, H.J. Schostarez, P.D. May, F.C. Stevens, S.D. Larsen, Small molecule peptidomimetics containing a novel phosphotyrosine bioisostere inhibit protein tyrosine phosphatase 1B and augment insulin action, *Biochemistry* 40 (2001) 5642–5654.
- [114] C. Liljebriis, S.D. Larsen, D. Ogg, B.J. Palazuk, J.E. Bleasdale, Investigation of potential bioisosteric replacements for the carboxyl groups of peptidomimetic inhibitors of protein tyrosine phosphatase 1B: identification of a tetrazole-containing inhibitor with cellular activity, *J. Med. Chem.* 45 (2002) 1785–1798.
- [115] S.D. Larsen, F.C. Stevens, T.J. Lindberg, P.M. Bodnar, T.J. O'Sullivan, H.J. Schostarez, B.J. Palazuk, J.E. Bleasdale, Modification of the N-terminus of peptidomimetic protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) inhibitors: identification of analogues with cellular activity, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13 (2003) 971–975.
- [116] L.F. Iversen, H.S. Andersen, S. Branner, S.B. Mortensen, G.H. Peters, K. Norris, O.H. Olsen, C.B. Jeppesen, B.F. Lundt, W. Ripka, K.B. Moller, N.P. Moller, Structure-based design of a low molecular weight, nonphosphorus, nonpeptide, and highly selective inhibitor of protein-tyrosine phosphatase 1B, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 10300–10307.
- [117] H.S. Andersen, O.H. Olsen, L.F. Iversen, A.L. Sorensen, S.B. Mortensen, M.S. Christensen, S. Branner, T.K. Hansen, J.F. Lau, L. Jeppesen, E.J. Moran, J. Su, F. Bakir, L. Judge, M. Shahbaz, T. Collins, T. Vo, M.J. Newman, W.C. Ripka, N.P. Moller, Discovery and SAR of a novel selective and orally bioavailable nonpeptide classical competitive inhibitor class of protein-tyrosine phosphatase 1B, *J. Med. Chem.* 45 (2002) 4443–4459.
- [118] Y.A. Puius, Y. Zhao, M. Sullivan, D.S. Lawrence, S.C. Almo, Z.-Y. Zhang, Identification of a second aryl phosphate-binding site in protein-tyrosine phosphatase 1B: a paradigm for inhibitor design, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94 (1997) 13420–13425.
- [119] M. Sarmiento, Y.A. Puius, S.W. Vetter, Y.F. Keng, L. Wu, Y. Zhao, D.S. Lawrence, S.C. Almo, Z.-Y. Zhang, Structural basis of plasticity in protein tyrosine phosphatase 1B substrate recognition, *Biochemistry* 39 (2000) 8171–8179.
- [120] S.W. Vetter, Y.F. Keng, D.S. Lawrence, Z.-Y. Zhang, Assessment of protein-tyrosine phosphatase 1B substrate specificity using “inverse alanine scanning”, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 2265–2268.
- [121] K. Shen, Y.F. Keng, L. Wu, X.L. Guo, D.S. Lawrence, Z.-Y. Zhang, Acquisition of a specific and potent PTP1B inhibitor from a novel combinatorial library and screening procedure, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 47311–47319.
- [122] J.P. Sun, L. Wu, A.A. Fedorov, S.C. Almo, Z.-Y. Zhang, Crystal structure of the *Yersinia* protein-tyrosine phosphatase YopH complexed with a specific small molecule inhibitor, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 33392–33399.
- [123] L. Xie, S.Y. Lee, J.N. Andersen, S. Waters, K. Shen, X.L. Guo, N.P. Moller, J.M. Olefsky, D.S. Lawrence, Z.-Y. Zhang, Cellular effects of small molecule PTP1B inhibitors on insulin signaling, *Biochemistry* 42 (2003) 12792–12804.
- [124] Z. Pei, X. Li, G. Liu, C. Abad-Zapatero, T. Lubben, T. Zhang, S.J. Ballaron, C.W. Hutchins, J.M. Trevillyan, M.R. Jirousek, Discovery and SAR of novel, potent and selective protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13 (2003) 3129–3132.

- [125] B.G. Szczechankiewicz, G. Liu, P.J. Hajduk, C. Abad-Zapatero, Z. Pei, Z. Xin, T.H. Lubben, J.M. Trevillyan, M.A. Stashko, S.J. Ballaron, H. Liang, F. Huang, C.W. Hutchins, S.W. Fesik, M.R. Jirousek, Discovery of a potent, selective protein tyrosine phosphatase 1B inhibitor using a linked-fragment strategy, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 4087–4096.
- [126] G. Liu, Z. Xin, H. Liang, C. Abad-Zapatero, P.J. Hajduk, D.A. Janowick, B.G. Szczechankiewicz, Z. Pei, C.W. Hutchins, S.J. Ballaron, M.A. Stashko, T.H. Lubben, C.E. Berg, C.M. Rondinone, J.M. Trevillyan, M.R. Jirousek, Selective protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors: targeting the second phosphotyrosine binding site with non-carboxylic acid-containing ligands, *J. Med. Chem.* 46 (2003) 3437–3440.
- [127] G. Liu, Z. Xin, Z. Pei, P.J. Hajduk, C. Abad-Zapatero, C.W. Hutchins, H. Zhao, T.H. Lubben, S.J. Ballaron, D.L. Haasch, W. Kaszubska, C.M. Rondinone, J.M. Trevillyan, M.R. Jirousek, Fragment screening and assembly: a highly efficient approach to a selective and cell active protein tyrosine phosphatase 1B inhibitor, *J. Med. Chem.* 46 (2003) 4232–4235.
- [128] C.K. Lau, C.I. Bayly, J.Y. Gauthier, C.S. Li, M. Therien, E. Asante-Appiah, W. Cromlish, Y. Boie, F. Forghani, S. Desmarais, Q. Wang, K. Skorey, D. Waddleton, P. Payette, C. Ramachandran, B.P. Kennedy, G. Scapin, Structure based design of a series of potent and selective non-peptidic PTP-1B inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14 (2004) 1043–1048.
- [129] E. Asante-Appiah, S. Patel, C. Despots, J.M. Taylor, C. Lau, C. Dufresne, M. Therien, R. Friesen, J.W. Becker, Y. Leblanc, B.P. Kennedy, G. Scapin, Conformation-assisted inhibition of protein-tyrosine phosphatase-1B elicits inhibitor selectivity over T-cell protein-tyrosine phosphatase, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 8010–8015.
- [130] W.R. Strohl, The role of natural products in a modern drug discovery program, *Drug Discov. Today* 5 (2000) 39–41.
- [131] J. Clardy, C. Walsh, Lessons from natural molecules, *Nature* 432 (2004) 829–837.
- [132] C.M. Dobson, Chemical space and biology, *Nature* 432 (2004) 824–828.
- [133] F.J. Dekker, M.A. Koch, H. Waldmann, Protein structure similarity clustering (PSSC) and natural product structure as inspiration sources for drug development and chemical genomics, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 9 (2005) 232–239.
- [134] M.A. Koch, H. Waldmann, Protein structure similarity clustering and natural product structure as guiding principles in drug discovery, *Drug Discov. Today* 10 (2005) 471–483.
- [135] N. Boute, S. Boubekeur, D. Lacasa, T. Issad, Dynamics of the interaction between the insulin receptor and protein tyrosine-phosphatase 1B in living cells, *EMBO Rep.* 4 (2003) 313–319.

6. CAPÍTULO 4

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

Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry

(in press)

Roberta R. Ruela de Sousa¹, Karla Cristiana de Souza Queiroz¹, Ana Carolina Santos de Souza¹, Sonia A. Gurgueira², Amanda Cavallari Augusto², Marcio André Miranda¹, Maikel P. Peppelenbosch³, Carmen Veríssima Ferreira¹, Hiroshi Aoyama¹

¹*Department of Biochemistry, State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil*

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

Abstract

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

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

1. INTRODUCTION

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

Several studies have demonstrated that, depending on their structures, flavonoids can be potent inhibitors of several kinases involved in signal transduction, mainly protein kinase C (PKC) [5] and tyrosine kinases [6]. On the other hand, some flavonoids can activate cell differentiation through activation of Ras-ERK cascade [7]. Fisetin is a common dietary component found in several fruits and vegetables [8]. Some authors have demonstrated different biological activities for this flavonoid: inhibition of topoisomerase II, a nuclear essential enzyme for DNA replication [9,10], neuroprotective, cardioprotective and anti-carcinogenic activities, which have been attributed to its antioxidant properties [7,11-13], inhibition of cellular proliferation and *in vitro* angiogenesis [14] and induction of apoptosis in leukemic cells [13].

¹corresponding author (Hiroshi Aoyama)

Tel: 55-19-3521-6141 Fax: 55-19-3521-6129

e-mail address: aoyama@unicamp.br

Recently, Haddad et al. [15] have demonstrated that fisetin (Figure 1) caused cell cycle arrest (G2/M) in prostate cancer human cell line PC3. In addition, fisetin can also inhibit glucose uptake in a competitive manner in a myeloid cell (U937), which indicated that this flavonoid could be used as an alternative blocker of glucose uptake *in vitro* [16].

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

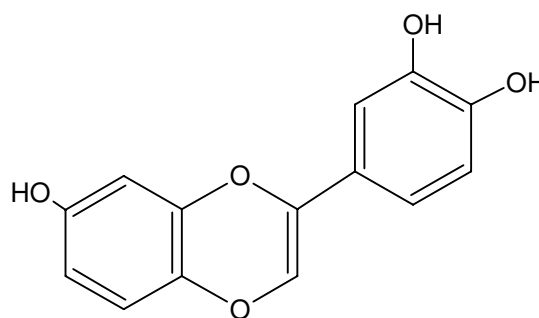


Figure 1. Molecular structure of fisetin

2. MATERIALS AND METHODS

Materials

HL60 cells were purchased from ATCC (Rockville, MD). Fisetin was purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). The polyclonal antibodies against antiphospho-p38 mitogen-activated protein kinase (p38), antiphospho-p42/44

(ERK 1/2), antiphospho-c-jun NH₂-terminal protein kinase (JNK), antirabbit and antimouse peroxidase conjugated antibodies were obtained from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Antibodies against phosphotyrosine and phosphothreonine were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA).

Cell culture

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

Cell viability

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

Western blotting

Cells (3 x 10⁷) were lysed in 200 µL cell lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1% Tween 20, 0.25% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM *o*-vanadate, 1 mM sodium fluoride, and protease inhibitors (1 µg/mL aprotinin, 10 µg/mL leupeptin, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)) for 2 hours on ice. Protein extracts were cleared by centrifugation, and the protein concentration was determined using Lowry method [18]. A twice

volume of sodium dodecyl sulfate (SDS) gel loading buffer (100 mM Tris-HCl, pH 6.8, 200 mM dithiothreitol, 4% SDS, 0.1% bromophenol blue, and 20% glycerol) was added to the samples and boiled for 10 minutes. Cell extracts, corresponding to 3 x 10⁵ cells, were resolved by SDS-polyacrylamide gel (12%) electrophoresis (PAGE) and transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes. Membranes were blocked for 1 h in 1% fat-free dried milk or bovine serum albumin (2%) in Tris-buffered saline (TBS) - Tween 20 (0.05%) and incubated overnight at 4°C with appropriate primary antibody at 1:1000 dilutions. After washing in TBS-Tween 20 (0.05%), membranes were incubated with antirabbit or antimouse horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies, at 1:2000 dilutions (in all Western blotting assays), in blocking buffer for 1 hour. Detection was performed by using enhanced chemiluminescence (ECL).

Antioxidant enzyme activities

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

Oxidative stress enzyme activity of markers

Aconitase activity was measured at 25° C by following the change in the absorption at 340

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

Statistical evaluation

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

3. RESULTS AND DISCUSSION

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

We have previously described the cytotoxic effects and the mechanism of action of different compounds on cancer cells [25-27]. Other natural products have also been reported as important sources of potential chemotherapeutic agents [28-30]. Flavonoids, widely distributed in vegetables, fruits, and wine, have been shown to exert anticarcinogenic effects [10,13,15,31]. However, the molecular mechanisms by which flavonoids can act against cancer cells need to be elucidated. To establish the specificity of fisetin action on HL60 cells we checked, in parallel, the effect of this compound on normal human lymphocytes viability using MTT assay. We observed that after 24 hours of fisetin treatment of HL60 cells, the mitochondrial activity was decreased, displaying an IC₅₀ value around 30 μM (Figure 2). In agreement to other authors [13], we also observed that fisetin induced HL60 cells death

by apoptosis. Interestingly, human lymphocytes viability remained unchanged, even in the presence of fisetin up to 200 μM. These results suggest that fisetin can be an interesting candidate for cancer treatment with a cellular-specific mechanism of action.

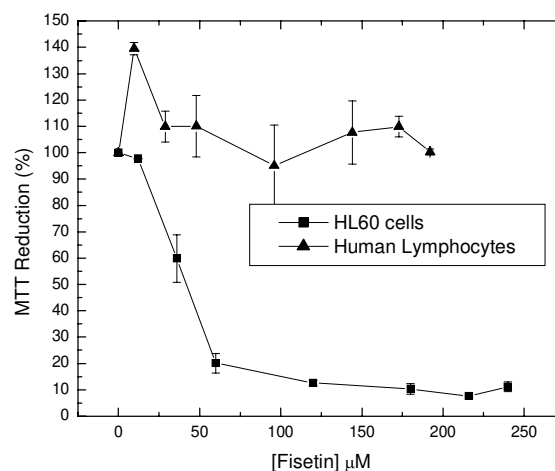


Figure 2. Cytotoxicity of fisetin in leukemic cells and normal human lymphocytes. HL60 cells (■) and normal human lymphocytes (▲) were treated with different concentrations of fisetin for 24 hours. In the absence of fisetin, the MTT reduction was considered as 100%. The experiment was performed in a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

Effect of Fisetin on MAPKs phosphorylation and NFκB expression in HL60 cells

To obtain more insight into the molecular mechanisms mediated by fisetin on HL60 cells, we examined the phosphorylation state of total proteins and MAPKs, in response to fisetin in concentrations up to 50μM. Fisetin caused activation of p38 and JNK MAPKs, while ERK was inhibited (Figure 3). Williams et al. [32] have demonstrated that flavonoids and their metabolites differentially acted on PI3-kinase, Akt/protein kinase B (Akt/PKB), tyrosine kinases, PKC, and MAPK signaling

cascades. Inhibitory or stimulatory actions at these pathways are likely to profoundly affect cellular function by altering the phosphorylation state of target molecules and/or by modulating gene expression.

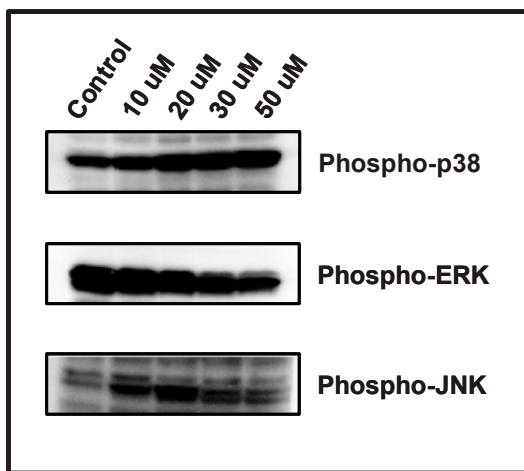


Figure 3. Effect of fisetin on MAPKs phosphorylation in HL60 cells. Cells were treated with different concentrations of fisetin (10, 20, 30 and 50 μ M). Soluble lysates were matched for protein content and analyzed by Western blot. One representative immunoblot of three independent experiments is presented.

In addition, we also observed that cells treated with fisetin presented high expression of NF κ B (Figure 4). Decrease in MAPKs phosphorylation (Figure 3) and in the expression of NF κ B p65 (Figure 4) in HL60 cells at fisetin concentrations higher than 20 μ M could be ascribed to different steps of apoptosis. Our results indicate that depending on the fisetin concentration two steps of apoptosis can be reached: early and late apoptosis. Apparently, fisetin concentrations up to 20 μ M caused early apoptosis, that was reinforced by the overexpression of NF κ B. Recently, Kanno et al. [33] demonstrated that the overexpression of NF κ B is a pivotal event for apoptosis in HL60 cells induced by the flavonoid naringenin. It has been shown that the transcription factor NF κ B

participated of the cell growth, differentiation, inflammatory responses induced by different signals related to the regulation of apoptosis and neoplastic transformation [34,35]. The pro- and antiapoptotic regulatory functions of NF κ B have been shown to depend on the cell type, the differentiation state of the cell, and the nature of the apoptotic stimulus [35]. Our data provided evidence that the overexpression of the subunit NF κ B p65 in cell death was associated to ROS generation. Some authors observed that ROS *per se* were potent inducers of apoptosis [36] and that the hydrogen peroxide-induced apoptosis required the release of mitochondria-derived ROS and the activation of NF κ B [37]. Our results demonstrating the ability of NF κ B p65 overexpression to induce apoptosis, are in agreement with published data implicating NF κ B to the induction of cell death in certain cells such as neurons, Schwann cells, prostate carcinoma, and embryonic kidney cells [38-42].

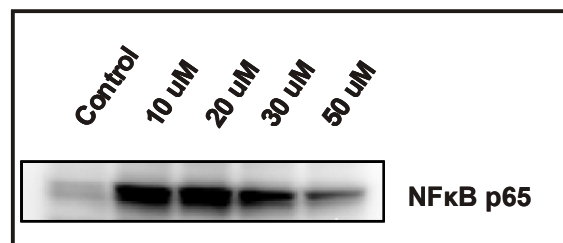


Figure 4. Fisetin changes the expression of NF κ B p65. After HL60 cells treatment with different concentrations of fisetin for 24 hours, equal amounts of protein (50 μ g) of total lysates were subjected to immunoblot analysis with NF κ B (p65) antibodies.

Effects of fisetin on proteins phosphorylation in HL60 cells

In order to analyze the phosphorylation state on HL60 cells treated with fisetin, we examined the tyrosine and threonine phosphorylation on the cellular proteins. Both

residues phosphorylation increased in the cells treated with fisetin, excepting a decrease in the tyrosine phosphorylation at 50 μ M fisetin (Figure 5). Our results indicated that the fisetin action in HL60 cells was accompanied by increasing in tyrosine and threonine phosphorylations. We have observed that fisetin inhibited cytosolic phosphatase activities in HL60 cells (not shown).

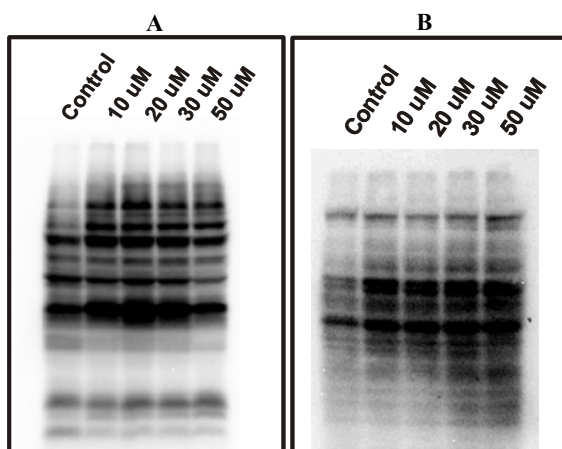


Figure 5. Effect of fisetin on protein phosphorylation levels. Cells were treated with fisetin (10, 20, 30 and 50 μ M), and the tyrosine (A) and threonine (B) phosphorylations were evaluated by immunoblotting. One representative immunoblot of three independent experiments is presented.

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

In order to analyze the cellular redox status after treatment of HL60 cells with fisetin we quantified the activities of aconitase, fumarase, catalase, glutathione peroxidase and two isoforms of superoxide dismutase (SOD), the MnSOD (mitochondrial isoform), and the CuZnSOD (cytosolic isoform). Treatment of HL60 cells with fisetin resulted in inactivation of mitochondrial aconitase, an enzyme sensitive to oxidative stress, but not fumarase, a mitochondrial enzyme insensitive

to oxidative stress (Table 1). Fisetin caused also an expressive decrease of the antioxidant enzymes

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

Table 1. Effects of fisetin on antioxidant enzymes activities of HL60 cells. Cells were treated with fisetin (50 μ M) and enzyme activities were determined as described in Methods.

catalase, MnSOD, CuZnSOD and GPX. Our results suggest that fisetin can induce oxidative stress through ROS production. ROS can lead to cell death through inactivation of the mitochondrial aconitase, an iron-sulfur (Fe-S) protein [43]. Recent studies showed that ROS are emerging as obligatory mediators of cell death signaling in response to stimulation of TNF receptors and induction of JNK and p38 signaling [44-47]. A MAPK phosphatase (MKP) was identified as a critical molecular target of ROS during TNF α -induced apoptosis, due to oxidation of an essential cysteine residue to sulfenic acid [46]. MKP plays a critical role in the regulation of the activity of MAPKs [48, 49]. Thus, ROS-dependent inhibition of MKPs caused persistent activation of JNK by TNF α and, ultimately, programmed cell death *via* either a necrotic or an apoptotic pathway [47]. These findings are in agreement with our results since, besides activating JNK and p38, fisetin also caused an increase of phosphoprotein levels which can be due to either inactivation of protein phosphatases or activation of

protein kinases, which activities are highly sensitives to oxidant agents.

4. CONCLUSION

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

Acknowledgements

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

5. REFERENCES

- [1] Middleton JrE, Kandaswami C. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: Implications for immunity, inflammation and cancer. In: *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986* (Eds. Harborne JH, Liss AR), 1993; 619-652. New York.
- [2] Verbeek R, Plomp AC, van Tol EA, van Noort JM. The flavones luteolin and apigenin inhibit in vitro antigen-specific proliferation and interferon-gamma production by murine and human autoimmune T cells. *Biochem Pharmacol* 2004; 68:621-629.
- [3] Middleton JrE, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev* 2000; 52:673-751.
- [4] Hendriks JJ, de Vries HE, van der Pol SM, van den Berg TK, van Tol EA, Dijkstra CD. Flavonoids inhibit myelin phagocytosis by macrophages; a structure-activity relationship study. *Biochem Pharmacol* 2003; 65:877-885.
- [5] Ferriola PC, Cody V, Middleton E. Protein kinase C inhibition by plants flavonoids. Kinetic mechanisms and structure-activity relationships. *Biochem Pharmacol* 1989; 38:1617-1624.
- [6] Agullo G, Garnet-Payrustre L, Manenti S, Viala C, Rémésy C, Chap H, Payrustre B. Relationship Between Flavonoid Structure and Inhibition of Phosphatidylinositol 3-Kinase: A Comparison with Tyrosine Kinase and Protein Kinase C Inhibition. *Biochem Pharmacol* 1997; 53:1649-1657.
- [7] Sagara Y, Vanhnasy J, Maher P. Induction of PC12 cell differentiation by flavonoids is dependent upon extracellular signal-regulated kinase activation. *J Neurochem* 2004; 90:1144-1155.
- [8] Kimira M, Arai Y, Shimoi K, Watanabe S. Japanese intake of flavonoids and isoflavanoids from foods. *J Epidemiol* 1998; 8:168-175.
- [9] Osheroff N, Zechiedrich EL, Gale KC. Catalytic function of DNA topoisomerase II. *BioEssays* 1991;13:269-275.
- [10] Olaharski AJ, Mondrala ST, Eastmond DA. Chromosomal malsegregation and micronucleus induction in vitro by the DNA topoisomerase II inhibitor fisetin. *Mut Res* 2005; 582:79-86.
- [11] van Acker FAA, Schouten O, Haenen GRMM, van der Vijh WJF, Bast A. Flavonoids can replace

- alpha-tocopherol as an antioxidant. FEBS Lett 2000; 473:145-148.
- [12] Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. J Nat Prod 2000; 63:1035–1042.
- [13] Lee WR, Shen SC, Lin HY, Hou WC, Yang LL, ChenYC. Wogonin and fisetin induce apoptosis in human promyeloleukemic cells, accompanied by a decrease of reactive oxygen species, and activation of caspase 3 and Ca²⁺-dependent endonuclease, Biochem Pharmacol 2002; 63:225–236.
- [14] Fotsis T, Pepper MS, Aktas E, Breit S, Rasku S, Adlercreutz H, Wahala K, Montesano R, Schweigerer L. Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vivo angiogenesis. Cancer Res 1997; 57:2916–2921.
- [15] Haddad AQ, Venkateswaran V, Viswanathan L, Teahan SJ, Fleshner NE, Klotz LH. Novel antiproliferative flavonoids induce cell cycle arrest in human prostate cancer cell lines. Prostate Cancer Prostatic Dis 2006; 9:68-76.
- [16] Park JB. Flavonoids Are Potential Inhibitors of Glucose Uptake in U937 Cells Biochem Biophys Res Commun 1999; 260:568-574.
- [17] Bromberg N, Justo GZ, Haun M, Duran N, Ferreira CV. Violacein toxicity on human blood lymphocytes and effect on phosphatases. J Enz Inhib Med Chem 2005; 20:449-454.
- [18] Hartree EF. Determination of proteins: a modification of the Lowry method that give a linear photometric response. Anal Biochem 1972; 48:422-427.
- [19] McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). J Biol Chem 1969; 244:6049-6055.
- [20] Beauchamp CO, Fridovich I. Isozymes of superoxide dismutase from wheat germ. Biochim Biophys Acta 1973; 317:50-64.
- [21] Nelson DP, Kiesow LA. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25° C. Anal Biochem 1972; 49:474-478.
- [22] Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. Biochem Biophys Res Commun 1976; 71:952-958.
- [23] Morton RL, Iklé D, White CW. Loss of lung mitochondrial aconitase activity due to hyperoxia in bronchopulmonary dysplasia in primates. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 1998; 274:L127-L133.
- [24] Racker E. Spectrophotometric measurements of the enzymatic formation of fumaric acid and cis-aconitic acid. Biochim Biophys Acta 1950; 4:211-214.
- [25] Freire AG, Melo PS, Haun M, Duran N, Aoyama H, Ferreira CV. Cytotoxic effect of the diterpene lactone dehydrocrotonin from *Croton cajucara* on human promyelocytic leukemia cells. Planta Med 2003; 69:67-69.
- [26] Justo GZ, Ferreira CV. Coagulation and cancer therapy: The potential of natural compounds. Cur Genomics 2005; 6:461-469.
- [27] De Fátima A, Modolo LV, Conegero LS, Pilli RA, Ferreira CV, Kohn K, de Carvalho JE. Styryl lactones and their derivatives: biological activities, mechanisms of action and potential leads for drug design. Cur Med Chem 2006 (accepted)
- [28] O’Gorman DM, Cotter TG. Molecular signals in anti-apoptotic survival pathways. Leukemia 2001; 15:21-34.
- [29] Makin G, Dive C. Apoptosis and cancer chemotherapy. Trends Cell Biol Sci 2001;11:S22-S26.
- [30] Martelli AM, Tazzari PL, Tabellini G, Bortul R, Billi AM, Manzoli L, Ruggeri A, Conte R, Cocco L. A new selective AKT pharmacological inhibitor reduces resistance to chemotherapeutic

drugs, TRAIL, all-trans-retinoic acid, and ionizing radiation of human leukemia cells. *Leukemia* 2003;17:1794-1805.

[31] Chen, YC, Shen SC, Lee WR, Lin HY, Ko CH, Shih, CM, Yang LL. Wogonin and fisetin induction of apoptosis through activation of caspase 3 cascade and alternative expression of p21 protein in hepatocellular carcinoma cells SK-HEP-1. *Arch Toxicol* 2002; 76:351-359.

[32] Williams RJ, Spencer JPE, Rice-Evans C. Flavonoids: antioxidants or signaling molecules? *Free Radic Biol Med* 2004; 36:838-849.

[33] Kanno S, Tomizawa A, Ohtake T, Koiwai K, Ujibe M, Ishikawa M. Naringenin-induced apoptosis via activation of NF- κ B and necrosis involving the loss of ATP in human promyeloleukemia HL-60 cells. *Toxicol. Lett.* 2006; 166:131-139.

[34] Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 1999;18: 6853-6866.

[35] Ricca A, Biroccio A, Trisciuglio D, Cippitelli M, Zupi G, del Bufalo D. relA over-expression reduces tumorigenicity and activates apoptosis in human cancer cells. *Brit J Cancer* 2001; 85:1914-1921.

[36] Kroemer G, Zamzami N, Susin SA. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* 1997; 18:45-51.

[37] Dumont A, Hehner SP, Hofmann TG, Ueffing M, Dröge W, Schmitz ML. Hydrogen peroxide-induced apoptosis is CD95-independent, requires the release of mitochondria-derived reactive oxygen species and the activation of NF- κ B. *Oncogene* 1999; 18:747-757

[38] Lin KI, Lee SH, Narayanan R, Baraban JM, Hardwick JM, Ratan RR. Thiol agents and Bcl-2

identify an alphavirus-induced apoptotic pathway that requires activation of the transcription factor NF- κ B. *J Cell Biol* 1995; 131:1149-1161.

[39] Carter BD, Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Offenhauser N, Bohm MR, Baeuerle PA, Barde YA. Selective activation of NF-kappaB by nerve growth factor through the neurotrophin receptor p75. *Science* 1996; 272:542-545.

[40] Grimm S, Bauer MK, Baeuerle PA, Schulze Osthoff K. Bcl-2 downregulates the activity of transcription factor NF-kappaB induced upon apoptosis. *J Cell Biol* 1996; 134:13-23.

[41] Lin B, Williams-Skipp C, Tao Y, Schleicher MS, Cano LL, Duke RC, Scheinman RI. NF- κ B functions as both a proapoptotic and antiapoptotic regulatory factor within a single cell type. *Cell Death Diff* 1999; 6:570-582.

[42] Grilli M, Memo M. Nuclear factor kappa B/Rel proteins: a point of convergence of signaling pathways relevant in neuronal function and dysfunction. *Biochem Pharmacol* 1999; 57:1-7.

[43] Liang LP, Patel M. Iron-sulfur enzyme mediated mitochondrial superoxide toxicity in experimental Parkinson's disease. *J Neurochem* 2004; 90:1076-1084.

[44] Sakon S, Xue X, Takekawa M, Sasazuki T, Okazaki T, Kojima Y, Piao JH, Yagita H, Okumura K, Doi T, Nakano H. NF κ B inhibits TNF α -induced accumulation of ROS that mediate prolonged MAPK activation and necrotic cell death. *EMBO J* 2003; 22:3898-3909.

[45] Pham CG, Bubici C, Zazzeroni F, Papa S, Alvarez K, Jayawardena S, De Smaele E, Cong R, Beaumont C, Torti FM, Torti SV, Franzoso G. Ferritin heavy chain upregulation by NF- κ B inhibits TNF α -induced apoptosis by suppressing reactive oxygen species. *Cell* 2004; 119:529-542.

[46] Ventura JJ, Cogswell P, Flavell RA, Baldwin Jr AS, Davis RJ. JNK potentiates TNF-stimulated necrosis by increasing the production of cytotoxic reactive oxygen species. *Genes Dev* 2004; 18:2905-2915.

[47] Kamata H, Honda S, Maeda S, Chang L, Hirata H, Karin M. Reactive oxygen species promote TNF α -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell* 2005;120:649-661.

[48] Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 2000; 103:239-252.

[49] Sumbayev VV, Yasinska IM. Regulation of MAP kinase-dependent apoptotic pathway: implication of reactive oxygen and nitrogen species. *Arch Biochem Biophys* 2005; 436:406-412.

7. CAPÍTULO 5

Mechanism of riboflavin-induced prostate cancer cell death and its potential as a metastasis inhibitor

(Artigo submetido à Prostate)

Karla Cristiana de Souza Queiroz^{1,3*}, Willian Fernando Zambuzzi^{1*}, Rodrigo Augusto da Silva¹, Ana Carolina Santos de Souza¹, Giselle Zenker Justo¹, Hernandes Faustino de Carvalho², Maikel P. Peppelenbosch³, Carmen Veríssima Ferreira¹

¹*Departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Campinas, Brazil*

²*Departamento de Biologia Celular, Universidade Estadual de Campinas, Brazil*

³*Department of Cell Biology, University Medical Center Groningen A. Deusinglaan 1, NL-9713 AV Groningen, The Netherlands*

Abstract

Because of unsatisfactory treatment options for prostate cancer there is a need to develop novel treatment approaches for this malignancy. We have shown previously that irradiated riboflavin induces apoptosis in HL60 cells. In the present study, we provide evidence that irradiated riboflavin treatment to androgen-independent human prostate cancer cell, PC3 result in a dose-dependent inhibition of cell growth. To define the mechanism of this anti-proliferative effect of riboflavin, we determined its effect on critical molecular events known to regulate the cell apoptotic and extracellular remodeling machineries. PC3 cells treated with irradiated riboflavin presented upregulation of adaptor protein FADD and downregulation of TNFR1. In addition, anti-Fas neutralizing antibody abrogated the irradiated riboflavin effect. We also investigated the participation of ceramide in the cell death process. We found that ceramide synthase presented a pivotal role in the apoptotic cascade triggered by irradiated riboflavin, since cell death was prevented by Fumonisin B1, a typical ceramide synthase inhibitor. Importantly, at sub-lethal dose (20 μ M) irradiated riboflavin caused RECK protein overexpression. Altogether, the results showed here, indicate that apoptosis induction by irradiated riboflavin is dependent on Fas and ceramide signaling pathways. Our findings pointed out riboflavin as a promising antitumoral agent, since this compound affected important molecular targets related to proliferation, resistance and invasibility of prostate cancer cells.

Key Words: PC-3, Riboflavin, RECK

*Contributed equally to this work

1. INTRODUCTION

Prostate cancers are among the most frequent metastatic malignancies that contribute to cancer death in males. Although recent years have seen an improvement in prostate cancer detection and a few new therapeutic agents, not much progress has been made in the treatment of the disease. Unfortunately, even with new drugs such as Flutamide®, which may be more effective and less toxic than traditional cytotoxic therapies, prostate tumors are still difficult to destroy, and often become androgen independent. Besides, when primary treatment fails, the disease develops along an intractable course for which no long-term effective therapy exists (Navarro et al., 2002; Diaz et al., 2004; Nelson, 2004). Another important factor is that up to 22% of newly diagnosed patients present with advanced or metastatic disease, in this way, the incidence of nonlocalized cases and mortality has remained almost constant (Evans and Moller, 2003; Thuraija et al., 2004; Carlin and Gerald 2000). Nowadays, many studies have been performed to provide new and efficient target and biosensors to follow prostate cancer. PC3 line has been used as a model of the hormone refractory prostate cancer.

Recently, Souza et al (2006) demonstrated in details the action mechanism of riboflavin photoproducts as apoptosis inducers. The photodegradation of riboflavin in aqueous solutions results in a number of products such as 7, 8-dimethyl-10-(formylmethyl) isoalloxazine, lumichrome and lumiflavin (Silva et al, 1994; Edwards and Silva, 2001; Ahmad et al, 2006) - (Figure 1).

¹correspondence (Dr. Carmen Veríssima Ferreira)
Tel: 55-19-3521-6659 Fax: 55-19-3521-6129
e-mail address: carmenv@unicamp.br

Basically, in leukaemia cells the photoproducts activated Fas/FaL expressions and also ceramide production (Souza et al., 2006).

Herein, we demonstrated that riboflavin photoproducts also caused PC3 cell death. In prostate cancer cells riboflavin photoproducts action was expressively dependent on ceramide synthase activation, since fumonisin B1 prevented these cells death. Besides, the photoproducts also sensitised Fas receptor. In addition we detected downregulation of STAT5 and inhibition of p38. Importantly, we also observed inhibition of MMP-2 and 9 and upregulation of RECK. Overall, our findings pointed out riboflavin as a promising antitumoral agent, since this compound affected important molecular targets related to proliferation, resistance and invasibility of prostate cancer cells.

2. MATERIALS AND METHODS

Cell line and reagents

PC3 cells were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). Polyclonal antibodies against, antiphospho-p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK), antiphospho-c-jun-NH₂-terminal protein kinase (JNK), antiphospho-Akt/PKB, antirabbit, antigoat and antimouse peroxidase-conjugated antibodies were purchased from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Antibodies against phospho-PP2A, phosphotyrosine, phosphothreonine, signal transducer and activator of transcription 5b (STAT5b), Bcl2, Bax, TNFR1 receptor, TNF α receptor associated death domain (TRADD), Fas-associated death domain protein (FADD), c-myc, I kappa B kinase alpha (IKK α), (NF κ B), RECK, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), β -actin were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Fas

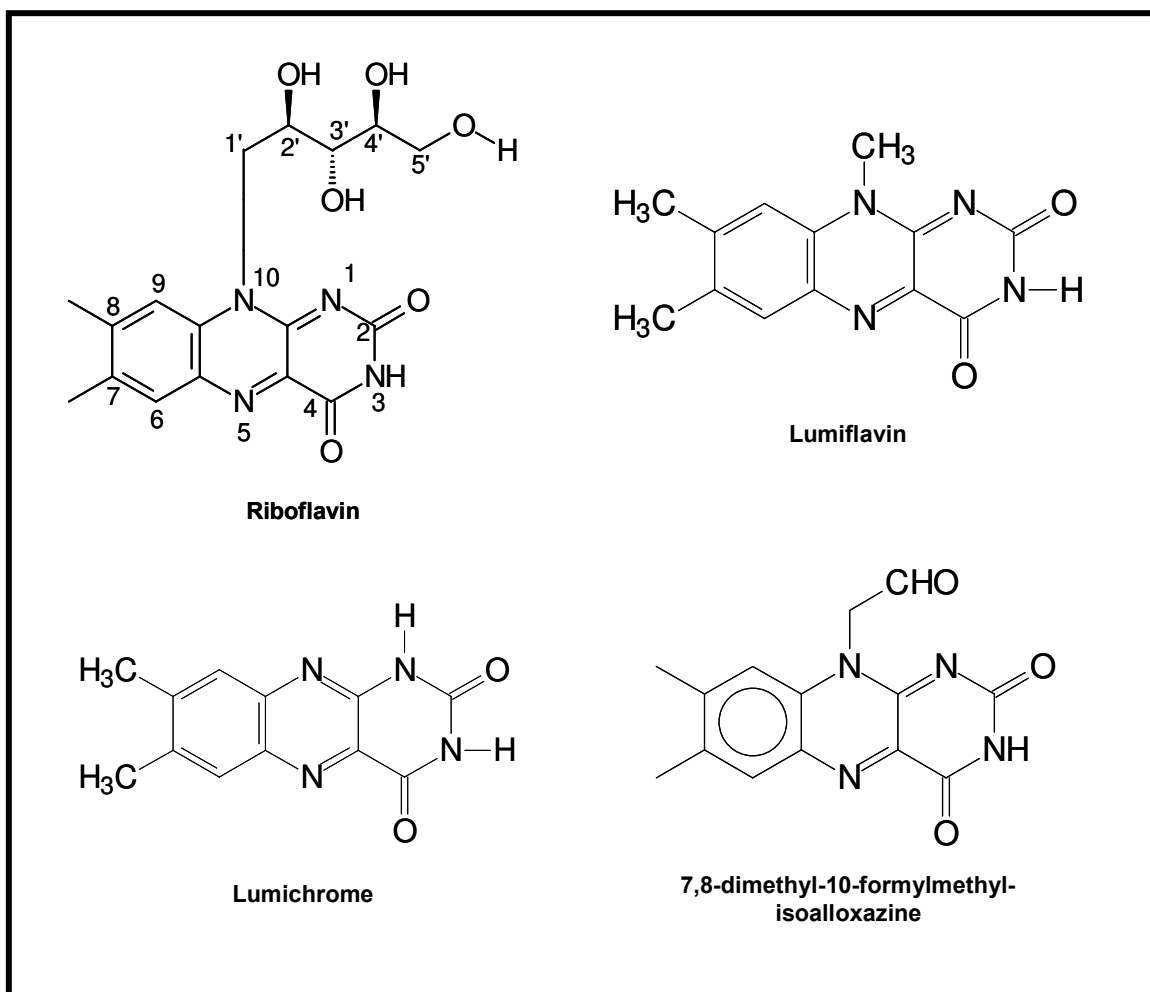


Figure 1. Chemical structure of riboflavin and its photoproducts

neutralizing was from Upstate Biotechnology, Inc. (Lake Placid, NY). Riboflavin, and Fumonisin B1 were from Sigma. Caspase 3 Colorimetric Assay Kit was obtained from R&D Systems (Minneapolis).

Cell culture

PC3 cell was purchased from American Type Culture Collection (Rockville, MD). Cells were routinely grown in RPMI 1640 containing 10% fetal bovine serum, 100 units/mL penicillin, and 100 mg/mL streptomycin at 37°C in a humidified incubator with 5% CO₂ in air.

Irradiation of riboflavin and treatment of PC3 cells

Solutions of riboflavin (250 μM) were diluted in RPMI 1640 culture medium and irradiated with UV light. Afterwards, semi-confluent cells were added to the samples so that the following final concentrations of riboflavin: 5, 10, 15, 20, 30, 40 and 50 μM were reached. The cells were also pre-treated with 5 μM, 10 μM and 25 μM of fumonisin B1 or anti-Fas 10 μg/mL for 30 min and, afterwards, treated with riboflavin. Cell viability was assessed by MTT reduction, neutral red uptake and nucleic acids content assays.

MTT reduction assay

The medium containing irradiated riboflavin was removed and 1.0 mL of MTT

solution (0.5 mg MTT/mL of culture medium) was added to each well. After incubation for 4 h at 37°C, the medium was removed and the formazan released by solubilisation in 1.0 mL of ethanol. The plate was shaken for 5 min on a plate shaker and the absorbance measured at 570 nm (Mosmann, 1983).

Neutral red uptake

After removing the medium from the plates, 1 mL of neutral red solution (50 µg/mL of culture medium) was added to each well followed by incubation for 3 h at 37°C. The cells were then washed rapidly with phosphate-buffered saline containing calcium (PBS-Ca²⁺) after which 1 mL of 1% glacial acetic acid-50% ethanol was added to each well to fix the cells and extract the neutral red incorporated into the lysosomes. The plates were shaken for 20 min on a plate shaker and the absorbance then measured at 540 nm (Riddell *et al.*, 1986; Renzi *et al.*, 1993).

Nucleic acid content

The cell monolayer was solubilized with 1 mL of 0.5 M NaOH at 37°C for 1 h after which the absorbance of the solution in each well was measured at 260 nm and the results expressed as a percentage of the control A₂₆₀ (Cingi *et al.*, 1991).

Western blotting

Cells (3 x 10⁷) were lysed in 200 µL cell lysis buffer (50mM Tris [tris (hydroxymethyl)aminomethane]-HCl [pH 7.4], 1% Tween 20, 0.25% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA (ethylene glycol tetraacetic acid), 1 mM *O*-Vanadate, 1 mM NaF, and protease inhibitors [1 µg/mL aprotinin, 10 µg/mL leupeptin, and 1 mM 4-(2-amino-ethyl)-benzolsulfonyl-fluorid-hydrochloride]) for 2 hours on ice. Protein extracts were cleared by

centrifugation, and the protein concentration was determined using Lowry method (Hartree 1972). An equal volume of 2 x sodium dodecyl sulfide (SDS) gel loading buffer (100 mM Tris-HCl [pH 6.8], 200 mM dithiothreitol [DTT], 4% SDS, 0.1% bromophenol blue, and 20% glycerol) was added to samples and boiled for 10 minutes. Cell extracts, corresponding to 3 x 10⁵ cells, were resolved by SDS-polyacrylamide gel (12%) electrophoresis (PAGE) and transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes. Membranes were blocked in 1% fat-free dried milk or bovine serum albumin (2%) in Tris-buffered saline (TBS)-Tween 20 (0.05%) and incubated overnight at 4° C with appropriate primary antibody at 1:1000 dilutions. After washing in TBS-Tween 20 (0.05%), membranes were incubated with antirabbit, antigoat and antimouse horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies, at 1:2000 dilutions (in all Western blotting assays), in blocking buffer for 1 hour. Detection was performed by using enhanced chemiluminescence (ECL).

Caspase 3 activity assay

Caspase 3 activity was determined by the measurement at 405 nm of *p*-nitroaniline released from the cleavage of caspase 3 (Ac-DEVD-pNA) substrate. The enzyme activity was expressed in pmol/min and the extinction coefficient of *p*NA was 10,000 M⁻¹ cm⁻¹.

Zymographic analysis

Proteolytic activity of MMP-2 and MMP-9 was assayed by gelatin zymography as described by Souza *et al.* (2000). After the cell treatment in the presence of FBS or in a FBS-free condition, the culture medium was collected and stored at -20°C in the presence of 1 mM PMSF (phenyl-methyl sulphonyl fluoride-serine-protease

enzyme inhibitor). Samples were diluted in non-reducing buffer (0.1M Tris-HCl, pH 6.8, 20% glycerol, 1% SDS and 0.001% bromophenol blue). Samples, corresponding to 150 μg of protein, were resolved by SDS-polyacrylamide gel (10%) and 4% gelatin. Protein renaturation was performed in 2% Triton X-100 for 1 h followed by incubation with 50mM Tris-HCl and 10mM CaCl_2 (pH 7.4) at 37°C for 18 h. Gels were stained with 0.5% Coomassie Blue G 250 for 30 minutes and then washed in a 30% methanol and 10% glacial acetic acid solution.

Statistical evaluation

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

3. RESULTS

Effect of the Irradiated riboflavin on PC3 cells viability

The effect of riboflavin on cell viability was determined employing neutral red uptake, nucleic acid content and MTT assays. PC3 cells were treated with non and irradiated riboflavin in concentrations up to 50 μM . Cell viability was not affected by non-irradiated riboflavin. Unlike, irradiated riboflavin demonstrated a strong cytotoxic effect on PC3 cells after 24h of treatment, with IC_{50} values around 15 and 40 μM for nucleic acid content and MTT reduction,

respectively (Figure 2). In this concentration range the lysosomal membrane integrity was not significantly affected. Importantly, irradiated riboflavin can acts as an antiproliferative agent in low dose. For further mechanistic studies a dose of 20, 40 and 50 μM irradiated riboflavin was selected.

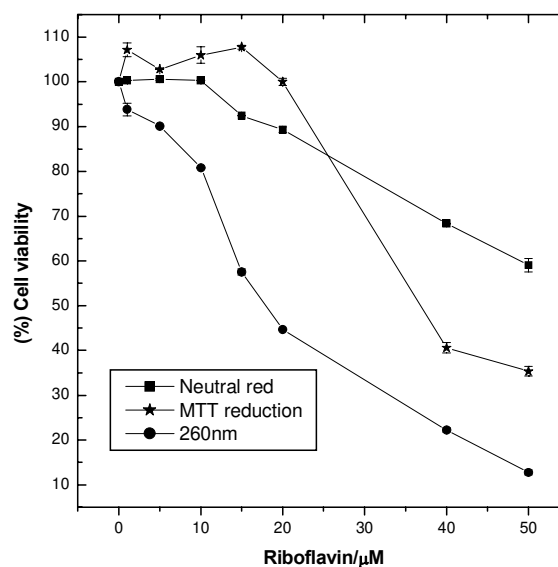


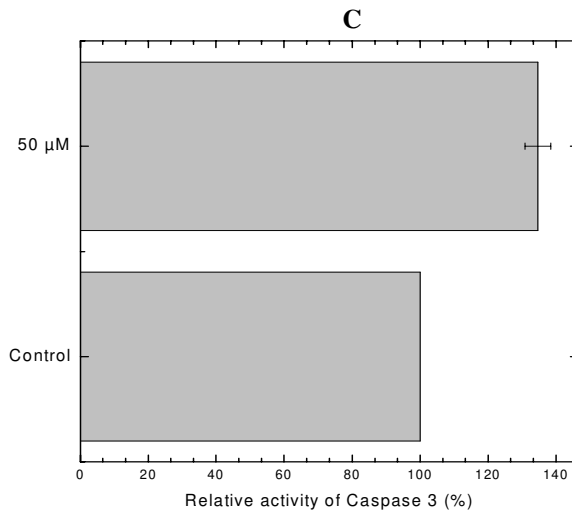
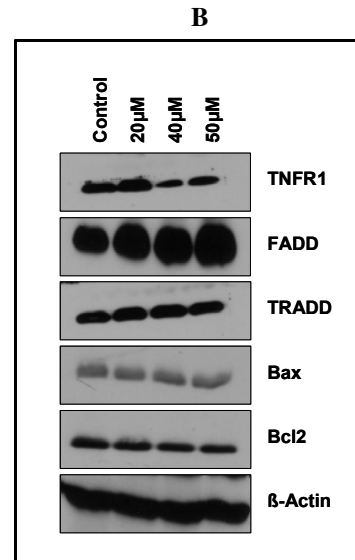
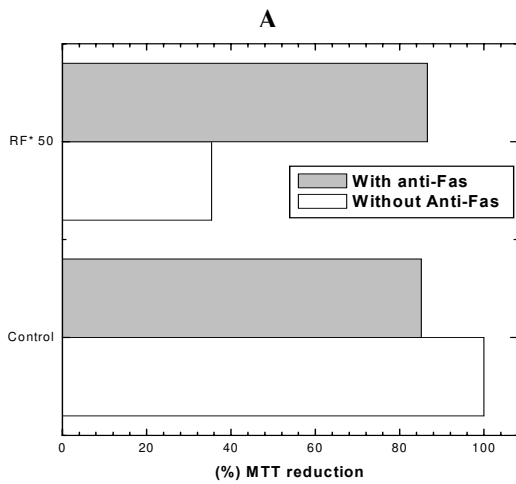
Figure 2. Irradiated riboflavin presents toxic effect on PC3 cells. The cells were treated with different concentrations of irradiated and non-irradiated riboflavin in RPMI medium. The effect of photoproducts were evaluated by MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide) reduction, neutral red uptake and nucleic acids absorbance at 260 nm. In the absence of riboflavin, cell viability was considered as 100%. The experiment was performed in a 24 wells plate. Results represent the means \pm standard error of 3 experiments run in triplicate ($P < 0.05$).

Fas neutralising prevents the toxic effect of riboflavin photoproducts

The involvement of death receptor in the cytotoxic action of riboflavin was also checked. Prostate cancer cells death by riboflavin photoproducts requires Fas signalling pathway since Fas neutralising almost completely abolished their toxic effect (Figure 3A). In agreement, we observed upregulation of FADD. On the other hand, apparently the TNFR1 did not

participated in this process, once the riboflavin treatment caused downregulation of this receptor (Figure 3B). These data suggest that irradiated riboflavin treatment induces apoptosis through extrinsic pathway involving the death receptor.

Figure 3. Apoptosis induction of prostate cancer cells by irradiated riboflavin. Semi-confluent cells were incubated with antibody Fas neutralising 10µg/mL for 30 min and after treated with irradiated riboflavin for 24 h and the number of viable cells was determined by MTT reduction assay (A). The expression of TNFR1, FADD and TRADD was evaluated by immunoblotting. Soluble lysates were matched for protein content and analyzed on Western blot (B). Colorimetric assay was performed to determine caspase 3 activity (C). Results represent the means ± standard error of 3 experiments run in triplicate ($P < 0.05$).



Caspases are responsible for many of the biochemical and morphological changes that occur during apoptosis. We determined whether treatment of PC3 cells with irradiated riboflavin leads to activation of caspase. Colorimetric assay depicted in figure 3 indicates that riboflavin photoproducts treatment of PC3 cells leads to activation of caspase 3 (Figure 3C).

Ceramide presents a pivotal role in the riboflavin photoproducts action

Fumonisin B1, a known inhibitor of the enzyme ceramide synthase involved in *de novo* synthesis of ceramide in the endoplasmic

reticulum and mitochondria, prevented the toxic effect of irradiated riboflavin. Prostate cancer cells present an increase of ceramide production via ceramide synthase, which is essential for the apoptosis induction. According to the figure 4, the cell viability remains almost 100% when the cells were pre-treated with fumonisin B1.

Protein kinases, phosphatases and metalloproteinases activities and STAT5 expression are affected by irradiated riboflavin

A set of proteins was analysed (Figure 5), cells treated with irradiated riboflavin had

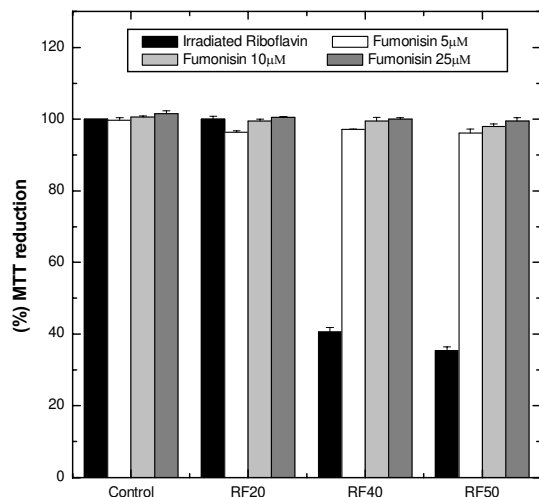


Figure 4. Fumonisin B1 prevents riboflavin toxic effect in prostate cancer cells. Semi-confluent cells were incubated with 5 µM, 10 µM and 25 µM Fumonisin B1 for 30 min and afterwards treated with irradiated riboflavin for 24 h and the number of viable cells was determined by MTT reduction assay.

inhibition of p38 MAPK and PI3K while JNK activity remains unchanged. IKK α was inhibited by the photoproducts, and NF κ B expression was not affected. The profile of phosphoprotein in tyrosine or threonine residues indicates activation of protein phosphatases or inhibition of other types of kinases. Additionally, protein serine/threonine phosphatase (PP2A) was significantly inhibited by irradiated riboflavin. Metalloproteinases 2 and 9 were also inhibited, and their inhibitor RECK was slightly upregulated at the concentrations of 20 and 40 µM (Figures 5 and 6).

It is now well established that STATs represent a major family of transcription factors mediating the downstream effects of growth hormones. Therefore this transcription factor plays a pivotal role in prostate cancer development. As can be seen in Figure 5 cells treated with irradiated riboflavin presented an expressive decrease in the STAT5 level.

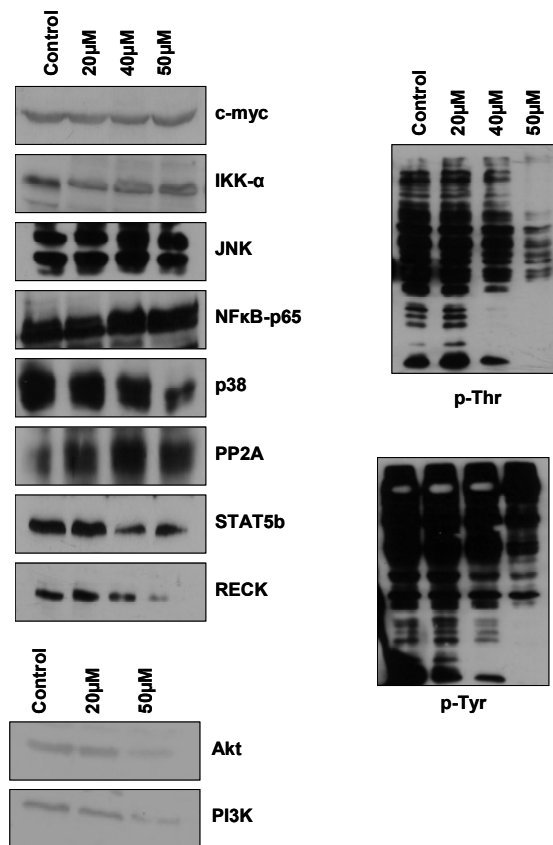


Figure 5. Riboflavin causes differential effect on the expression of proteins involved in proliferation, resistance and invasibility of prostate cancer cells. The expression of a set of proteins was evaluated by immunoblotting. Soluble lysates were matched for protein content and analyzed on Western blot.

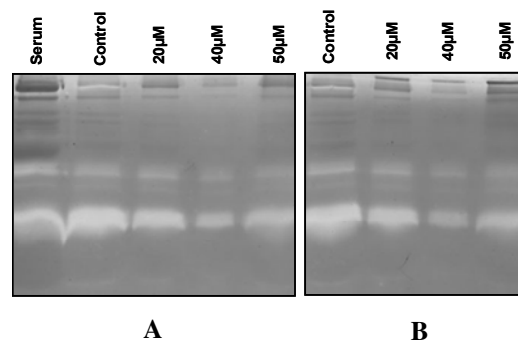


Figure 6. Effect of riboflavin on PC3 matrix metalloproteinase activities. Riboflavin reduced the activation of both MMPs in a dose-dependent fashion. Note that the upper bands (92 kDa) corresponds to the activity of MMP-9 while the bands below (72 kDa) represents the MMP-2 activity. (A: treatment in a FBS enriched medium, B: FBS-free medium condition)

4. DISCUSSION

Tumor development of human prostate gland is critically dependent of the deregulated balance between different growth regulators such as androgenic hormones, growth factors and their receptors. The management of prostate cancer remains complex. Therefore, the discovery of new anticancer agents as well as to identify its molecular target can bring out a novel perspective for the patients treatment. In an effort to devise more optimal protocols, we employ PC3 cells as a suitable model system for studying cell differentiation and apoptosis in response to potential pharmacologically active compounds *in vitro* and using the experimental accessibility of this system for characterizing the molecular details underlying the effects seen. In the present study, we focus on riboflavin, an important photosensitizer, which has been considered as a promising anticancer agent (Souza et al., 2006).

In this paper we described the action mechanism of irradiated riboflavin as mediator of prostate cancer cells death. The toxic effect of the photoproducts was observed at concentrations lower than 40 μ M. Interesting, the membrane integrity was not affected in this condition, since the neutral red uptake by the lysosomes, remains unchanged.

In order to delineate the molecular details concerning the cell death induced by irradiated riboflavin, we investigated possible molecular mechanisms involved. We demonstrated that riboflavin photoproducts reduce the levels of TNFR1. This action is interesting since PC3 cells show a death resistance promoted by TNF α . However, our results indicated that extrinsic pathway is a major signaling responsible for the induction of the apoptotic process by riboflavin since anti-Fas neutralizing was able to maintain cell viability. In

agreement, we observed that the treatment of PC3 cells with riboflavin photoproducts induced up-regulation of FADD. Fas and FasL are commonly coexpressed in prostate cancer cells. Despite expression of both cell-surface Fas and FasL as well as constitutive secretion of biologically active soluble FasL, prostate cancer cells are resistant to Fas-mediated apoptosis (Costa-Pereira and Cotter, 1999; Hyer et al., 2000; Bertran, 2006). However, there are some reports in the literature that demonstrated the reactivation of apoptotic potential of autocrine Fas signal in prostate cancer cells when PI3K is inhibited (Bertran, 2006). Our findings also indicate that inhibition of PI3K represents a pivotal role in the riboflavin-mediated PC3 death. Therefore, our data imply that PI3K inhibition-induced prostate cancer cells death occurs through the action of FasL secreted by the cell acting on itself and neighboring like cells and/or through the action of Fas/FasL interactions on the cell surface of same cell or between like cells.

Intriguingly, our results show that the inhibition of ceramide synthase by Fumonisin B1 was able to counteract cell death provoked by riboflavin at concentrations of 20, 40 and 50 μ M, suggesting that riboflavin-induced PC3 cell death is associated to activation of Fas receptor induced via a ceramide-dependent pathway or *vice versa*. Interestingly, previous data from the literature have shown that ceramide as a second lipid messenger is involved in the reorganization of lipid rafts into ceramide-enriched platforms responsible for increase of Fas clustering and its activation (Verheij et al 1996; Cremesti et al., 2002; Hetz et al., 2002; Huang et al, 2004; Miyaji et al., 2005; Rotolo et al., 2005; Siskind, 2005; Souza et al., 2006) and also as a regulator of JNK (Verheij et al 1996). Conversely Fas ligation has been described to lead to ceramide release (Hetz

et al., 2002). In fact, increase in ceramide generation at the mitochondria, controlled by the ceramide synthase and ceramidase activities, seems occur prior the execution phase of apoptosis and recent evidence suggests that these event is due at least in part to the ceramide ability to form protein-permeable channels in the outer mitochondrial membrane inducing then release of cytochrome c and apoptogenic proteins such as Smac/DIABLO, HtrA2/Omi, and others (Siskind, 2005).

The reversible phosphorylation of proteins, regulated by protein kinases and protein phosphatases, influences virtually all cellular functions and it is an essential mechanism in the control of proliferation, differentiation and transformation (Aoyama et al., 2003; McCluskey et al., 2003; Ferreira et al., 2006). Riboflavin photoproducts decrease the phosphorylation level of both threonine and tyrosine residues. Interestingly, the decrease in phosphotyrosine/threonine residues indicates an inhibition of kinases or activation of protein tyrosine phosphatases and reinforce that the cytotoxic effects of irradiated riboflavin are mediated overcoat by the production of stable photoproducts, since it is known that tyrosine phosphatases are inhibited by oxidative stress. The inhibition of the serine/threonine phosphatase PP2A observed after the treatment is in agreement with other works that show induction of apoptosis by PP2A inhibitors (McCluskey et al., 2003).

The family of serine/threonine protein kinases MAPKs regulates diverse cellular activities running the gamut from gene expression, mitosis and metabolism to motility, survival and apoptosis (Lee and McCubrey, 2002). In order to evaluate the role of MAPKs in the induction of PC3 death by riboflavin the activation status of JNK and p38 MAPK was

analyzed and our results show that the cytotoxic effects of riboflavin photoproducts are related to the inhibition of p38 MAPK. p38 MAPK is a key protein for apoptosis induction in cancer cells, but in prostate cancer cells this kinase seems to be related to anti-apoptotic and metastatic processes (Ricote et al., 2005, Ricote et al., 2006a, Ricote et al., 2006b). IKK inhibition by riboflavin can also be considered as an important action for blocking the cellular proliferation. NF κ B is known to be critically important for tumor cell growth, angiogenesis and development of metastatic lesions. These processes occur, in part, due to the upregulated activity of IKK.

Additionally, we observed downregulation of STAT5 in PC3 cells treated with irradiated riboflavin. Various hormones and growth factors have been implicated in progression of prostate cancer, but their role and the underlying molecular mechanisms involved remain poorly understood. Growth hormone receptors usually activate cascade pathways which leading to involvement of intracellular signalling mediators, particularly Janus kinase (JAK) family of intracellular tyrosine kinases and the STAT transcription factors. In addition to activation of this pathway, signalling through Ras/Raf/MAPK and insulin receptor substrate-1 (IRS-1)/PI3K/Akt pathways has been reported to be activated by growth hormones, under various conditions and in certain cell types, including prostate cancer cells (Weiss-Messer et al., 2004).

Another important finding revealed in this present study was the inhibition of MMP-2 and 9 and RECK upregulation. RECK was originally found to suppress transformation in v-Ki-ras-transformed NIH3T3 fibroblasts. The glycoprotein RECK has serine protease inhibitor-like domains and a C-terminal tail of glycoposphatidylinositol anchoring the protein

extracellularly to the cell membrane where it inhibits MMPs. Prostate cancer is characterized by the occurrence of bone metastases in about 65% to 80% of patients with advanced disease. Animal studies have also shown that only prostate cancers expressing high levels of MMP-2 and MMP-9 have the ability to metastasize (Evans and Moller, 2003; Thurairaja et al., 2004; Carlin and Gerald, 2000). In normal tissue these enzymes are highly regulated.

One of the contributing factors to high mortality rate from prostate cancer is the extreme resistance of prostate cancer to apoptosis induced by traditional therapies (radio and chemotherapy). Thus, the specific induction of apoptosis in prostate cancer cells could play a strategic role for this cancer treatment. In this way, our findings pointed out riboflavin as a promising antitumoral agent, since this compound affected important molecular targets related to proliferation, resistance and invasibility of prostate cancer cells.

Acknowledgments:

The authors are grateful to Cláudia Soraggi and Denise DiCiampi for the technical assistance. PhD scholarships from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo for WF Zambuzzi (proc. 04/14906-2), KCS Queiroz (proc. 04/12072-7) and ACS Souza (02/12539-7).

5. REFERENCES

Ahmad I, Fasihullah Q, Vaid FHM. Effect of light intensity and wavelengths on photodegradation reactions of riboflavin in aqueous solution. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol* 2006; 82, 21-27.

Aoyama H, Silva TMA, Miranda MA and Ferrerira CV Proteínas tirosina fosfatases: propriedades e funções biológicas. *Quim. Nova* 2003; 26: 896-900.

Bertram J. *Cancer Res.* 2006; 66(9):4781-4788.

Carlin BI and Gerald LA. The natural history, skeletal complications and management of bone metastases in patients with prostate carcinoma. *Cancer* 2000; 88:2989-2994.

Cingi MR, De Angelis I, Fortunati E, Reggiani D, Bianchi V, Tiozzo R, Zucco F. Choice and standardisation of test protocols in cytotoxicology: a multicenter approach. *Toxicol. In Vitro* 1991; 5: 119-125.

Costa-Pereira AP, Cotter TG. Camptothecin sensitizes androgen-independent prostate cancer cells to anti-Fas-induced apoptosis. *Br J Cancer* 1999; 80:371-378.

Cremesti AE, Goni FM, Kolesnick R Role of sphingomyelinase and ceramide in modulating rafts: do biophysical properties determine biologic outcome? *FEBS Lett.* 2002; 531: 47-53

de Souza AP, Gerlach RF, Line SR. Inhibition of human gingival gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by metal salts. *Dent Mater.*; 2002; 16(2):103-108.

de Souza AC, Kodach L, Gadelha FR, Bos CL, Cavagis AD, Aoyama H, Peppelenbosch MP, Ferreira CV. A promising action of riboflavin as a mediator of leukaemia cell death. *Apoptosis* 2006; 11: 1761-1771.

Diaz M, Patterson SG. Management of androgen-independent prostate cancer. *Cancer Control* 2004; 11:364-373.

Edwards AM and Silva E. Effect of visible light on selected enzymes, vitamins and amino acids. *J Photochem Photobiol B: Biol.* 2001; 63: 126-131

Evans HS, Moller H. Recent trends in prostate cancer incidence and mortality in southeast England. *Eur Urol* 2003; 43:337-341.

Ferreira CV, Justo GZ, Souza ACS, Queiroz, KCS, Zambuzzi WF, Aoyama H,

- Peppelenbosch MP. Natural compounds as a source of protein tyrosine phosphatase inhibitors: application to the rational design of small-molecule derivatives. *Biochimie* 2006 (*In press*).
- Hartree EF. Determination of proteins: a modification of Lowry method that give a linear photometric response. *Anal Biochem.* 1972; 48: 422-427.
- Hetz CA, Hunn M, Rojas P, Torres V, Leyton L, Quest AF. Caspase-dependent initiation of apoptosis and necrosis by the Fas receptor in lymphoid cells: onset of necrosis is associated with delayed ceramide increase. *J Cell Sci.* 2002; 115: 4671-4683.
- Huang ST, Yang RC, Chen MY and Pang JH. *Phyllanthus urinaria* induces the Fas receptor/ligand expression and ceramide-mediated apoptosis in HL60 cells. *Life Sci.* 2004; 75: 339-351.
- Hyer ML, Voelkel-Johnson C, Rubinchik S, Dong J, Norris JS. Intracellular Fas ligand expression causes Fas-mediated apoptosis in human prostate cancer cells resistant to monoclonal antibody-induced apoptosis. *Mol Ther* 2000; 2:348-358.
- Lee JT Jr. and McCubrey JA. The Raf/MEK/ERK signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in leukemia. *Leukemia* 2002; 16: 486-507.
- McCluskey A, Ackland SP, Bowyer MC, Baldwin ML, Garner J, Walkom CC and Sakoff JA. Cantharidin analogues: synthesis and evaluation of growth inhibition in a panel of selected tumor cell lines. *Bioorg Chem.* 2003; 31: 68-79.
- Miyaji M, Jin ZX, Yamaoka S, Amakawa R, Fukuhara S, Sato SB, Kobayashi T, Domae N, Mimori T, Bloom ET, Okazaki T, Umehara H. Role of membrane sphingomyelin and ceramide in platform formation for Fas-mediated apoptosis. *J Exp Med.* 2005; 202: 249-259.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Meth.* 1983; 65: 55-63.
- Navarro D, Luzardo OP, Fernandez L, Chesa N, Diaz-Chico BN. Transition to androgen-independence in prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002; 81:191-201.
- Nelson WG. Agents in development for prostate cancer prevention. *Expert Opin Investg Drugs* 2004; 13:1541-1554.
- Renzi D, Valtolini M, Forster, R. The evaluation of a multi-endpoint cytotoxicity assay system. *ATLA* 1993; 21: 89-96.
- Ricote Belinchon M, Bethencourt Codes FR, Garcia-Tunon Llanio I, Fraile Laiz B, Fernandez Saez C, Aller Tresguerres P, Gonzalez-Garcia J, Vera San Martin R, Paniagua Gomez-Alvarez R, Royuela Garcia M. Anti-apoptotic potencial role of p38 in prostate cancer. *Actas Urol Esp.* 2005; 29(8):769-76.
- Ricote M, García-Tuñón I, Bethencourt F, Fraile B, Onsurbe P, Paniagua R and Royuela M. The p38 transduction pathway in prostatic neoplasia. *J. Pathol.* 2006(a); 208: 401-407.
- Ricote M, García-Tuñón I, Fraile B, Fernández C, Aller P, Paniagua R and Royuela M. p38 MAPK protects against TNF- α -provoked apoptosis in LNCaP prostatic cancer cells. *Apoptosis* 2006 (b); 11(11): 1969-1975.
- Riddell RJ, Clothier RH, Balls, M. An evaluation of three in vitro cytotoxicity assays. *Food Chem. Toxicol.* 1986; 24: 469-471.
- Rotolo JA, Zhang J, Donepudi M, Lee H, Fuks Z, Kolesnick R. Caspase-dependent and-independent activation of acid

- sphingomyelinase signaling. *J Biol Chem.* 2005; 280: 26425-26434.
- Silva E, Ugarte R, Andrade A, Edwards AM. Riboflavin-sensitized photoprocesses of tryptophan. *J Photochem Photobiol B: Biol.* 1994; 23: 43-48.
- Siskind LJ. Mitochondrial Ceramide and the induction of apoptosis. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 2005; 37: 143-153.
- Thurairaja R, McFarlane J, Traill Z, Persad R. State-of-the-art approaches to detecting early bone metastasis in prostate cancer. *BJU Int* 2004; 94: 268–271.
- Verheij M, Bose R, Lin XH, Yao B, Jarvis WD, Grant S, Birrer MJ, Szabo E, Zon LI, Kyriakis JM, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, Kolesnick RN. Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature* 1996; 380: 75-79.
- Weiss-Messer E, Merom O, Adi A, Karry R, Bidosee M, Ber R, Kaploun A, Stein A, Barkey RJ. *Mol Cell Endocrinol.* 2004; 220(1-2):109-23

8. DISCUSSÃO

Embora a busca por compostos naturais capazes de prevenir ou curar doenças seja uma prática antiga na história da humanidade, o interesse no conhecimento da atividade biológica desses compostos e o desenvolvimento de novas moléculas, potencialmente mais efetivas que as de origem, têm impulsionado as mais diversas áreas de pesquisa atuais. De fato, a natureza parece ser uma fonte inesgotável de moléculas estruturalmente diferentes capazes de exercer os mais variados efeitos biológicos e, por isso, tidas como potenciais agentes terapêuticos. Nesse sentido, muitos compostos naturais (ou derivados sintéticos destes) têm sido estudados e avaliados como potenciais agentes terapêuticos na prevenção e tratamento do câncer, considerado a principal causa de mortes na população mundial, de acordo com a Organização Mundial da Saúde.

No presente estudo, riboflavina e fisetin foram avaliados quanto à potencialidade de ação antitumoral em linhagens de câncer prostático humano (PC3) e leucemia mielóide (HL60). Visando a um maior conhecimento sobre o mecanismo de ação molecular desses compostos e a determinação de potenciais alvos terapêuticos, moléculas sinalizadoras-chave foram avaliadas quanto a expressão e/ou atividade após tratamento das células tumorais. Células HL60 foram tratadas com riboflavina ou fisetin por 24 horas, enquanto que células tumorais prostáticas PC3 foram submetidas a tratamento com riboflavina pelo mesmo período de tempo.

Os resultados demonstram que, tanto a riboflavina irradiada quanto fisetin atuam como efetivos indutores de morte das células PC3 e HL60, levando a uma redução de 50% na viabilidade celular quando utilizados em concentrações na faixa de micromolar. Em relação à riboflavina, observa-se que quando submetida a irradiação adquire propriedade citotóxica não encontrada na molécula não irradiada, como demonstrado pela comparação de tratamentos com riboflavina ou riboflavina irradiada nas células HL60 e PC3. Neste caso, pode ser observado que o tratamento com a vitamina na sua forma não irradiada não é capaz de reduzir a viabilidade celular mesmo em tratamentos com riboflavina

na concentração de 50µM. Contrariamente, quando irradiada a riboflavina revela-se eficaz redutora de viabilidade, apresentando valores de IC₅₀ de 10µM ou entre 15 e 40µM para células HL60 e PC3, respectivamente.

Interessante observar que o efeito citotóxico da riboflavina ainda pode ser detectado mesmo em células tratadas com riboflavina irradiada 24 horas antes do tratamento, indicando que os efeitos anti-proliferativos da riboflavina estão relacionados à ação de fotoprodutos estáveis. Resultados concordantes obtidos pelo grupo de Edwards (Edwards *et al.*, 1994; Edwards *et al.*, 1999b) demonstraram que as espécies radiculares geradas durante a irradiação da riboflavina não são capazes de afetar as células assim que o processo de irradiação é interrompido devido ao reduzido tempo de vida ou à baixa concentração em que são formadas essas espécies, como é o caso do H₂O₂. Recentes estudos (Ahmad *et al.*, 2006; Ahmad *et al.*, 2004a; Ahmad *et al.*, 2004b; Holzer, *et al.*, 2005) têm investigado a natureza dos fotoprodutos gerados durante a irradiação da riboflavina em soluções aquosas e a fotoquímica das reações que os originam. Os resultados obtidos mostram que a riboflavina quando submetida a radiação UV ou visível é degradada através de uma variedade de reações entre as quais reações de fotólise (fotoredução intramolecular) e fotoadição (fotoadição intramolecular), resultando na formação de uma série de produtos, tais como 7,8-dimetil-10-(formilmetil)-isoaloxazina, lumicromo, lumiflavina e ciclodehidroriboflavina.

A investigação do mecanismo molecular de ação da riboflavina em células HL60 e PC3 mostrou que em ambas as linhagens o processo de indução de morte é bastante similar, tendo como base a ação da riboflavina como moduladora de vias de transdução de sinal relacionadas a sobrevivência, proliferação e morte celular. Basicamente, os efeitos citotóxicos da riboflavina estão relacionados a sua capacidade de induzir a via extrínseca de ativação da maquinaria apoptótica através do aumento da expressão do receptor de morte Fas e seu ligante FasL. Desta forma, a inibição do receptor Fas, através da ação de anticorpo anti-Fas neutralizante, mostra ser capaz de proteger quase que

completamente, tanto células HL60 quanto PC3 dos efeitos citotóxicos da riboflavina sendo a ativação do sistema Fas/FasL evento indispensável à indução de morte dessas células. É Interessante frisar que, tanto HL60 quanto PC3 são reconhecidas pela resistência à morte celular mediada pelo sistema Fas/FasL, fato este indicador de que o mecanismo molecular de ação da riboflavina também, de alguma forma, mostra sensibilizar as células tumorais à indução de apoptose pela via extrínseca.

A resistência adquirida ou inata à indução de morte pelas células tumorais frente aos tratamentos antitumorais convencionais, constitui o principal obstáculo no tratamento de pacientes com câncer, especialmente nos casos de neoplasias hematológicas onde, ao contrário do que ocorre com tumores sólidos, o tratamento cirúrgico mostra-se pouco viável, fazendo com que a quimioterapia ainda seja a principal conduta terapêutica de escolha (Kappelmayer *et al.*, 2004). Uma vez que células tumorais freqüentemente respondem a tratamentos antitumorais com aumento de síntese e acúmulo de ceramida endógena, tem sido postulado que o desequilíbrio do metabolismo da ceramida, resultando em diminuição de sua concentração, pode contribuir para a resistência à indução de apoptose das células tumorais frente aos tratamentos rádio e quimioterápicos (Kester and Kolesnick, 2003; Ogretmen and Hannun, 2001). A ação citotóxica da riboflavina irradiada sobre as células HL60 e PC3 demonstrou ser dependente da atividade das enzimas ceramida sintase e esfingomielinase ácida, indicando que o mecanismo molecular de indução de morte pela riboflavina está associado à capacidade da vitamina irradiada em estimular o aumento da síntese de ceramida, promovendo a sensibilização celular ao estímulo de morte. Visto o reconhecido papel da ceramida na reorganização de “rafts” de membrana e favorecimento da agregação e ativação de receptores de morte, a ação citotóxica da riboflavina irradiada mostra-se mediada não somente pelo aumento na expressão de FasL e do receptor de morte Fas, mas também pela sensibilização das células tumorais às vias extrínseca e intrínseca de ativação apoptótica, num mecanismo dependente do aumento na geração de ceramida na membrana plasmática e nas mitocôndrias. Assim sendo, a ativação do sistema Fas/FasL e o aumento na síntese de ceramida

constituem eventos primários indispensáveis à sensibilização de células tumorais ao estímulo de morte e à indução de apoptose pela riboflavina irradiada.

É importante notar que, apesar do mecanismo de ação da riboflavina ser mediado primariamente pela ativação da via extrínseca de morte celular, o tratamento das células leucêmicas e prostáticas com riboflavina irradiada depende também em maior ou menor grau, da concentração de riboflavina utilizada, do tipo celular e também da ativação concomitante da via apoptótica mitocondrial. Como demonstrado, o pré-tratamento das células tumorais prostáticas e leucêmicas com Fumonisina B1 (inibidora da enzima ceramida sintase) é capaz de proteger significativamente, tanto HL60 quanto PC3, indicando a importância do aumento da síntese de ceramida na mitocôndria e/ou retículo endoplasmático para o mecanismo de citotoxicidade da riboflavina irradiada. De fato, recentes trabalhos têm demonstrado a habilidade da ceramida em formar poros na membrana mitocondrial, induzindo a ativação da via intrínseca apoptótica. Assim sendo, pode-se afirmar que o mecanismo citotóxico da riboflavina irradiada depende da amplificação da maquinaria apoptótica, através da ativação da via de morte celular intrínseca a qual parece ser de fundamental importância, principalmente na indução de morte das células PC3 ou em tratamentos de HL60 com maiores concentrações de riboflavina. Desta maneira, tratamento de células HL60 com riboflavina 5 μ M em condições onde haja indisponibilidade do receptor Fas, como nos tratamentos com anticorpo Fas neutralizante, mostra que, na ausência do receptor de morte, os efeitos citotóxicos da riboflavina irradiada são completamente anulados, revelando que, em baixas concentrações, a via apoptótica extrínseca é a indutora primária de morte celular e que nessas condições a via mitocondrial somente não é suficiente para induzir a morte de células HL60.

Além do aumento na síntese de ceramida, o mecanismo de morte celular induzido pela riboflavina parece sensibilizar as células-alvo ao estímulo de morte, através da inibição de importantes vias de sinalização relacionadas à proliferação e sobrevivência celulares além de, simultaneamente,

contribuir para a ativação da maquinaria apoptótica, inibindo a progressão do ciclo celular e estimulando a expressão/ativação de fatores apoptogênicos. Células HL60 e PC3 tratadas com riboflavina irradiada mostraram sofrer completa inibição de PI3K/Akt, via de sinalização chave na sobrevivência celular, além de terem diminuídas as expressões de STAT1/2 e STAT5b, moléculas mediadoras do crescimento celular. É importante destacar que o tratamento de PC3 com riboflavina irradiada mostrou também inibir a atividade de IKK α prevenindo, portanto, a ativação de NF κ B (fator de transcrição associado ao estímulo do crescimento tumoral, da angiogênese e do desenvolvimento de lesões metastáticas). Ainda em células HL60, a riboflavina irradiada foi capaz de inibir a progressão do ciclo celular de maneira p53-independente, através da inibição da expressão de PCNA e aumento da expressão de p21, contribuindo também para a criação de um ambiente intracelular favorecedor da ativação de caspases, como indicado pela diminuição da razão Bcl-2/Bax, alteração do potencial de membrana mitocondrial e diminuição da expressão de IAP1.

É interessante mencionar que a ação da riboflavina irradiada nas células HL60 e PC3 parece estar fortemente associada à sua capacidade de modular a atividade de proteínas quinases e fosfatases. Desta maneira, o tratamento das células HL60 e PC3 com riboflavina alterou, de maneira célula-específica, os níveis de proteínas fosforiladas em resíduos de treonina ou tirosina. Os resultados obtidos mostram que a ação citotóxica da riboflavina irradiada nas células HL60 é mediada pelo aumento do número de proteínas fosforiladas em treonina (Figura 4, Anexos), enquanto que um efeito contrário pode ser observado no tratamento das células PC3, nas quais o mecanismo citotóxico da riboflavina irradiada parece estar mais associado à redução do número de resíduos de fosfotreonina. Porém, em relação à fosforilação em resíduos de tirosina, o tratamento com riboflavina levou a resultados iguais em ambas as linhagens, nas quais pode-se observar diminuição nos níveis de proteínas fosforiladas em tirosina o que, entre outras coisas, indica o possível papel da riboflavina como indutora da atividade de proteínas tirosinas fosfatases ou inibidora de proteínas tirosina quinases. Esses

resultados reforçam a hipótese de que os efeitos citotóxicos da riboflavina irradiada sejam mediados pela ação de fotoprodutos estáveis, desde que proteínas tirosina fosfatases apresentem como característica sensibilidade a agentes oxidantes os quais provocam a inibição da atividade dessa família de enzimas.

O papel da riboflavina irradiada como moduladora da atividade de proteínas quinases e fosfatases em células HL60 e PC3 pode ainda ser demonstrado pela ação dessa vitamina inibindo a atividade da serina/treonina fosfatase PP2A, principal proteína serina/treonina fosfatase envolvida na regulação de vias de transdução de sinal e de vários processos celulares (Van Hoof and Goris, 2003; Yu *et al.*, 2004; Janssens, 2005). Apesar de a atividade de PP2A estar altamente correlacionada à supressão do crescimento e desenvolvimento tumoral, vários trabalhos têm associado a inibição da atividade dessa enzima com indução de morte celular por apoptose (McClusKey *et al.*, 2003). Além disso, a supressão da atividade de PP2A tem sido correlacionada ao processo de diferenciação em células HL60 (Uzunoglu *et al.*, 1999; Bhoola and Hammond, 2000), indicando que a indução de morte nessas células possa ser resultado de um processo de diferenciação terminal induzido pela riboflavina.

A família das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) é conhecida pelo importante papel na regulação dos mais variados processos celulares. De fato, os diferentes membros dessa família de proteínas serina treonina quinases controlam eventos tão distintos quanto a proliferação e a morte celular o que, conseqüentemente, torna os membros desta família potenciais alvos terapêuticos. O mecanismo antiproliferativo da riboflavina irradiada nas células HL60 e PC3 mostrou envolver alteração da expressão das formas ativas de MAPKs de maneira específica em cada tipo celular, como pode ser observado pela inibição de ERK, MEK e JNK nas células leucêmicas, enquanto que nas células tumorais prostáticas, a p38 destaca-se como alvo de inibição pela riboflavina irradiada. Nas células HL60, a inibição da via MEK/ERK confirma a importância dessa família de MAPKs na sobrevivência e proliferação celular, sendo que a inibição dessa via mostra-se importante mecanismo

sensibilizador à morte apoptótica induzida por Fas nessas células (Holmstrom *et al.*, 2000; Tran *et al.*, 2001). É interessante citar que a p38, MAPK conhecida pela importante atividade indutora de apoptose em células tumorais, teve sua expressão inibida em PC3 mostrando que, neste tipo tumoral específico, a inibição de p38 constitui valiosa estratégia terapêutica (Ricote *et al.*, 2005). Assim sendo, fica evidente a importância da atividade de MAPKs na determinação do destino celular e a necessidade do conhecimento da atividade biológica de cada membro da família nos diferentes tipos celulares, a fim de se desenvolverem estratégias terapêuticas mais eficazes no tratamento das doenças neoplásicas.

Além das atividades antiproliferativa e pró-apoptóticas, a riboflavina irradiada também exerce importante atividade antimetastática, conforme verificado por seu efeito inibidor de metaloproteinases em células PC3. Nessas células, o tratamento com riboflavina irradiada induziu inibição da atividade das metaloproteinases 2 e 9 (MMP-2, MMP-9) num mecanismo envolvendo aumento da expressão da glicoproteína RECK, regulador negativo da atividade dessa classe de proteases. Uma vez que, somente tumores prostáticos que apresentam altos níveis de atividade de MMP-2 e MMP-9 têm mostrado evoluir para uma condição metastática (Carlin and Gerald, 2000; Evans and Moller, 2003; Thuraija *et al.*, 2004), o tratamento com riboflavina irradiada mostra-se capaz de não somente induzir a morte das células tumorais, mas também evitar a evolução do câncer prostático a fases mais avançadas, em que a possibilidade de tratamento eficaz é altamente reduzida, levando às altas taxas de mortalidade associadas a esse tipo tumoral.

Assim como o tratamento de células HL60 com riboflavina, o flavonóide fisetin também mostrou ser efetivo indutor de apoptose nessa linhagem celular, reduzindo pela metade o número de células viáveis quando utilizado na concentração de 30 μ M. Outros dados da literatura mostram também a ação citotóxica do fisetin sobre células tumorais, embora o exato mecanismo molecular de ação desse flavonóide ainda não seja completamente conhecido (Chen *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002). Os resultados obtidos revelam que a ação citotóxica do fisetin está associada à ativação da caspase 3 e à sua

capacidade de alterar direta ou indiretamente a atividade de proteínas quinases e fosfatases, como demonstrado pelo aumento nos níveis de proteínas fosforiladas em tirosina e treonina e pela inibição de proteínas fosfatases citosólicas. O tratamento de células HL60 com fisetin alterou a expressão e ativação de MAPKs, induzindo aumento da expressão das formas ativas de JNK e p38 e diminuição da expressão de ERK fosforilada. Da mesma maneira o tratamento de células HL60 com riboflavina inibiu a ativação de ERK revelando que nessas células ERK está diretamente relacionada a vias de sobrevivência e proliferação sendo, portanto, potencial alvo molecular para a indução de morte de células leucêmicas. É importante citar que, a quantificação da atividade das enzimas aconitase, fumarase, catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase (MnSOD e CuZnSOD) indicou que o tratamento de HL60 com fisetin induz estresse oxidativo. Uma vez demonstrado o papel de ROS na inibição da atividade de MAPKs fosfatases (MKPs), importantes enzimas associadas à regulação da atividade de MAPKs (Davis, 2000; Vadim et al., 2005), os resultados obtidos sugerem que fisetin estimula a atividade das MAPKs JNK e p38, provavelmente através de um mecanismo associado à produção de ROS e inibição de MKPs. Adicionalmente, o fato de fisetin inibir a atividade de fosfatases citosólicas quando adicionado ao extrato celular indica que a capacidade desse composto de inibir a atividade de enzimas fosfatases pode não somente ser mediada pela ação de ROS, mas também por interação direta do fisetin com a proteína alvo. Embora flavonóides sejam reconhecidos por agirem como importantes agentes antioxidantes, os resultados aqui apresentados revelam que a atividade anticarcinogênica desses compostos pode, ao contrário, estar associada à indução de geração de ROS no ambiente celular. Os resultados obtidos reforçam a hipótese de que a ação celular do fisetin, assim como de muitos outros flavonóides e seus metabólitos, está fortemente associada à sua capacidade direta ou indireta de modular a atividade de importantes proteínas quinases e fosfatases, tais como PI3K, PKB/Akt, tirosina quinases e MAPKs mostrando, portanto, o potencial anti-leucêmico de tais

compostos como reguladores da expressão gênica e moduladores de importantes vias de transdução de sinal relacionadas à determinação do destino celular.

Importante destacar que a indução de estresse oxidativo pelo tratamento das células HL60 com fisetin mostrou estar associada à diminuição da atividade de enzimas antioxidantes e ao aumento da expressão do fator de transcrição NFκB. Embora ROS sejam reconhecidos como potentes indutores de apoptose, os resultados obtidos no presente trabalho reforçam dados da literatura (Kroemer *et al.*, 1997; Dumont *et al.*, 1999) que associam essas espécies ao aumento da expressão de NFκB e estimulação de sua atividade como agente pró-apoptótico. Embora a maior parte dos trabalhos encontrados na literatura reportem a atividade indutora de sobrevivência e proliferação de NFκB, um número crescente de estudos tem associado a ação desse fator de transcrição como indutor de morte celular sob certas condições (Lin *et al.*, 1995; Carter *et al.*, 1996; Grill and Memo, 1999; Grimm *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 1999). Assim sendo, a inibição ou estimulação de NFκB com finalidade terapêutica deve levar em consideração a atividade fisiológica dessa molécula no tipo celular a ser tratado e, também, o efeito de um estímulo específico na indução das atividades pró ou anti-apoptóticas de NFκB.

Diante dos resultados obtidos no presente trabalho, riboflavina e fisetin demonstram promissora atividade antitumoral, desde que estes compostos tem a capacidade de modular vias de transdução de sinal, afetando importantes alvos moleculares relacionados a sobrevivência, proliferação, migração e resistência de células tumorais. Adicionalmente, ambos os compostos não exercem atividade citotóxica quando utilizados no tratamento de linfócitos humanos (dado não mostrado) indicando que além de potentes indutores de morte tumoral ainda se destacam pela especificidade de ação e reduzida toxicidade sobre células não transformadas.

9. CONCLUSÃO

Produtos naturais são fontes inesgotáveis para o desenvolvimento de fármacos com diferentes mecanismos de ação. Nesse contexto, o estudo de transdução de sinal apresenta-se como ferramenta interessante para a identificação de alvos moleculares, e conseqüentemente definição da especificidade e direcionamento terapêutico. No presente trabalho, ficou evidente o potencial da riboflavina e do fisetin como antitumorais, apresentando algumas características interessantes:

- Riboflavina e Fisetin são potentes agentes indutores de apoptose em células tumorais. Ambos os compostos afetam profundamente a função celular, alterando o estado de fosforilação de moléculas alvos e/ou modulando a expressão gênica. Por essa razão, riboflavina e fisetin podem ser considerados compostos naturais promissores para a terapêutica de doenças neoplásicas, capazes de modular seletivamente importantes vias de transdução de sinais.

- Os efeitos citotóxicos do fisetin estão associados ao aumento da geração de ROS e à modulação de cascatas de sinalização controladas por proteínas quinases e fosfatases. Células HL60 tratadas com este flavonóide apresentaram aumento na expressão da subunidade p65 do fator de transcrição NFκB, ativação das MAPKs p38 e JNK, aumento nos níveis de fosfoproteínas e inibição de enzimas envolvidas na manutenção do estado redox.

- O mecanismo molecular envolvido na ação citotóxica da riboflavina sobre as células HL60 e PC3 é dependente da ativação da via extrínseca de indução de apoptose, resultado dos aumentos na expressão de Fas e FasL, da síntese de ceramida e amplificação da atividade da maquinaria intracelular de morte, através do recrutamento mitocondrial. O processo é acompanhado por alteração da atividade de MAPKs, inibição de moléculas mediadoras de sobrevivência e proliferação celular, alteração dos níveis de fosfoproteínas e redução na atividade de metaloproteinases. Desta maneira, a riboflavina mostra atuar sobre importantes alvos moleculares relacionados à proliferação, resistência e migração celular, mostrando-se potencial agente antileucêmico e promissor agente terapêutico no tratamento das formas hormônio-refratárias de tumores prostáticos.

- De maneira interessante, o tratamento das células tumorais com riboflavina resultou em inibição das atividades de PP2A e p38, as quais estão freqüentemente associadas à supressão do crescimento tumoral, enquanto que o tratamento de HL60 com fisetin estimulou a atividade pró-apoptótica de NFκB. Logo, a escolha de alvos moleculares para o tratamento das doenças proliferativas deve levar em consideração a natureza do estímulo promotor de morte bem como o tipo celular específico, fatores que irão determinar a natureza da atividade exercida por uma molécula frente ao estímulo de morte.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham, M. C., Shaham, S. (2004) Death without caspases, caspases without death. *Trends Cell. Biol.* **14**, 184-193.
- Ahmad, I., Fasihullah, Q., Noor, A., Ansari, I. A. Ali, Q. N. M. (2004a) Photolysis of riboflavin in aqueous solution: a kinetic study. *Int. J. Pharm.* **280**, 199-208.
- Ahmad, I., Fasihullah, Q., Vaid, F. H. M. (2006). Effect of light intensity and wavelengths on photodegradation reactions of riboflavin in aqueous solution. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol* **82**, 21-27.
- Ahmad, I.; Fasihullah, Q., Vaid, F. H. M. (2004b) A study of simultaneous photolysis and photoaddition reactions of riboflavin in aqueous solution. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **75**, 13-20.
- Alexander, D. R. (2000) The CD45 tyrosine phosphatase: a positive and negative regulator of immune cell function. *Sem. Immunol.* **12**, 349-359.
- Allen, R. G., Tresini, M. (2000) Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic. Biol. Med.* **28**, 463-499.
- Alonso, A., Sasin, J., Bottini, N., Friedberg, I., Osterman, A., Godzik, A., Hunter, T., Dixon, J., Mustelin, T. (2004) Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell.* **117**, 699-711.
- Andersen, J. N., Jansen, P. G., Echwald, S. M., Mortensen, O. H., Jukada, T., Del Vecchio, R., Tonos, N. K., Moller, N. P. H. (2004) A genomic perspective on protein tyrosine phosphatases: gene structure, pseudogenes, and genetic disease linkage. *FASEB J.* **18**, 8-30.
- Anglade, P., Vyas, S., Javoy-Agid, F., Herrero, M. T., Michel, P. P., Marquez, J., Mouatt-Pringent, A., Ruberg, M., Hirsch, E. C., Agid, Y. (1997) Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histol. Histopathol.* **12**, 25-31.
- Aoyama, H., Silva, T. M. A., Miranda, M. A., Ferreira, C. V. (2003) Proteínas tirosina fosfatases: propriedades e funções biológicas. *Quim. Nova.* **26**, 896-900.
- Assefa, Z., Vantieghen, A., Garmyn, M., Declercq, W., Vandernabeele, P., Vandenneede, J. R., Bouillon, R., Merlevede, W., Agostinis, P. (2000) p38 mitogen-activated protein kinase regulates a novel, caspase-independent pathway for the mitochondrial cytochrome c release in ultraviolet b radiation-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **275**, 21416-21421.
- Assunção, G. C., Linden, R. (2004) Programmed cell death: apoptosis and alternative death styles. *Eur. J. Biochem.* **271**, 1638-1650.
- Balunas, M. J., Kinghorn, A. D. (2005) Drug discovery from medicinal plants. *Life Sci.* **78**, 431-441.

- Barnhart, B. C., Lee, J. C., Alappat, E. C., Peter, M. E. (2003) The death effector domain protein family. *Oncogene*. **22**, 8634-8644.
- Bertram, J., Peacock, J. W., Tan, C., Mui, A. L., Chung, S. W., Gleave, M. E., Deadhar, S., Cox, M. E., Ong, C. J. (2006) Inhibition of the phosphatidylinositol 3'kinase pathway promotes autocrine Fas-induced death of phosphatase and tensin homologue-deficient prostate cancer cells. *Cancer Res*. **66**, 4781-4788.
- Bhoola, R., Hammond, K. (2000) Modulation of the rhythmic patterns of expression of phosphoprotein phosphatases in human leukaemia cells. *Cell. Biol. Int*. **24**, 539–547.
- Blagosklonny, M., Alvarez, M., Fojo, A., Neckers, L. M. (1996) Bcl-2 protein downregulation is not required for differentiation of multidrug resistant HL60 leukemia cells. *Leuk. Res*. **20**, 101-107.
- Blaskovich, M. A., Sun, J., Cantor, A., Turkson, J., Jove, R., Sebt, S. M. (2003) Discovery of JSI-124 (cucurbitacin I), a selective Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway inhibitor with potent antitumor activity against human and murine cancer cells in mice. *Cancer Res*. **63**, 1270-1279.
- Brinkworth, R. I., Stoermer, M. J., Fairlie, D. P. (1992) Flavones are inhibitors of HIV-1 proteinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **188**, 631–637.
- Butler, M. S. (2004). The role of natural product chemistry in drug discovery. *J. Nat. Prod*. **67**, 2141–2153.
- Buzzi, M., Lu, L., Lombardi, A. J., Posner, M. R., Brautigan, D. L., Fast, L. D., Frackelton, A. R. (1992) Differentiation-induced changes in protein-tyrosine phosphatase activity and commensurate expression of CD45 in human leukemia cell lines. *Cancer Res*. **52**, 4027-4035.
- Cano, E., Mahadevan, L. C. (1995) Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *Trends Biochem. Sci*. **20**, 117-122.
- Carlin, B.I., Andriole, G. L. (2000) The natural history, skeletal complications and management of bone metastases in patients with prostate carcinoma. *Cancer* **88**, 2989–2994.
- Carter, B. D., Kaltschmidt, C., Kaltschmidt, B., Offenhauser, N., Bohm, M. R, Baeuerle, P. A. Barde, Y. A. (1996) Selective activation of NF-kappaB by nerve growth factor through the neurotrophin receptor p75. *Science* **272**, 542-545.
- Cataldo, A. M., Hamilton, D. J., Barnett, J. L., Paskevich, P. A., Nixon, R. A. (1996) Properties of the endosomal-lysosomal system in the human central nervous system: disturbances mark most neurons in populations at risk to degenerate in Alzheimer's disease. *J. Neurosci*. **16**, 186-199.

- Chang, L., Karin, M. (2001) Mammalian Map kinase signalling cascades. *Nature* **410**, 37-40.
- Chen, Y. C., Shen, S. C., Lee, W. R., Lin, H. Y., Ko, C. H., Shih, C. M., Yang, L. L. (2002) Wogonin and fisetin induction of apoptosis through activation of caspase 3 cascade and alternative expression of p21 protein in hepatocellular carcinoma cells SK-HEP-1. *Arch. Toxicol.* **76**, 351–359.
- Chiang, C. W., Kanies, C., Kim, K. W., Fang, W. B., Parkhurst, C., Xie, M., Henry, T., Yang, E. (2003) Protein phosphatase 2A dephosphorylation of phosphoserine 112 plays the gatekeeper role for Bad-mediated apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 6350-6362.
- Chiarugi, P., Taddei, M. L., Schiavone, N., Papucci, L., Giannoni, E., Fiaschi, T., Capaccioli, S., Raugei, G., Ramponi, G. (2004) LMW-PTP is a positive regulator of tumor onset and growth. *Oncogene* **23**, 3905–3914.
- Cory, S., Adams, J. M. (2002) The Bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer.* **2**, 647-656.
- Costa-Pereira, A. P., Cotter, T. G. (1999) Camptothecin sensitizes androgen-independent prostate cancer cells to anti-Fas-induced apoptosis. *Br. J. Cancer* **80**, 371–378.
- Cowan, K. J., Storey, K. B. (2003) Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *J. Exp. Biol.* **206**, 1107-1115.
- Cross, T. G., Toellner, D. S., Henriquez, N. V., Deacon, E., Salmon, M. and Lord, J. M. (2000) Serine/threonine protein kinases and apoptosis. *Exp. Cell. Res.* **256**, 34-41.
- Davis R.J. (2000) Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* **103**, 239-252.
- de Souza, A. C., Kodach, L., Gadelha, F. R., Bos, C. L., Cavagis, A. D., Aoyama, H., Peppelenbosch, M. P., Ferreira, C. V. (2006) A promising action of riboflavin as a mediator of leukaemia cell death. *Apoptosis* **11**, 1761-1771.
- Degterev, A., Boyce, M., Yuan, J. (2003) A decade of caspases. *Oncogene* **22**, 8543-8567.
- Diaz, M., Patterson, S. G. (2004) Management of androgen-independent prostate cancer. *Cancer Control.* **11**, 364–373.
- Donepudi, M., Grütter, M. (2002) Structure and zymogen activation of caspases. *Biophys. Chem.* **101-102**, 145-153.
- Dumont, A., Hehner, S. P., Hofmann, T. G., Ueffing, M., Dröge, W., Schmitz M. L. (1999) Hydrogen peroxide-induced apoptosis is CD95-independent, requires the release of mitochondria-derived reactive oxygen species and the activation of NF- κ B. *Oncogene*, **18**, 747-757.

- Dunn, W. A. Jr. (1990) Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole. *J. Cell. Biol.* **110**, 1923-1933.
- Edwards A. M, Barredo F., Silva, E., De Ioannes, A. E., Becker, M.I. (1999a) Apoptosis induction in nonirradiated human HL60 and murine NOS/2 tumor cells by photoproducts of Indole-3-acetic acid and riboflavin. *Photochem. Photobiol.* **70**, 645–649.
- Edwards, A. M, Silva, E., Jofré, B., Becker, M.I., De Ioannes A. E (1994) Visible light effects on tumoral cells in a culture medium enriched with tryptophan and riboflavin. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **24**, 179–186
- Edwards, A. M., Bueno, C., Saldaño, A., Silva, E., Kassab, K., Polo, L., Jori, G. (1999b) Photochemical and pharmacokinetic properties of select flavins. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **48**, 36-41.
- Edwards, A. M., Silva, E. (2001) Effect of visible light on selected enzymes, vitamins and amino acids. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **63**, 126-131.
- Evans H. S., Moller, H. (2003) Recent trends in prostate cancer incidence and mortality in southeast England. *Eur. Urol.* **43**, 337–341.
- Ferreira, C. V., Justo, G. Z., Souza, A. C. S., Queiroz, K. C. S., Zambuzzi, W. F., Aoyama, H., Peppelenbosch, M. P. (2006) Natural compounds as a source of protein tyrosine phosphatase inhibitors: Application to the rational design of small-molecule derivatives. *Biochimie* **88**, 1859-1873.
- Ferricola, P. C., Cody, V., Middleton, E. Jr. (1989) Protein kinase C inhibition by plant flavonoids: kinetic mechanisms and structure–activity relationships. *Biochem. Pharmacol.* **381**, 1617–1624.
- Fischer, U., Schulze-Osthoff, K. (2005) New approaches and therapeutics targeting: apoptosis in disease. *Pharmacol. Rev.* **57**, 187-215.
- Fotsis, T., Pepper, M. S., Aktas, E., Breit, S., Rasku, S., Adlercreutz, H., Wahala, K., Montesano, R., Schweigerer, L. (1997) Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vivo angiogenesis. *Cancer Res.* **57**, 2916–2921.
- Garcia, A., Cayla, X., Guergnon, J., Dessauge, F., Hospital, V., Rebollo, M. P., Fleischer, A., Rebollo, A. (2003) Serine/threonine phosphatases PP1 and PP2A are key players in apoptosis. *Biochimie* **85**, 721-726.
- Genoux, D., Haditsch, U., Knobloch, M., Michalon, A., Storn, D., Mansuy, I. M. (2002) Protein phosphatase 1 is a molecular constraint on learning and memory. *Nature* **418**, 970-975.
- Ghobrial, I. M., Witzig, T. E., Adjei, A. A. (2005) Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J. Clin.* **55**, 178-194.

- Gottlieb, R. A. (2000) Mitochondria: execution central. *FEBS Lett.* **482**, 6-12.
- Grilli, M., Memo, M. (1999) Nuclear factor kappa B/Rel proteins: a point of convergence of signaling pathways relevant in neuronal function and dysfunction. *Biochem. Pharmacol.* **57**, 1-7.
- Grimm, S., Bauer, M. K., Baeuerle, P. A., Schulze Osthoff, K. (1996) Bcl-2 downregulates the activity of transcription factor NF-kappa B induced upon apoptosis. *J. Cell. Biol.* **134**, 13-23.
- Guharay J., Sengupta, B., Sengupta, P. K. (2001) Protein-flavonol interaction: fluorescence spectroscopic study. *Proteins.* **43**, 75–81.
- Haddad, A. Q., Venkateswaran, V., Teahan, S. J., Fleshner, N. E., Klotz, L. H. (2006) Novel antiproliferative flavonoids induce cell cycle arrest in human prostate cancer cell lines. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* **9**, 68-76.
- Haddad, J. J. (2004) Oxygen sensing and oxidant/redox-related pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **316**, 969-977.
- Hahn, W. C. (2004) Identification of specific PP2A complexes involved in human cell transformation. *Cancer Cell.* **5**, 127-136.
- Haneda, M., Sugimoto, T., Kikkawa, R. (1999) Mitogen-activated protein kinase phosphatase: a negative regulator of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Eur. J. Pharmacol.* **365**, 1-7.
- Harrison, S., Page, C. P., Spina, D. (1999) Airway nerves and protein phosphatases. *Gen. Pharmacol.* **32**, 287-298.
- Haugh, J. M., Schneider, I. C., Lewis, J. M. (2004) On the cross regulation of protein tyrosine phosphatases and receptor tyrosine kinases in intracellular signaling. *J. Theor. Biol.* **230**, 119-132.
- He, X. Y., Sikes, R. A., Thomsen, S., Chun, L. W. K., Jacques, S. L. (1994) Photodynamic therapy with Photofrin II induces programmed cell death in carcinoma cell lines. *Photochem. Photobiol.* **59**, 468-473.
- Holmstrom, T. H., Schmitz, I., Soderstrom, T. S., Poukkula, M., Johnson, V. L, Chow, S. C., Krammer, P. H., Eriksson, J. E. (2000) MAPK/ERK signaling in activated T cells inhibits CD95/Fas-mediated apoptosis downstream of DISC assembly. *EMBO J.* **19**, 5418–5428.
- Holzer, W., Shirdel, J., Penzkofer, A., Hegemann., Deutzmann, R., Hochmuth, E. (2005) Photo-induced degradation of some flavins in aqueous solution. *Chem. Phys.* **308**, 69-78.
- Huang, H. F., Chen, Y. Z., Wu, Y. (2005) Mitochondria-dependent apoptosis induced by a novel amphipathic photochemotherapeutic agent ZnPcS2P2 in HL60 cells. *Acta Pharmacol. Sin.* **26**, 1138-1144.

- Huang, H. F., Chen, Y. Z., Wu, Y., Chen, P. (2006) Purging of murine erythroblastic leukemia by ZnPcS2P2-based-photodynamic therapy. *Bone Marrow Transplant.* **37**, 213-217.
- Hyer M. L., Voelkel-Johnson, C., Rubinchik, S., Dong, J., Norris, J. S. (2000) Intracellular Fas ligand expression causes Fas-mediated apoptosis in human prostate cancer cells resistant to monoclonal antibody-induced apoptosis. *Mol. Ther.* **2**, 348–358.
- Ishige, K., Schubert, D., Sagara, Y. (2001) Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Radic. Biol. Med.* **30**, 433–446.
- Israels, L. G., Israels, E. (1999) Apoptosis. *Stem.Cells* **17**, 306-313.
- Janssens, V., Goris, J., Van Hoof, C. (2005) PP2A: the expected tumor suppressor. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **15**, 34-41.
- Jeffrey, M., Scott, J. R., Williams, A., Fraser, H. (1992) Ultra-structural features of spongiform encephalopathy transmitted to mice from three species of bovidae. *Acta Neuropathol.* **84**, 559-569.
- Jin, Z., El-Deiry, W. S. (2005) Overview of Cell Death Signaling Pathways. *Cancer Cell Ther.* **4**, 139-163.
- Johnson, G. L., Dohlman, H. G., Graves, L. M. (2005) MAPK kinase kinases (MKKKs) as a target class for small-molecule inhibition to modulate signaling networks and gene expression. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **9**, 325–331.
- Johnson, G. L., Lapadat, R. (2002) Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK and p38 protein kinases. *Science* **298**, 1911-1912.
- Johnstone, R. W., Ruefli, A. A., Lowe, S. W. (2002) Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* **108**, 153-164.
- Joshi, P. C. (1985) Comparison of the DNA damaging property of photosensitized riboflavin via singlet oxygen and superoxide radical mechanisms. *Toxicol. Lett.* **26**, 211-2117.
- Jurgensmeier, J. M., Xie, Z., Deveraux, Q., Ellerby, L., Bredesen, D., Reed, J. C. (1998) Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 4997-5002.
- Kadowaki, H., Nishitoh, H., Ichijo, H. (2004) Survival and apoptosis signals in ER stress: the role of protein kinases. *J. Chem. Neuroanat.* **28**, 93–100.
- Kane, D.J., Ord, T., Anton, R., Bredesen, D. E. (1995) Expression of Bcl-2 inhibits necrotic neural cell death. *J. Neurosci. Res.* **40**, 269-275.
- Kappelmayer, J., Simon, A., Kiss, F., Hevessy, Z. (2004) Progress in defining multidrug resistance in leukemia. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* **4**, 209-217.

- Kaufmann, S. H., Hengartner, M. O. (2001) Programmed cell death: alive and well in the new millenium. *Trends Cell. Biol.* **12**, 526-534.
- Kawahara, A., Ohsawa, Y., Matsumura, H., Uchiyama, Y., Nagata, S. (1998) Caspase independent cell killing by Fas-associated protein with death domain. *J. Cell. Biol.* **143**, 1353-1360.
- Kessel, D., Vicente, M. G., Reiners, J. J. Jr. (2006) Initiation of apoptosis and autophagy by photodynamic therapy. *Lasers Surg. Med.* **38**, 482-488.
- Kester, M., Kolesnick, R. (2003) Sphingolipids as therapeutics. *Pharmacol. Res.* **47**, 365–371.
- Kikawa, K. D., Vidale, D. R., Van Etten, R. L., Kinch, M. S. (2002) Regulation of the EphA2 kinase by the low molecular weight tyrosine phosphatase induces transformation. *J. Biol. Chem.* **277**, 39274–39279.
- Kimpinski, K., Jelinski, S., Mearow, K. (1999) The anti-p75 antibody, MC192, and brain-derived neurotrophic factor inhibit nerve growth factor-dependent neurite growth from adult sensory neurons. *Neuroscience* **93**, 253-263.
- Klumpp, S., Krieglstein, J. (2002) Ser/Thr protein phosphatases in apoptosis. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2**, 4584-62.
- Koehn, F. E., Carter, G. T. (2005) The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **4**, 206-220.
- Köhler, C., Orrenius, S., Zhivotovsky, B. (2002) Evaluation of caspase activity in apoptotic cells. *J. Immunol. Meth.* **265**, 97-110.
- Kolch, W., Calder, M., Gilbert, D. (2005) When kinases meet mathematics: the systems biology of MAPK signalling. *FEBS Letters* **579**, 1891-1895.
- Kramer, R., Cohen, D., (2004) Functional genomics to new drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**, 965–972.
- Krebs, E. G., Graves, J. D. (2000) Interactions between protein kinases and proteases in cellular signaling and regulation. *Advan. Enzyme Regul.* **40**, 441-470.
- Kroemer, G., Zamzami, N., Susin, S. A.. (1997) Mitochondrial control of apoptosis. *Immun. Today* **18**, 45-45.
- La Rochette, A., Silva, E., Birlouez-Aragon, I., Mancini, M., Edwards, A. M., Morlière, P. (2000) Riboflavin photodegradation and photosensitizing effects are highly dependent on oxygen and ascorbate concentration. *Photochem. Photobiol.* **76**, 815-820.

- Lee, J. H., Koo, T. H., Hwang, B. T., Lee, J. J. (2002) Kaurane diterpene, kamebakaurin, inhibits NF-kappa B by directly targeting the DNA-binding activity of p50 and blocks the expression of antiapoptotic NF-kappa B targets. *J. Biol. Chem.* **277**, 18411-18420.
- Lee, W. R., Shen, S. H. Lin, H. Y., Hou, W. C., Yang, L. L., Chen, Y. C. (2002) Wogonin and fisetin induce apoptosis in human promyeloleukemic cells, accompanied by a decrease of reactive oxygen species, and activation of caspase 3 and Ca²⁺-dependent endonuclease. *Biochem. Pharmacol.* **63**, 225-236.
- Leist, M., Jaattela, M. (2001) Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2**, 589-598.
- Lin, B., Williams-Skipp, C., Tao, Y., Schleicher, M.S., Cano, L.L., Duke, R.C., Scheinman, R.I. (1999) NF-kB functions as both a proapoptotic and antiapoptotic regulatory factor within a single cell type. *Cell. Death Diff.* **6**, 570-582.
- Lin, K. I., Lee, S. H., Narayanan, R., Baraban, J. M., Hardwick, J. M., Ratan, R. R. (1995) Thiol agents and Bcl-2 identify an alphavirus-induced apoptotic pathway that requires activation of the transcription factor NF-kB. *J. Cell. Biol.* **131**, 1149-1161.
- Liston, P., Fong, W. G., Korneluk, R. G. (2003) The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl-2. *Oncogene* **22**, 8568-8580.
- Liu, J., Lin, A. (2005) Role of JNK activation in apoptosis: A double-edged sword. *Cell. Res.* **15**, 36-42.
- Los, M., Burek, C. J., Stroh, C., Bebedyk, K., Hug, H., Mackiewicz, A. (2003) Anticancer drugs of tomorrow: apoptotic pathways as target for drug design. *Drug Discov. T.* **8**, 67-77.
- Luo, Y., Chang, C. K., Kessel, D. (1996) Rapid initiation of apoptosis by photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* **63**, 528-534.
- Maher, P., Akaishi, T., Abe, K. (2006) Flavonoid fisetin promotes ERK-dependent long-term potentiation and enhances memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 16568-16573.
- Malentacchi, F., Marzocchini, R., Gelmini, S., Orlando, C., Serio, M., Ramponi, G., Raugei, G. (2005) Up-regulated expression of low molecular weight protein tyrosine phosphatases in different human cancers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **334**, 875-883.
- Massey, V. (2000) The chemical and Biological Versatility of Riboflavin. *Biochem. Soc. Trans.* **28**, 283-296.

- McCluskey A., Ackland, S. P., Bowyer, M. C., Baldwin, M. L., Garner, J., Walkom, C. C., Sakoff, J. A. (2003). Cantharidin analogues: synthesis and evaluation of growth inhibition in a panel of selected tumor cell lines. *Bioorg. Chem.* **31**, 68-79.
- McConkey, D. J. (1998) Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. *Toxicol. Lett.* **99**, 157-168.
- Meisel, D., Neta, P. (1975) One electron reduction potential of riboflavin studied by pulse radiolysis. *J. Phys. Chem.* **79**, 2459-2465.
- Mustelin, T., Alonso, A., Bottini, N., Huynh, H., Rahmouni, S., Nika, K., Louis-dit-Sully, C., Tautz, L., Togo, S. H., Bruckner, S., Mena-Duran, A.V., Al-Khoury, A. M. (2004) Protein tyrosine phosphatases in T cell physiology. *Mol. Immunol.* **41**, 687-700.
- Navarro, D., Luzardo, O. P., Fernandez, L., Chesa, N., Diaz-Chico, B. N. (2002) Transition to androgen-independence in prostate cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **81**, 191–201.
- Nebreda, A.R., Porras, A. (2000) p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 257-260.
- Nelson, W. G. (2004) Agents in development for prostate cancer prevention. *Expert. Opin. Investig. Drugs.* **13**, 1541-1554.
- Newman, D. J., Cragg, G. M., Snader, K.M., (2003) Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. *J. Nat. Prod.* **66**, 1022–1037.
- Ogretmen, B., Hannun, Y. A. (2001) Updates on functions of ceramide in chemotherapy-induced cell death and in multidrug resistance. *Drug. Resist. Updat.* **4**, 368–377.
- Olaharski, A. J., Mondrala, S. T., Eastmond, D. A. (2005). Chromosomal malsegregation and micronucleus induction in vitro by the DNA topoisomerase II inhibitor fisetin. *Mutat. Res.* **582**, 79-86.
- Oppenheim, R. W., Flavell, R. A., Vinsant, S., Pevette, D., Kuan, C. Y., Rakic, P. (2001) Programmed cell death of developing mammalian neurons after genetic deletion of caspases. *J. Neurosci.* **21**, 4752-4760.
- Orrenius, S., Zhivotovsky, B., Nicotera, P. (2003) Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **4**, 552-565.
- Ostman, A., Bohmer, F. D. (2001) Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatases. *Trends Cell. Biol.* **11**, 258-266.
- Park, H. H., Lee, M. S., Oh, J. M., Lee, M. S., Yoon, K. W., Park, B. H., Kim, J. W., Song, H., Kim, S. H. (2006) Anti-inflammatory activity of fisetin in human mast cells (HMC-1). *Pharmacol. Res.* (no prelo).

- Park, J. B. (1999) Flavonoids are potential inhibitors of glucose uptake in U937 cells. *Biochem. Biophys Res Commun.* **260**, 568-574.
- Pietta, P. G. (2000) Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* **63**, 1035–1042.
- Pils, B., Schultz, J. (2004) Evolution of the multifunctional protein tyrosine family. *Mol. Biol. Evol.* **21**, 625-631.
- Powers, J. H. (2003) Riboflavin (vitamin B2) and health. *Am. J. Nutr.* **77**, 1352-1360.
- Ricote Belinchon M., Bethencourt Codes F. R, Garcia-Tunon Llanio I., Fraile Laiz B., Fernandez Saez C., Aller Tresguerres P., Gonzalez-Garcia J., Vera San Martin R., Paniagua Gomez-Alvarez R., Royuela Garcia M. (2005) Anti-apoptotic potencial role of p38 in prostate cancer. *Actas Urol. Esp.* **29**, 769-76.
- Rivlin, R. S., Shils, M. E., Sherlock, P. (1983) Nutrition and cancer. *Am. J. Med.* **75**, 843-854.
- Roux, P. P., Blenis, J. (2004) ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol. Mol. Rev.* **68**, 320-344.
- Rusznayák, S. T., Szent-Györgyi, A. (1936) Vitamin P: flavonols as vitamins. *Nature* **138**, 27.
- Sagara, Y., Vahnnasy, J., Maher, P. (2004) Induction of PC12 cell differentiation by flavonoids is dependent upon extracellular signal-regulated kinase activation. *J. Neurochem.* **90**, 1144–1155.
- Schenk, P.W., Snaar-Jagalska, B. E. (1999) Signal perception and transduction: the role of protein kinases. *Biochim. Biophys. Acta* **1449**, 1-24.
- Schmitt, E., Sané, A. T., Bertrand, R. (1999) Activation and role of caspases in chemotherapy-induced apoptosis. *Drug. Resist. Updat.* **2**, 21-29.
- Schönthal, A. H. (2001) Role of serine/threonine protein phosphatase 2A in cancer. *Cancer Lett.* **170**, 1-13.
- Scorrano, L (2003) Divide et impera: Ca²⁺ signals, mitochondrial fission and sensitization to apoptosis. *Cell Death Differ.* **10**, 1-3.
- Sengupta, B., Banerjee, A., Sengupta, P. K. (2005) Interactions of the plant flavonoid fisetin with macromolecular targets: Insights from fluorescence spectroscopic studies. *J. Photochem. Photobiol. B.* **80**, 79–86
- Sharrocks, A. D., Yang, S. H., Galanis, A. (2000) Docking domains and substrate-specificity determination for MAP kinases. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 448-453.

- Silva, E., Fürst, S., Edwards, A. M., Becker, M. I., De Ioannes, A. E. (1995) Visible light anaerobic photoconversion of tyrosine sensitized by riboflavin. Cytotoxicity on mouse tumoral cells. *Photochem. Photobiol.* **62**, 1041-1045.
- Sol, V., Lamarche, F., Enache, M., Garcia, G., Granet, R., Guilloton, M., Blais, J. C., Krausz, P. (2006) Polyamine conjugates of meso-tritolylporphyrin and protoporphyrin IX: potential agents for photodynamic therapy of cancers. *Bioorg. Med. Chem.***14**, 1364-1377.
- Song, G., Ouyang, G., Bao, S. (2005) The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J. Cell. Mol. Med.* **9**, 59-71.
- Souza, A. C., Cavagis, A. D. M., Ferreira, C. V., Jucá, M. B., Aoyama, H., Peppelenbosch, M. P. (2005). Riboflavina uma vitamina multifuncional. *Química Nova* **28**, 887-891.
- Squier, M. K., Miller, A. C., Malkinson, A. M., Cohen, J. J. (1994) Calpain activation in apoptosis. *J. Cell. Physiol.* **159**, 229-237.
- Sumbayev V. V., Yasinska, I. M. (2005) Regulation of MAP kinase-dependent apoptotic pathway: implication of reactive oxygen and nitrogen species. *Arch. Biochem. Bioph.* **436**, 406-412.
- Suzuki, Y., Miura, T., Ogiso, T. (1982) Riboflavin photosensitized hemolysis of rat erythrocytes in the presence of serum. *Pharmacobiodynamics* **5**, 568-575.
- Tamura, S., Hanada, M., Ohnishi, M., Katsura, K., Sasaki, M., Kobayasu, K. (2002) Regulation of stress-activated protein kinase signaling pathways by protein phosphatases. *Eur. J. Biochem.* **269**, 1060-1066.
- Tamura, Y., Simizu, S., Osada, H. (2004) The phosphorylation status and anti-apoptotic activity of Bcl-2 are regulated by ERK and protein phosphatase 2A on the mitochondria. *FEBS Lett.* **569**, 249-255.
- Thurairaja, R., McFarlane, J., Traill, Z., Persad, R. (2004) State-of-the-art approaches to detecting early bone metastasis in prostate cancer. *BJU Int.* **94**, 268–271.
- Torres, M. (2003) Mitogen-activated protein kinase pathways in redox signaling. *Front. Biosci.* **8**, d369-391.
- Tran, S. E., Holmstrom, T. H., Ahonen, M., Kahari, V. M., Eriksson, J. E. (2001) MAPK/ERK overrides the apoptotic signaling from Fas, TNF, and TRAIL receptors. *J. Biol. Chem.* **276**, 16484–1690
- Troy, C. M., Rabacchi, A. S., Hohl, J. B.; Angelastro, J. M., Greene, L. A., Shelanski, M. L. (2001) Death in the balance; alternative participation of the caspase 2 and caspase 9 pathways in neuronal death induced by nerve growth factor deprivation. *J. Neurosci.* **21**, 5007-5016.

- Twomey, C., McCarthy, J. V. (2005) Pathways of apoptosis and importance in development. *J. Cell. Mol. Med.* **9**, 345-359.
- Tyson, J.J. (1999) Models of cell cycle control in eukaryotes. *J. Biotechnol.* **71**, 239-244.
- Uesugi, Y., Fuse, I., Toba, K., Kishi, K., Furukawa, T., Koike, T., Aizawa, Y. (1999) Involvement of SHP-1, a phosphotyrosine phosphatase, during myeloid cell differentiation in acute promyelocytic leukemia cell lines. *Eur. J. Haematol.* **62**, 239-245.
- Uzunoglu, S., Uslu, R., Tobu, M., Saydam, G., Terzioglu, E., Buyukkececi, F., Omay, S. B. (1999) Augmentation of methylprednisolone-induced differentiation of myeloid leukemia cells by serine/threonine phosphatase inhibitors. *Leuk. Res.* **23**, 507-512.
- van Acker, F. A., Schouten, O., Haenen, G. R., van der Vijgh, W. J., Bast, A. (2000) Flavonoids can replace alpha-tocopherol as an antioxidant. *FEBS Lett.* **473**, 45-148.
- Van Hoof, C., Goris J. (2003) Phosphatases in apoptosis: to be or not to be, PP2A is in the hearth of the question. *Biochim. Biophys. Acta* **1640**, 97-104.
- Wada, T., Penninger, J. M. (2004) Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene* **23**, 2838-2849.
- Wall, N. R., Mohammad, M., Al-Katib, A. M. (1999) Bax: Bcl-2 ratio modulation by bryostatin 1 and novel antitubulin agents is important for susceptibility to drug induced apoptosis in the human early pre-B acute lymphoblastic leukemia cell line, Reh. *Leuk. Res.* **23**, 881-888.
- Wang, H. G., Pathan, N., Ethell, I. M., Krajewski, S., Yamaguchi, Y., Shisbasaki, F., McKeon, F., Bobo, T., Franke, T. F., Reed, J. C. (1999) Ca²⁺ induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* **284**, 339-343.
- Wang, R.H, Liu, C.W.Y., Avramis, V.I., Berndt, N. (2001) Protein phosphatase 1alpha-mediated stimulation of apoptosis is associated with dephosphorylation of the retinoblastoma protein. *Oncogene* **20**, 6111-6122.
- Wang, S., El-Deiry, W. (2003) TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. *Oncogene* **22**, 8628-8633.
- Wu, F. Y., Sun, T. P. (1999) Vitamin K3 induces cell cycle arrest and cell death by inhibiting Cdc25 phosphatase. *Eur. J. Cancer.* **35**, 1388-1393.
- Wyllie, A. H., Kerr, A. R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* **68**, 251-306.
- Xu, C., Bailly-Maitre, B., Reed, J. C. (2005) Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J. Clin. Invest.* **115**, 2656-2664.

- Youle, R. J., Karbowski, M. (2005) Mitochondrial fission in apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 657-663.
- Yu, L.G., Packman, L. C., Weldon, M., Hamlett, J., Rhodes, J.M. (2004) Protein phosphatase 2A, a negative regulator of the ERK pathway, is activated by tyrosine phosphorylation of PHAPI/pp32 in response to the anti-proliferative lectin, jacalin. *J. Biol. Chem.* **40**, 41377-41383.
- Zaidi, S. I. A., Oleinick, N. L. (1993) Apoptosis during photodynamic therapy induced ablation of RIF-1 tumors in C3H mice. *Photochem. Photobiol.* **58**, 771-776.
- Zhang, Z. Y. (2001) Protein tyrosine phosphatases: prospects for therapeutics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**, 416-423.
- Zhang, Z. Y. (2003) Chemical and mechanistic approaches to the study of protein tyrosine phosphatases. *Acc. Chem. Res.* **36**, 385-392.
- Zhang, Z. Y., Zhou, B., Xie, L. (2002) Modulation of protein kinase signaling by protein phosphatases and inhibitors. *Pharmacol. Ther.* **93**, 307-317.
- Zong, W. X., Thompson, C. B. (2006) Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev.* **20**, 1-15.

11. ANEXOS

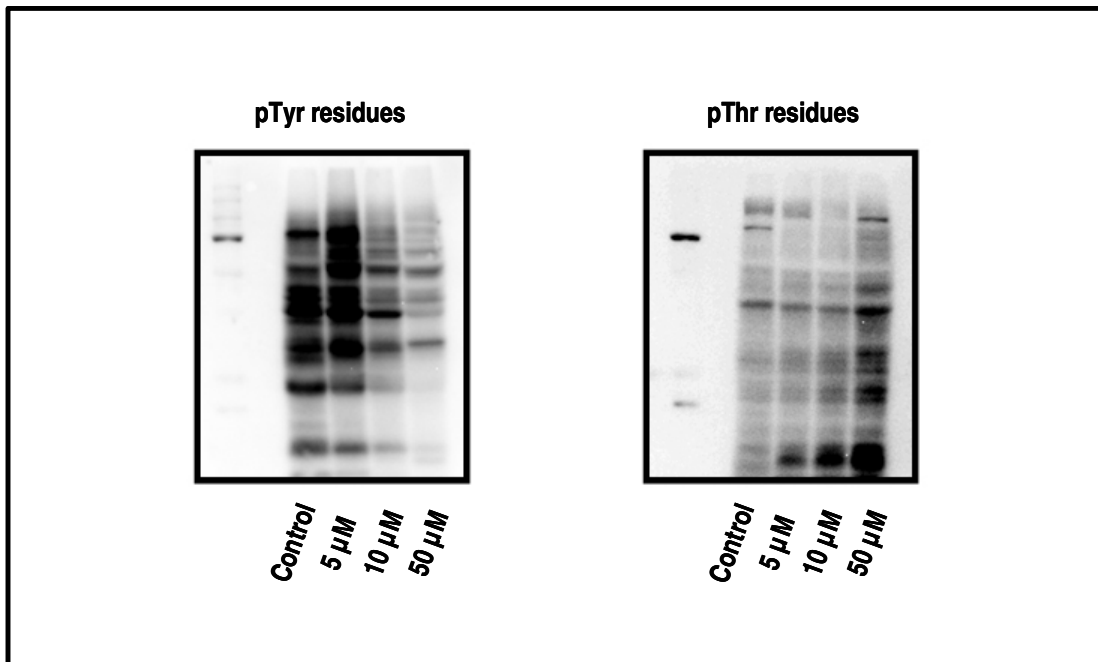


Figura 4. Efeitos dos fotoprodutos de riboflavina na atividade de proteínas quinases e fosfatases. Células HL60 foram tratadas por 24hs com riboflavina irradiada e os níveis de fosforilação em resíduos de tirosina e treonina foram determinados através de Western blotting. (controle: células não tratadas)