

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

DIOGO GOMES GARCIA

SINALIZAÇÃO DE MORTE CELULAR VIA Na^+ , K^+ -ATPase COMO ALVO DE DROGAS ANTICÂNCER: ESTUDOS COM O ÁLCOOL PERÍLICO

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Orientador: Prof. Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto

RIO DE JANEIRO
2013

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

G216 **Garcia, Diogo Gomes**

Sinalização de morte celular via Na^+ , K^+ -ATPase como alvo de drogas anticâncer: estudos com o álcool perílico / Diogo Gomes Garcia. – Rio de Janeiro, 2013

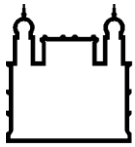
xiv, 86 f.: il.; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2013.

Bibliografia: f. 69-86

1. Na^+ . 2. K^+ -ATPase. 3. Álcool perílico. 4. JNK. 5. Glioblastoma. I. Título.

CDD 616.994



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

DIOGO GOMES GARCIA

SINALIZAÇÃO DE MORTE CELULAR VIA Na^+ , K^+ -ATPase COMO ALVO DE DROGAS ANTICÂNCER: ESTUDOS COM O ÁLCOOL PERÍLICO

ORIENTADOR: Prof. Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dr^a. Cecília Jacques Gonçalves de Almeida – FIOCRUZ (Presidente)

Prof. Dr^a. Janaina Fernandes – UFRJ (Membro 1)

Prof. Dr. Luiz Roberto Leão Ferreira – UFF (Membro 2)

Prof. Dr^a. Adriana Ribeiro Silva – FIOCRUZ (Revisora e Suplente)

Prof. Dr^a. Cláudia Vitória de Moura Gallo – UERJ (Suplente)

Rio de Janeiro, 21 de Novembro de 2013

*Dedico este trabalho às quatro mulheres que são
os pilares da minha vida pessoal e profissional:*

*Minha esposa Danielle Garcia,
minha mãe Vanda Gomes,
minha irmã Fernanda Garcia
e minha amiga Patricia Burth.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Hugo Castro Faria Neto, pela orientação e por ter confiado e me ajudado a tornar realidade o sonho inicial.

À amiga e eterna orientadora Dra. Patrícia Burth, pela orientação, amizade e exemplo de profissionalismo, que contribuíram não só na minha vida acadêmica, mas também na minha formação como pessoa.

À amiga Dra. Lidia Amorim, pela amizade, pela doação de parte das células utilizadas neste trabalho, auxílio com a técnica de citometria de fluxo e constante apoio na minha vida acadêmica.

Ao amigo Dr. Mauro de Castro Faria, pelas diversas formas de ajuda financeira, análise estatística e pela presença constante e indispensável na realização deste trabalho.

Ao amigo Dr. Cassiano Gonçalves, pela constante ajuda, idéias e infinitas colaborações.

Ao Dr. Ricardo Santelli e sua aluna Aline Soares, pela colaboração com a quantificação do Rb⁺.

À Dra. Flávia Gomes e seu aluno Luan Diniz, pela doação das células de astrócitos de camundongo utilizadas neste trabalho.

À Dra. Elizabeth Araújo, pela ajuda inicial com a técnica de *western blot*, pela doação do inibidor da JNK utilizado neste trabalho e por “exalar” tranquilidade.

Às Dras. Thereza Quirico e Jussara Lagrotta, pelo uso das centrífugas de placas.

À Monique Trugilho e a Plataforma Proteômica (Laboratório de Toxicologia PDTIS/Fiocruz) pela análise das bandas obtidas por *western blot*.

A todos os professores e a secretária Daniele Lobato do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – IOC/FIOCRUZ.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de pós-graduação.

À Dra. Adriana Silva, pelo apoio com a técnica de *western blot* e revisão deste trabalho.

Aos Drs. membros da banca examinadora, por terem aceitado o convite para a avaliação do presente trabalho.

A todos os amigos do Laboratório de Imunofarmacologia (FIOCRUZ), em especial, à Rose Branco, pela colaboração e amizade.

Aos meus amigos do Laboratório de Sinalização e Enzimologia (UFF) Camila Ignácio e Kauê Souza, pela amizade, incentivo e ajuda com os experimentos.

Aos amigos do Laboratório de Oncologia Molecular (UFF) Elaine Castro, Jéssica Castro, Maximino Alencar e Daniel Nascimento, pela parceria e amizade.

À Danielle Garcia, minha esposa, sempre amiga e eterna namorada, pelo respeito, compreensão e amor.

Aos meus amigos e familiares, que estão sempre presentes em minha vida e orgulham-se de mim.

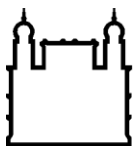
Aos meus pais: Vanda e Antônio Carlos, pelo amor, educação, dedicação e amizade proporcionada a mim.

Aos meus irmãos e amigos: Fernanda Garcia e Antônio Garcia, pelo companheirismo, amizade e amor incondicional.

A Deus, pela vida e por ter posto estas pessoas maravilhosas em meu caminho.

“... Cada um de nós compõe a sua história e cada ser em si carrega o dom de ser capaz de ser feliz”.

(Almir Sater e Renato Teixeira).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

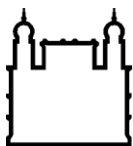
SINALIZAÇÃO DE MORTE CELULAR VIA Na^+ , K^+ -ATPase COMO ALVO DE DROGAS ANTICÂNCER: ESTUDOS COM O ÁLCOOL PERÍLICO

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

DIOGO GOMES GARCIA

A Na^+ , K^+ ATPase (NKA) atua na manutenção do potencial de membrana das células e em mecanismos de transdução de sinal. Alterações na atividade da NKA são importantes em muitos processos biológicos e patológicos. A NKA pode ser inibida pelo álcool perílico (POH), um monoterpene utilizado no tratamento de tumores, incluindo cerebrais. Neste trabalho, determinamos que o POH também atua sobre cascatas de sinalização, moduladas via NKA, que controlam a proliferação e/ou morte celular. Foi avaliado o efeito do POH e do PA seu principal metabólito, sobre a atividade da NKA em duas linhagens de células de glioblastoma (GBM) humano (U87 e U251), células não tumorais de astrócitos de camundongo e da linhagem (VERO). Nossos resultados, baseados na avaliação da atividade da NKA por incorporação do Rb^+ , o qual mimetiza o K^+ , mostraram uma sensibilidade à inibição pelo POH semelhante entre os quatro tipos de células (IC_{50} U87 2 mM; U251 1,8 mM; VERO 2,4 mM e astrócitos de camundongo 1,4 mM), enquanto o PA não apresentou efeito. Sabe-se que nos GBMs existe uma superexpressão da subunidade α_1 da NKA, situada na estrutura das cavéolas que é provavelmente responsável pelo papel sinalizador atribuído a essa enzima, especialmente em relação aos mecanismos apoptóticos. Comparamos a viabilidade celular, determinando a atividade da enzima lactato desidrogenase presente no sobrenadante das células tratadas por 24 h com POH e PA. O PA não alcançou efeito citotóxico igual ou superior a 30% nas células mesmo na concentração elevada de 4 mM. Já o POH reduziu, de maneira dependente da concentração, a viabilidade das células (IC_{50} U87 1,1 mM; U251 1,4 mM; VERO 0,9 mM e astrócitos de camundongo 1,4 mM). Na análise por western blot, 1,5 mM de POH ativou a proteína c-Jun N-terminal quinase (JNK), nas células U87, U251 e nos astrócitos de camundongo (incubação de 30 min). O uso do inibidor Src quinase (dasatinibe) e a depleção colesterol da membrana celular com metil β -ciclodextrina reduziram a ativação da JNK1/2 induzida pelo POH nas células U87, indicando a possível participação do complexo NKA-Src (presente nas cavéolas), nesta via de sinalização. POH (1,5 mM) aumentou a liberação da interleucina IL-8, detectada por ELISA, no sobrenadante das células U251 (24 h incubação), indicando possível estratégia destas células para evitar o efeito citotóxico do POH. Resultados obtidos com citometria de fluxo mostram que a inibição da JNK1/2 (pelo inibidor JNK V) reduz a apoptose ocasionada pelo POH nas células de GBM, indicando o envolvimento desta proteína na morte celular programada. Os resultados obtidos mostram que o mecanismo de sinalização celular mediado pela NKA pode ter um importante papel no mecanismo de ação antitumoral do POH em células de GBM.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

SIGNALING OF CELL DEATH VIA Na⁺, K⁺-ATPase AS A TARGET OF ANTICANCER DRUGS: STUDIES WITH PERILLYL ALCOHOL

ABSTRACT

PhD THESIS

DIOGO GOMES GARCIA

The Na⁺, K⁺ ATPase (NKA) acts in keeping the cell membrane potential and in signal transduction mechanisms. Modifications in the activity of this enzyme are important in physiological and pathological processes. The NKA is inhibited by perillyl alcohol (POH), a monoterpene used in the treatment of tumors, including brain tumors. In this work, we also show that POH acts in signaling cascades associated to NKA, controlling cell proliferation and/or cellular death. We evaluated the effect of POH and of its main metabolite (perillic acid - PA) on the NKA activity in cultured glioblastoma cells (GBM) U87 and U251 and on non-tumor cells (mouse astrocytes and VERO cells). NAK activity was measured by non-radioactive Rb⁺ incorporation by cells (Rb⁺ is a K⁺ substitute). Our results showed a similar sensitivity for the four cells types tested (IC₅₀ U87 – 2 mM; U251 - 1,8 mM; VERO - 2,4 mM and mouse astrocytes - 1,4 mM). Perillic acid did not show any effect in any cell type. In GBMs, it is known that NKA α₁ subunit is super expressed. This isoform is embedded in caveolar structures and is probably responsible by the signaling properties of this enzyme in apoptosis mechanisms. Cell viability was measured by lactate dehydrogenase in cell supernatants of POH treated cells. The maximum PA cytotoxic effect obtained was 30% even at 4 mM. However, POH reduced dose dependently cell viability, (IC₅₀ U87 - 1,1 mM; U251 - 1,4 mM; VERO - 0,9 mM and mouse astrocyte - 1,4 mM). Considering the western blot analysis, 1,5 mM POH activated the c-Jun N-terminal Kinase (JNK), on U87, U251 and in mouse astrocytes after 30min incubation. Dasatinib (an inhibitor of Src Kinase) and methyl β-ciclodextrin (which promotes cholesterol depletion in cell membranes) reduced JNK1/2 activation induced by POH in U87 cells, indicating the participation of NKA-Src complex seen in caveolar structure in this mechanism. 1,5mM POH after 24h incubation increase interleukin IL-8 in U251 cell supernatant, and this may indicate a possible strategy to avoid the cytotoxic effect of POH. Results obtained by flux cytometry showed that the inhibition of JNK1/2 (by the inhibitor JNK V) reduced apoptosis consequent to POH administration in GBM cells, indicating the involvement of this protein in programmed cellular death. Our results seem to indicate that a signaling mechanism mediated by NKA may have an important role in anti-tumoral action of POH in GBM cells.

ÍNDICE

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	xi
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xiii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Na ⁺ , K ⁺ -ATPase	1
1.1.1 Definição e aspectos funcionais e estruturais	1
1.1.2 Isoformas da Na ⁺ , K ⁺ -ATPase	6
1.1.3 Regulação da Na ⁺ , K ⁺ -ATPase	7
1.2 Na ⁺ , K ⁺ -ATPase como um transdutor de sinal	10
1.3 Na ⁺ , K ⁺ -ATPase, MAPKs e Interleucinas	13
1.4 Glicosídeos cardíacos e a Na ⁺ , K ⁺ -ATPase	14
1.5 Na ⁺ , K ⁺ -ATPase e o câncer	17
1.6 Glicosídeos cardíacos e o câncer	19
1.7 Apoptose induzida por inibidores da Na ⁺ , K ⁺ -ATPase	20
1.8 Compostos anticâncer inibidores da Na ⁺ , K ⁺ -ATPase	22
1.9 Glioblastoma multiforme	24
1.10 Álcool perílico	26
1.11 Álcool perílico e Na ⁺ , K ⁺ -ATPase	29
2 OBJETIVOS	30
2.1 Objetivo geral	30
2.2 Objetivos específicos	30
3 MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 Cultivo e manutenção das células	31
3.2 Captação de Rb ⁺	32
3.3 Viabilidade celular	33
3.4 Detecção da proteína JNK	34
3.5 Tratamento com dasatinibe e metil β-ciclodextrina	35
3.6 Dosagem de citocinas	36
3.7 Tratamento com inibidor de JNK V e detecção de apoptose	36
3.8 Análise estatística	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38

4.1	Efeito do POH e do PA na atividade da Na ⁺ , K ⁺ -ATPase	38
4.2	Efeito citotóxico do POH, do PA e da OUA em 30 minutos	42
4.3	Efeito citotóxico do POH e do PA em 24 horas	46
4.4	Efeito do POH na ativação da proteína JNK	49
4.5	Efeito da metil β-ciclodextrina e do dasatinibe na ativação da proteína JNK pelo POH	55
4.6	Efeito do POH na liberação de citocinas	57
4.7	Efeito da inibição da JNK na indução de apoptose pelo POH	59
5	CONCLUSÃO	67
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1: Esquema da inserção da Na ⁺ , K ⁺ -ATPase na membrana plasmática.	3
Figura 1.2: Etapas do ciclo de atividade da Na ⁺ , K ⁺ -ATPase.	5
Figura 1.3: Esquema da regulação da Na ⁺ , K ⁺ -ATPase.	9
Figura 1.4: Esquema da formação do sinalossoma.	1
	2
Figura 1.5: Características estruturais dos glicosídeos cardíacos.	1
	5
Figura 1.6: Estrutura química dos monoterpenos: limoneno, POH e PA.	2
	7
Figura 4.1: Efeito do POH sobre a atividade da Na ⁺ , K ⁺ -ATPase presente nas células das linhagens (A) U251, (B) U87, (C) VERO e (D) astrócitos de camundongo.	4
	0
Figura 4.2: Efeito do PA sobre a captação de Rb ⁺ pelas células das linhagens (A) U251, (B) U87, (C) VERO e (D) astrócitos de camundongo.	4
	1
Figura 4.3: Efeito do POH sobre a viabilidade das células das linhagens (A) U251, (B) U87, (C) VERO e (D) dos astrócitos de camundongo.	4
	3
Figura 4.4: Efeito da ouabaína sobre a viabilidade das células das linhagens (A) U251, (B) U87, (C) VERO e (D) dos astrócitos de camundongo.	4
	4
Figura 4.5: Efeito do PA sobre a viabilidade das células das linhagens (A) U251, (B) U87, (C) VERO e (D) dos astrócitos de camundongo.	4
	5
Figura 4.6: Efeito do POH sobre a viabilidade das células das linhagens (A) U251, (B) U87, (C) VERO e (D) dos astrócitos de camundongo.	4
	7
Figura 4.7: Efeito do PA sobre a viabilidade das células das linhagens (A) U251, (B) U87, (C) VERO e (D) dos astrócitos de camundongo.	4
	8
Figura 4.8: Efeito do POH sobre a ativação da proteína JNK1/2 em células U87.	5
	1
Figura 4.9: Efeito do POH sobre a ativação da proteína JNK1/2 em	5

células U251.	2
Figura 4.10: Efeito do POH sobre a ativação da proteína JNK1/2 em células de astrócitos de camundongos.	5 3
Figura 4.11: Efeito do POH sobre a ativação da proteína JNK1/2 em células VERO.	5 4
Figura 4.12: Efeito do dasatinibe e da metil β -ciclodextrina na ativação da proteína JNK pelo POH em células U87.	5 6
Figura 4.13: Efeito do POH na liberação de IL-8 em células U251.	5 8
Figura 4.14: Efeito da inibição da JNK na indução de apoptose pelo POH em células U87.	6 1
Figura 4.15: Efeito da inibição da JNK na indução de apoptose pelo POH em células U87.	6 2
Figura 4.16: Efeito da inibição da JNK na indução de apoptose pelo POH em células U251.	6 3
Figura 4.17: Efeito da inibição da JNK na indução de apoptose pelo POH em células U251.	6 4
Tabela 1.1: Distribuição das isoformas da Na ⁺ , K ⁺ -ATPase nos tecidos humanos.	7
Tabela 1.2: Classificação dos tumores astrocíticos.	2 4

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Akt – Proteína quinase B

Ap-1 – Proteína ativadora -1

ATP – Adenosina trifosfato

Bax – Proteína x associada a Bcl-2

Bcl-2 – Proteína das células B de linfoma

c-Jun – Proteína codificada pelo gene JUN

DMEM / DMEM-F12 – Do inglês “Dubeccos’s modified eagle medium” - com mistura de nutrientes F12

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucléico

E1 / E2 – Estados conformacionais da Na⁺, K⁺-ATPase

EC – Do inglês “Enzyme commission”

EDTA – Ácido etileno diamino tetra acético

EGF – Fator de crescimento epidérmico

EGFR – Receptor do fator de crescimento epidérmico

ELISA – Do inglês “Enzyme-linked immunosorbent assay”

ERK – Quinase regulada por sinais extracelulares

Fas – Receptor Fas (CD95)

FasL – Ligante do receptor Fas

GBM – Glioblastoma Multiforme

GTPases – Família de enzimas que hidrolisam guanosina trifosfato

HEPES – N-(2-hidroxietil) piperazina – N’-(2-ácido etano sulfônico)

IL – Interleucinas

JNK – c-Jun N-terminal quinase

JNK V – Inibidor da JNK1/2 (1,3-Benzotiazol-2-il-(2-((2-(3-piridinil)etil)amino)-4-pirimidinil)acetonitrila)

LDH – Lactato desidrogenase

LPS – Lipopolissacarídeo

MAPK – Proteína quinase ativada por mitógeno

Na⁺, K⁺-ATPase – Adenosina Trifosfatase ativada por Sódio, Potássio e Magnésio

NFκB – Fator nuclear kappa B

NKA – Na⁺, K⁺-ATPase

OMS – Organização Mundial da Saúde

OUA – Ouabaína

p38 – Proteína p38

PA – Ácido perílico

PBS – Solução salina tamponada com fosfato

PI3K – Fosfatidilinositol 3 quinase

p-JNK – JNK fosforilada

PKA / PKC / PKG – Proteínas quinases A, C e G, respectivamente

POH – Álcool perílico

Ras – Proteína Ras

ROS – Espécies reativas de oxigênio

SDS – Duodecilsulfato de sódio

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

Src – Proteína Src (Sarcoma da retina de galinha)

TBS / TBS/T – Solução salina tamponada com tris – com adição de tween20

TNF-α – Fator de necrose tumoral alfa

TNFR – Receptor do fator de necrose tumoral

TRAIL – Ligante inductor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral

V-FITC – Proteína anexina v conjugada a fluoresceína de isotiocianato

1 INTRODUÇÃO

1.1 Na⁺, K⁺-ATPase

1.1.1 Definição e aspectos funcionais e estruturais

A adenosina trifosfatase ativada por sódio, potássio e magnésio (Na⁺, K⁺-ATPase; bomba de sódio; EC 3.6.1.3) foi descoberta em nervos de patas de caranguejos por Jens Skou em 1957, que recebeu o Prêmio Nobel em Química por seu trabalho quarenta anos depois. Trata-se de um complexo proteico associado à membrana plasmática encontrado em células animais, que atua acoplando a energia estocada na molécula de ATP ao transporte de íons Na⁺ e K⁺ através da membrana celular. Para cada três íons Na⁺ bombeados para fora da célula, dois íons K⁺ são bombeados para dentro. Este transporte produz um gradiente químico e elétrico através da membrana celular, o qual é essencial para manter o potencial de membrana das células e para a atividade excitável do músculo e células nervosas (Skou, 1957; 1965; 2004).

O gradiente de Na⁺ é utilizado para direcionar numerosos processos de transporte, incluindo a translocação de glicose, aminoácidos e outros nutrientes para as células, além da manutenção da estabilidade osmótica (Albers, 1967; Preiss e Banaschak, 1979). Além da sua função na homeostasia iônica, a Na⁺, K⁺ ATPase também apresenta um papel na sinalização celular (Jaitovich e Bertorello, 2006) e em eventos relacionados à apoptose, como alterações no nível de K⁺ intracelular. Diversas doenças, que se apresentam com alteração na atividade e/ou expressão da Na⁺, K⁺-ATPase, provocando mudanças na função enzimática, poderiam disparar a morte celular programada (Yu, 2003; Panayiotidis *et al.*, 2006). A função de sinalização da Na⁺, K⁺ ATPase também pode desempenhar um papel importante para a função cardiovascular e no controle da pressão sanguínea (Aperia, 2007).

A macromolécula enzimática funcional é composta de subunidades α (112-kDa) e β (55-kDa), interagindo não covalentemente (Jørgensen, 1982). A subunidade γ , um membro da família das proteínas de membrana denominadas FXYP (10-kDa), foi identificada inicialmente em células do túbulo renal (Therien *et*

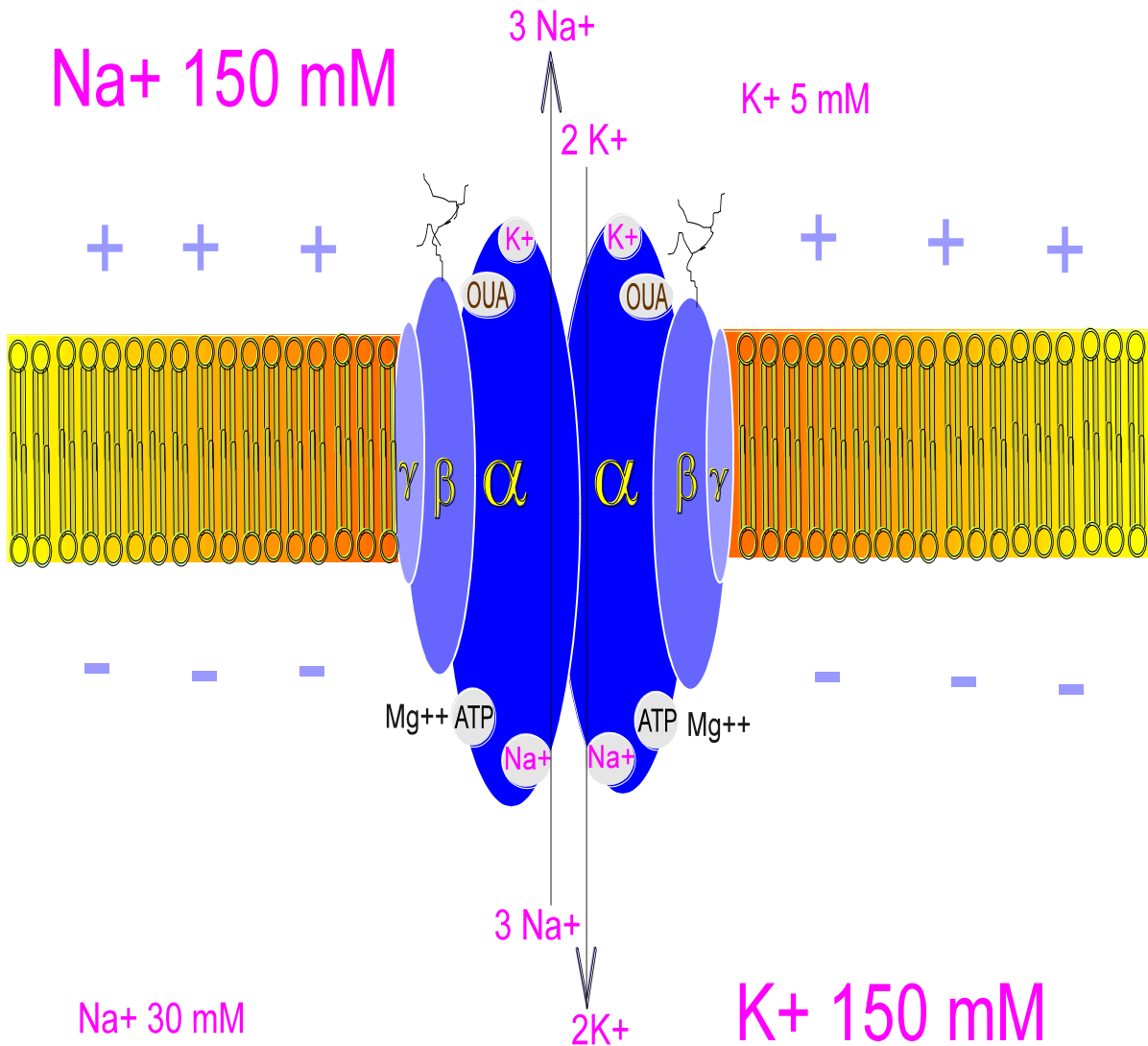
al., 2001). A Figura 1.1 mostra um modelo do complexo enzimático inserido na membrana plasmática.

A subunidade α , que tem sido elucidada a partir de vários estudos de cristalografia (Shinoda *et al.* 2009; Toyoshima *et al.* 2011), é a subunidade catalítica da enzima. Apresenta dez domínios hidrofóbicos transmembranares, contendo todos os sítios de ligantes que estimulam ou inibem a atividade enzimática. Os ligantes necessários para a fosforilação da enzima interagem nos sítios da subunidade α , localizados na superfície citoplasmática da membrana, enquanto que os íons K^+ necessários para a hidrólise enzimática e os inibidores clássicos desta enzima (glicosídeos cardíacos) ligam-se à superfície extracelular (Mobasheri *et al.*, 2000; Shinoda *et al.* 2009).

A subunidade β tem um simples domínio hidrofóbico transmembranar e sua superfície extracelular é altamente glicosilada. A função desta subunidade é de orientar e estabilizar a subunidade α na membrana, além de regular a afinidade desta pelo íon K^+ e pelos glicosídeos cardíacos. A presença da subunidade β é essencial para o funcionamento enzimático (Abriel *et al.*, 1999; Shinoda *et al.* 2009).

Quanto à isoforma γ , a última a ser descoberta, é um proteolipídio presente principalmente em células renais. Atua como reguladora da subunidade α , modulando a afinidade da enzima por diferentes ligantes (Béguin *et al.*, 1997; Therien *et al.*, 2001; Shinoda *et al.* 2009) e causando um efeito direto e positivo sobre a velocidade máxima da hidrólise de ATP (Cortes *et al.*, 2006).

ESPAÇO EXTRACELULAR



CITOPLASMA

Figura 1.1: Esquema da inserção da Na⁺, K⁺-ATPase na membrana plasmática. São apresentadas as subunidades α (com seus sítios para Na⁺, K⁺, ATP e glicosídeos cardíacos – (OUA) ouabaína), as subunidades β (glicoproteínas) e as subunidades γ. Está também indicado o transporte de 3 Na⁺ e 2 K⁺ por ATP hidrolisado, bem como as concentrações fisiológicas destes íons dentro e fora da célula (Burth, 1997).

A Na^+ , K^+ -ATPase é um membro da classe das ATPases do tipo P. Estas têm ciclos catalíticos semelhantes, envolvendo a participação intermediária da enzima sob a forma fosforilada. Na fosforilação, a molécula proteica sofre uma transição conformacional de hélice α para folha β (Jørgensen, 1986; Kühlbrandt, 2004). A transição conformacional resulta em fosforilação da enzima por ATP em presença de Mg^{2+} e íons Na^+ e a desfosforilação em presença de íons K^+ (Mobasher *et al.*, 2000; Kaplan, 2002). Um modelo deste ciclo reacional está mostrado na Figura 1.2. Três íons Na^+ ligam-se à enzima (estado E_1) no lado citoplasmático e a enzima é fosforilada pelo ATP. Uma mudança conformacional ocorre (estado E_2) e os sítios de ligação ao sódio são expostos para a superfície extracelular. Os três íons Na^+ são liberados e os dois íons K^+ , extracelulares, ligam-se à enzima. A desfosforilação com nova ligação de ATP ocorre acompanhada por mudança conformacional (retorno ao estado E_1), permitindo que os íons K^+ sejam liberados no citoplasma (Mobasher *et al.*, 2000; Kaplan, 2002; Kühlbrandt, 2004, Toyoshima *et al.* 2011).

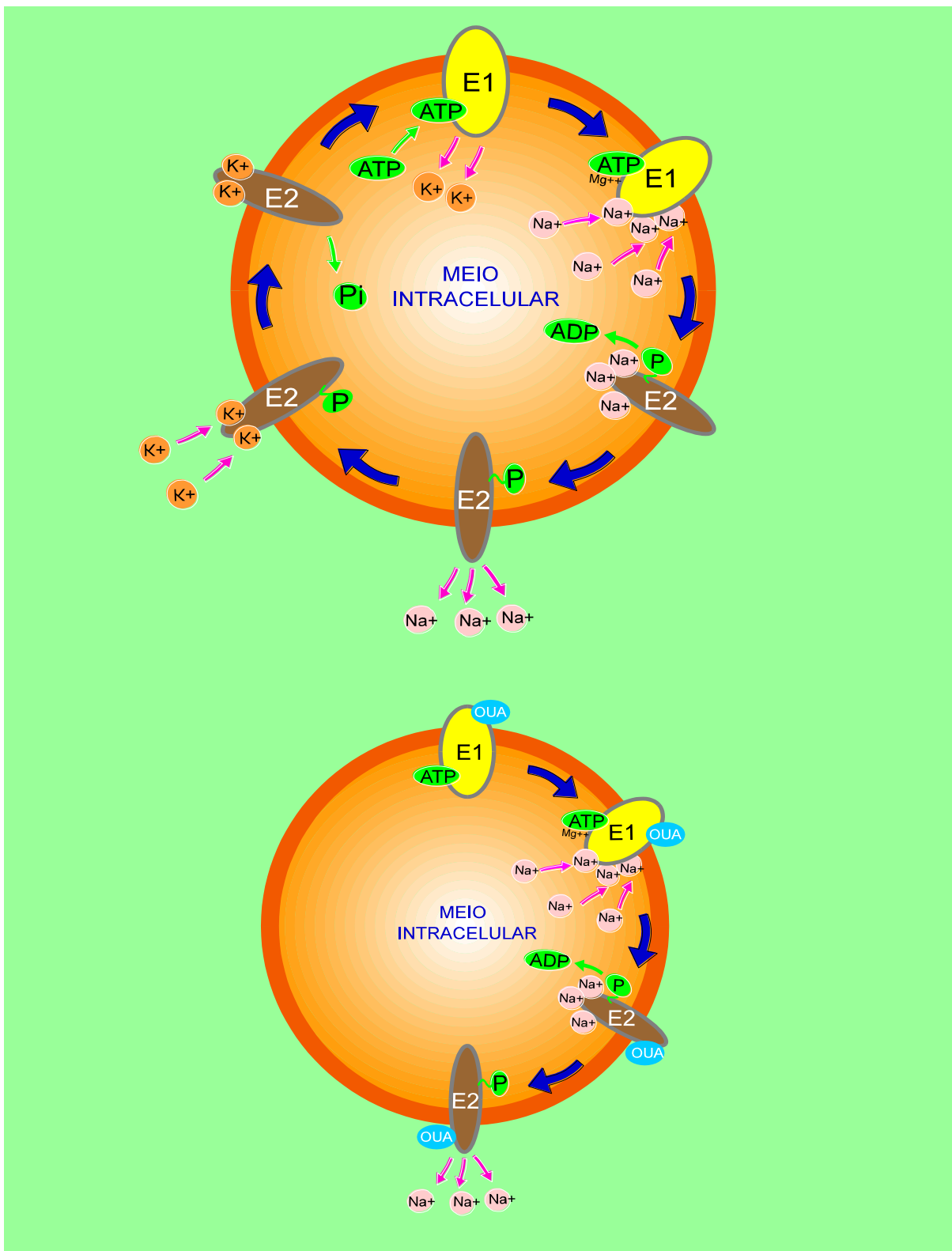


Figura 1.2: Etapas do ciclo de atividade da Na⁺, K⁺-ATPase. Na figura superior são mostradas as duas conformações (E₁ e E₂) e suas interações com Na⁺, ATP, Mg²⁺ e K⁺. Abaixo, é indicado o mecanismo de ação de glicosídeos cardíacos (OUA) - ouabaina, que paralisam a reação enzimática na etapa E₂ – fosforilada (Burth, 1997).

1.1.2 Isoformas da Na⁺, K⁺-ATPase

A Na⁺, K⁺-ATPase existe como múltiplas isoenzimas, que aparecem em todo o corpo de maneira tecido-específica, resultantes das combinações de diferentes isoformas das subunidades α e β . Nos seres humanos existem diferentes isoformas para ambas as subunidades: α (α_1 , α_2 , α_3 e α_4) e β (β_1 , β_2 e β_3) (Blanco *et al.*, 1998). A combinação mais comum é α_1 , α_2 , α_3 ou α_4 com β_1 (Blanco, 2005; Toyoshima *et al.* 2011).

As quatro isoformas α são expressas de maneira distinta em diferentes tecidos ao longo do desenvolvimento do organismo. A isoforma α_1 ocorre na maioria dos tecidos, enquanto que a α_2 predomina no músculo esquelético e também foi detectada (em menor quantidade) no cérebro e coração. A isoforma α_3 está limitada essencialmente ao tecido nervoso e ao coração e a α_4 é encontrada principalmente nos testículos e espermatozóides. Estas isoformas têm diferentes propriedades funcionais com respeito à afinidade por ligantes como Na⁺ e ouabaína, embora a função essencial de transporte de íons seja a mesma (Blanco e Mercer, 1998, Blanco *et al.*, 2000, Mobasher *et al.*, 2000; Kaplan, 2002; Wang e O'Doherty, 2012). O tecido renal parece expressar unicamente a isoforma α_1 , embora Barlet-Bas *et al.* (1993) tenham detectado a presença, também, da isoforma α_3 em segmentos de túbulos renais isolados.

Nos seres humanos, as isoformas α_1 , α_2 e α_3 compartilham um elevado grau de semelhança (aproximadamente 87%), enquanto que a α_4 é bastante distinta, apresentando uma homologia de apenas 63% em relação à isoforma α_1 (Blanco, 2005). Entre as espécies, as isoformas são, pelo menos, 85% idênticas (Reinhard *et al.*, 2013).

As isoformas β_1 e β_2 são as predominantes nas células de mamíferos, sendo a β_1 expressa ubiquamente, enquanto que a β_2 aparece principalmente no tecido nervoso. A isoforma β_3 foi identificada no músculo esquelético, pulmão e principalmente no tecido nervoso (Appel *et al.*, 1996).

Até o momento, sete membros da família de proteínas FXYD (subunidade γ) foram descritos (FXYD1-7) (Toyoshima *et al.* 2011). Este grupo de proteínas pode ser encontrado associado à bomba de Na⁺ e K⁺ principalmente no coração, fígado e

músculo esquelético (FXYP1), túbulos renais (FXYP2 e FXYP4), útero, pele e estômago (FXYP3), tecidos cancerosos (FXYP5), diversos tecidos normais (FXYP6) e cérebro (FXYP7) (Mijatovic *et al.*, 2007a). Os dados acima estão resumidos na tabela 1.1.

Tabela 1.1: Distribuição das isoformas da Na⁺, K⁺-ATPase nos tecidos humanos.

Isoformas	Tecidos
α_1	Todos
α_2	Músculo esquelético, cérebro e coração
α_3	Tecido nervoso e coração
α_4	Testículos e espermatozóides
β_1	Todos
β_2	Cérebro
β_3	Principalmente no tecido nervoso
FXYP1	Coração, fígado e músculo esquelético
FXYP2 e 4	Túbulos renais
FXYP3	Útero, pele e estômago
FXYP5	Tecidos cancerosos
FXYP6	Diversos tecidos normais
FXYP7	Cérebro

1.1.3 Regulação da Na⁺, K⁺-ATPase

A ampla distribuição da Na⁺, K⁺-ATPase e o seu envolvimento em importantes funções fisiológicas sugerem que alterações na atividade enzimática, quer seja por fatores endógenos, quer por ação de xenobióticos, possa ter importante papel em muitos processos biológicos e patológicos, tais como: a modulação da contratilidade cardíaca ou a liberação de neurotransmissores (MacGregor e Walker, 1993; Buckalew, 2005). A modificação da atividade enzimática pode ocorrer em resposta a mudanças na regulação da velocidade de expressão de isoformas e/ou modulação por inibidores ou ativadores (Kaplan, 2002).

A Na^+ , K^+ -ATPase pode ser regulada por diferentes mecanismos (ver Figura 1.3), incluindo a fosforilação direta da enzima por quinases, tais como PKA, PKG ou PKC em vários resíduos de serina na sequência proteica; o aumento da concentração intracelular de sódio ou extracelular de potássio modificando a atividade da bomba; associação direta ou indireta com elementos do citoesqueleto, tais como ancorina e actina, que direcionam a enzima para o compartimento apropriado da membrana; o nível de ATP, especificamente uma redução intracelular, que pode reduzir a atividade da bomba; e inibidores endógenos circulantes, tais como ouabaína, hormônios corticosteróides e peptídeos. Hormônios e fatores de crescimento atuam indiretamente sobre a enzima ou por indução da expressão gênica (aldosterona, corticosterona, cortisol, hormônio tireoidiano) ou por indução de modificações pós-tradução de enzimas a partir de um pool pré-existente (insulina, glucagon, EGF, vasopressina, catecolaminas). A ação deste último grupo de hormônios e fatores de crescimento é mediada por receptores na membrana plasmática e segundos mensageiros. Estes também podem atuar regulando o número de enzimas ancoradas na membrana, regulando a inserção (exocitose) ou captação (endocitose) da Na^+ , K^+ ATPase. Este tipo de regulação é o protótipo da adaptação rápida às mudanças ambientais (Rossier *et al.*, 1987).

A regulação hormonal pode, em curto prazo, afetar diretamente o comportamento cinético da enzima ou, em longo prazo, alterar a síntese ou a degradação da enzima (Panayiotidis *et al.*, 2006).

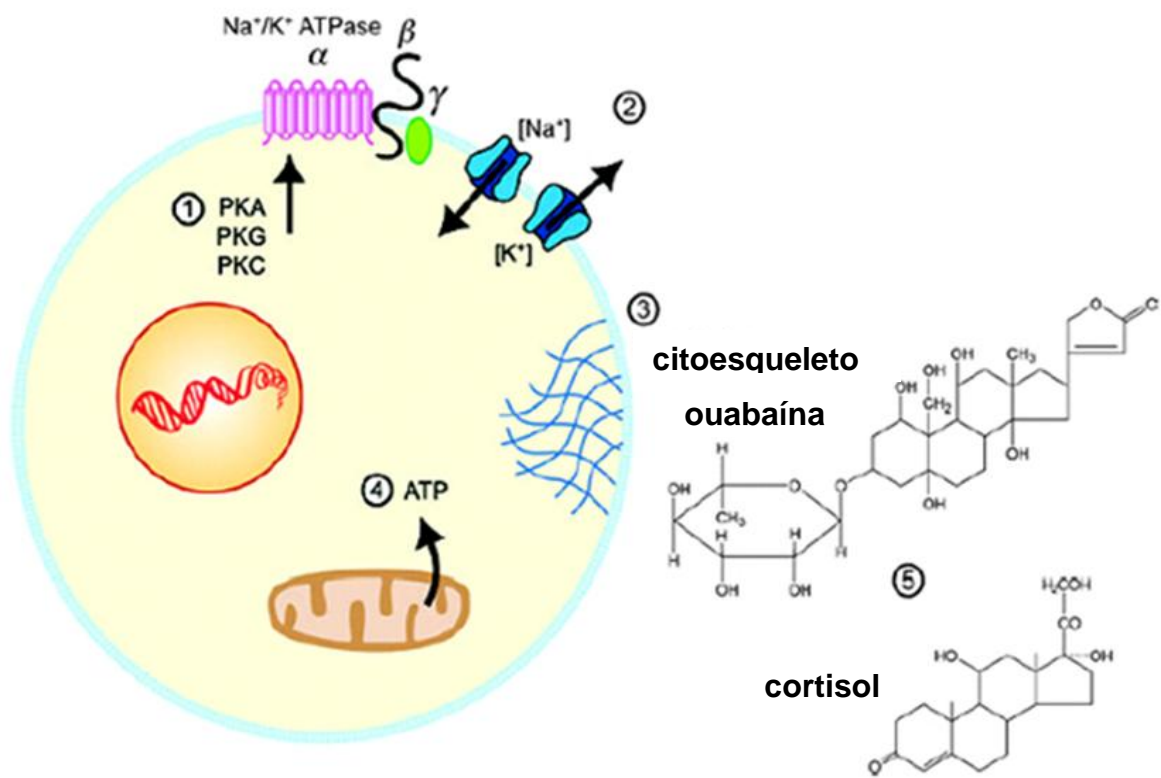


Figura 1.3: Esquema da regulação da Na⁺, K⁺-ATPase. Adaptado de Panayiotidis e colaboradores (2006).

1.2 Na⁺, K⁺-ATPase como um transdutor de sinal

Além do seu funcionamento como uma bomba de íons, a Na⁺, K⁺-ATPase tem sido apresentada também como um transdutor de sinal (Reinhard *et al.*, 2013). Sua função na sinalização intracelular parece ter sido adquirida na evolução através da incorporação de muitos domínios que interagem com proteínas e ligantes (Xie e Cai, 2003). Esta enzima pode interagir, nas cavéolas - uma subfração da membrana plasmática contendo níveis elevados de colesterol, glicosfingolipídios e esfingomiélinina (Razani *et al.*, 2002), com diferentes proteínas de sinalização, incluindo Src tirosina quinase (Xie e Cai, 2003), PKC, PKA e PI3K (Therien e Blostein, 2000); e está ligada a caveolinas, que são proteínas ancoradoras de 21 – 24 kDa, associadas à membrana plasmática (Liu *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004). Nos mamíferos, existem três diferentes genes para caveolina, resultando em seis isoformas, que são expressas de forma tecido-específica (Williams e Lisanti, 2004).

O estudo do efeito de ligantes na estrutura da bomba de Na⁺ e K⁺ tem mostrado que a interação da Na⁺, K⁺-ATPase com Src quinase, EGFR e outras proteínas, forma um microdomínio de sinalização - sinalossoma (Figura 1.4), restrito às cavéolas (Haas *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2003; Xie e Cai, 2003; Wang *et al.* 2004; Pierre e Xie, 2006; Liang *et al.*, 2007; Li e Xie, 2009). Esses achados suportam a proposta de que a ativação do complexo Na⁺, K⁺-ATPase-Src é o ponto inicial para a sinalização, a partir da interação da ouabaína com a enzima, para o EGFR e outras vias de sinalização intracelular. Sendo assim, a ligação da ouabaína à Na⁺, K⁺-ATPase regula a interação entre esta enzima e a caveolina e estimula a Src quinase citoplasmática. A Src ativada, transativa EGFR, o qual recruta proteínas adaptadoras, dando seguimento à ativação da cascata via Ras-MAPKs (Haas *et al.*, 2000; Li e Xie, 2009). Estes eventos resultam em mudanças na expressão de múltiplos genes, além da regulação da concentração de Ca²⁺ intracelular (Aizman *et al.*, 2001). Oscilações de Ca²⁺ intracelular ativam NFκB. Este fator de transcrição pluripotente ativa genes que modulam a proliferação celular, apoptose e desenvolve respostas do sistema imune (Miyakawa-Naito *et al.*, 2003). Além disso, a ativação de Src estimula outras vias, incluindo o aumento na produção mitocondrial de espécies reativas de oxigênio (ROS), sendo este considerado um importante passo na indução da apoptose (Xie e Cai, 2003). Entretanto, a resposta final da sinalização intracelular ativada por glicosídeos cardíacos é dependente do tipo de tecido celular, tempo de exposição e concentração da droga (Mijatovic, *et al.*, 2007a). A função de

transdução de sinal da Na⁺, K⁺-ATPase parece ocorrer através de propriedades que são independentes de sua função como uma bomba de íons (Liang *et al.*, 2007). É importante notar que o efeito da ouabaína sobre a Src é independente de mudanças nas concentrações intracelulares de Na⁺ e K⁺ (Xie e Cai, 2003; Pierre e Xie, 2006).

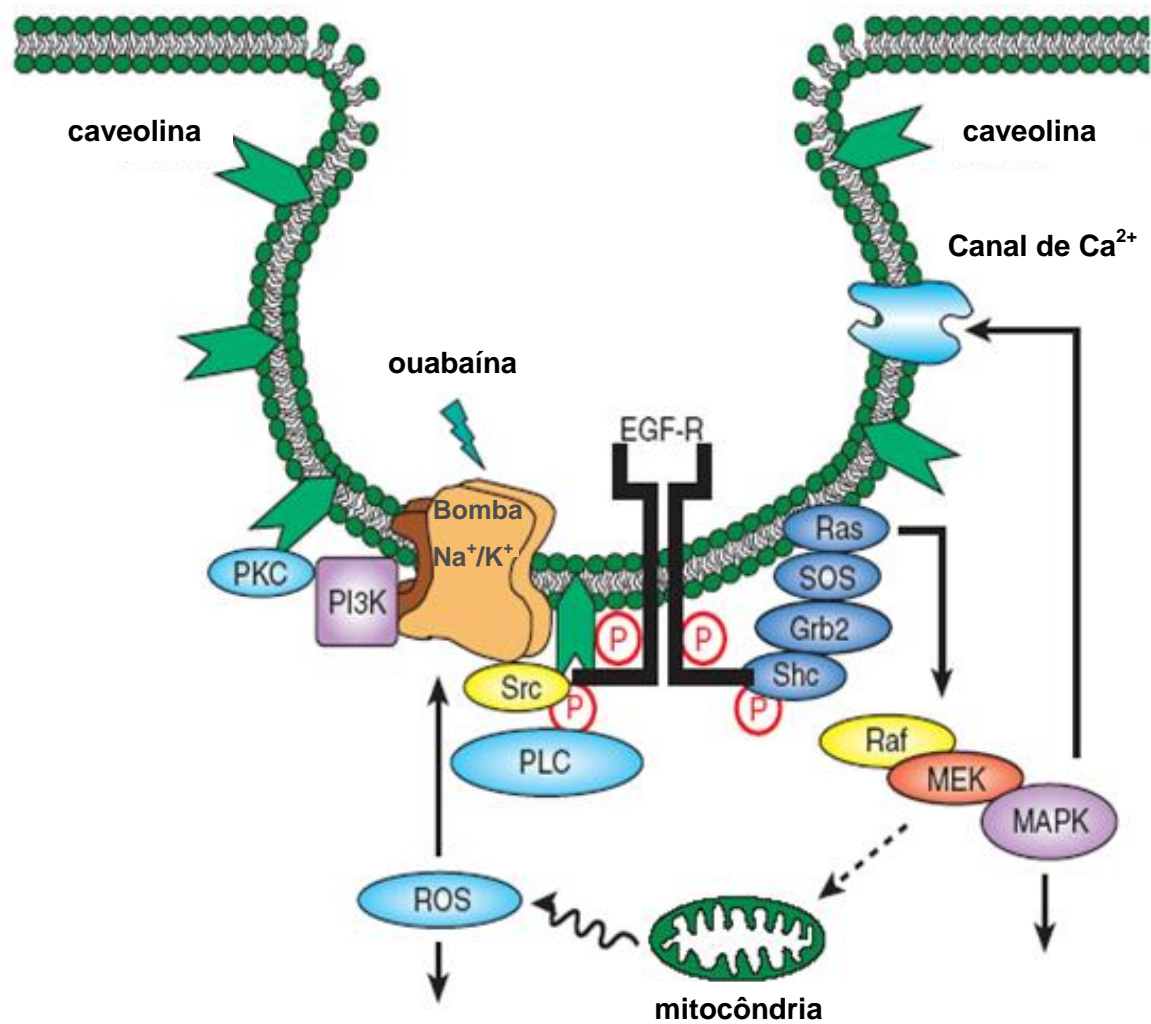


Figura 1.4: Esquema da formação do sinalossoma. Adaptado de Xie e Cai (2003).

1.3 Na⁺, K⁺-ATPase, MAPKs e Interleucinas

A ativação da sinalização de MAPKs é conhecida por apresentar um papel crítico na regulação celular, levando a respostas imunes, proliferação e diferenciação celular. As proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) formam uma família de proteínas quinases serina/treonina responsável pela maioria das respostas celulares à citocinas e sinais externos de estresse, e são cruciais para a regulação da produção de mediadores inflamatórios. Todos os três principais membros da família MAPK – quinase regulada por sinal extracelular (Erk), quinase c-jun N-terminal (JNK) e p38 foram relatados como responsáveis pela produção de citocinas inflamatórias, dentre elas, as interleucinas (IL) IL-1 β , IL-6, IL-8 e fator de necrose tumoral (TNF- α) (Qu *et al.*, 2012). Erk e p-38 podem desempenhar um importante papel na ativação prejudicial da microglia na lesão cerebral aguda. JNK é ativada por citocinas pró-inflamatórias e estresse celular, e desempenham um papel essencial na regulação da resposta inflamatória (Qu *et al.*, 2012).

Em geral, Erk ativada controla a proliferação e diferenciação celular. Por outro lado, a sinalização de JNK e p38 estimulada regula a proliferação celular, invasão, sobrevivência, migração, parada do crescimento e apoptose. A função particular regulada por MAPK é dependente do tipo celular e do tipo e duração do estímulo (Uddin *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2013).

Os astrócitos são as principais células gliais no sistema nervoso central e são fundamentais para a manutenção do ambiente homeostático. Também desempenham um papel importante na regulação imune, atuando como uma fonte de quimiocinas, citocinas e moléculas de adesão (Kim *et al.*, 2013). Assim, os astrócitos ativados desempenham um papel importante como células inflamatórias ou imunorreguladoras no sistema imune do sistema nervoso central.

Os GBMs, tumores oriundos dos astrócitos, são de natureza altamente inflamatória, porque estão infiltrados pela microglia e rodeados por um conjunto de citocinas pró-inflamatórias, incluindo o fator de necrose tumoral α (TNF- α) e IL-1 β . Estas citocinas são susceptíveis de promover a expansão do GBM pela super expressão de outros mediadores pró-tumorigênicos, como por exemplo, IL-6 e IL-8. A IL-8 amplifica o microambiente inflamatório e propriedades quimiotáticas e angiogênica. Enquanto a IL-6 é mitogênica para células tumorais, e ambos TNF- α e

IL-1 β induzem a expressão de metaloproteases de matriz (MMPs) aumentando o potencial de invasão do GBM (Grivennikov *et al.*, 2010; Yeung *et al.*, 2012).

1.4 Glicosídeos cardíacos e a Na⁺, K⁺-ATPase

Os glicosídeos cardíacos (digitálicos) são compostos já conhecidos há mais de duzentos anos e são considerados os inibidores clássicos da Na⁺, K⁺-ATPase (Prassas e Diamandis, 2008).

Os principais glicosídeos cardíacos derivados de plantas incluem digitoxina, digoxina, ouabaína, oleandrina e proscillaridina, que são extraídos de plantas das famílias *Scrophulariaceae*, *Apocynaceae* e *Asparagaceae* (*Digitalis purpurea*, *Digitalis lanata*, *Strophanthus gratus*, *Nerium oleander* e *Urginea maritima*) (MacGregor e Walker, 1993). Vários glicosídeos cardíacos já foram encontrados em animais, como por exemplo, o bufadienólídeo isolado a partir do veneno de sapos (*Bufo sp.*) (Steyn e van Heerden, 1998).

Estes compostos consistem de um núcleo esteróide ligado a um ou mais resíduos de açúcar no C₃ e um anel lactona no C₁₇ (Figura 1.5). Os vários tipos de radicais de açúcar e lactonas proporcionam um grande número de glicosídeos cardíacos que, com base no seu anel de lactona, pode ser dividido em dois subgrupos: cardenólídeos, que contem um anel butirolactona insaturado com cinco membros; e bufadienólídeos, que contem um anel pirona insaturado com seis membros. Grupos de açúcares e de lactonas são orientados com uma conformação cis A/B e C/D em relação ao núcleo esteróide. Os açúcares ligados, tais como a glicose, galactose, manose, ramnose e digitalose, determinam as atividades farmacodinâmicas e farmacocinéticas de cada glicosídeo cardíaco (Cerella *et al.*, 2013).

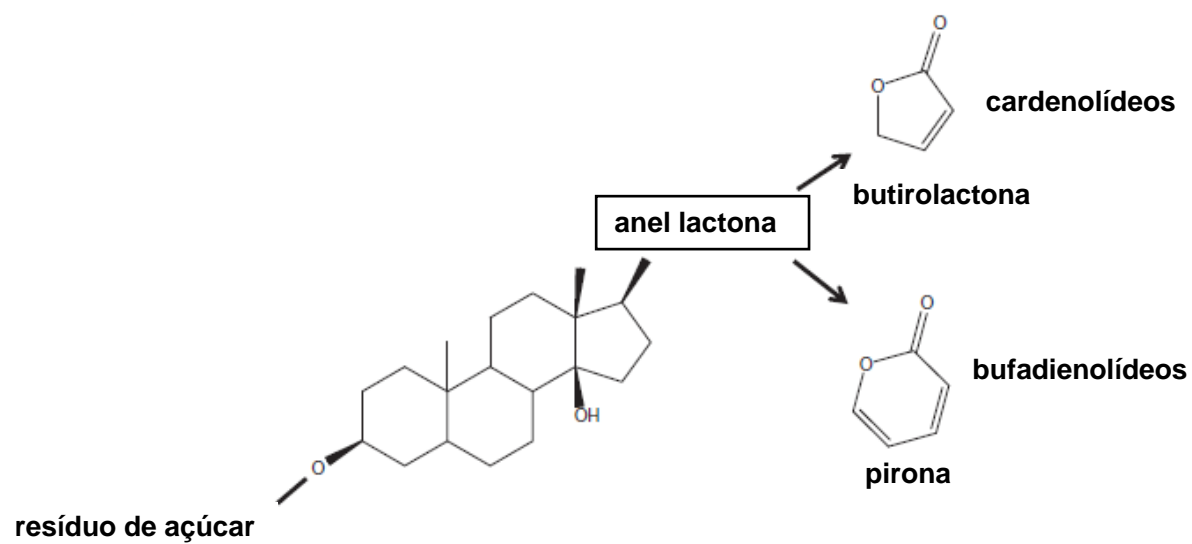


Figura 1.5: Características estruturais dos glicosídeos cardíacos (Cerella *et al.*, 2013).

Uma preparação de digitálicos, feita a partir de *Digitalis purpurea*, foi utilizada pela primeira vez para o tratamento de insuficiência cardíaca congestiva por William Withering em 1785. Atualmente, os digitálicos, principalmente a digoxina, são utilizados em todo o mundo no tratamento de pacientes com insuficiência cardíaca, por serem os mais potentes agentes inotrópicos (que aumentam a força de contração cardíaca) conhecidos. Seus efeitos são mediados pela capacidade destes compostos em inibir a bomba de Na^+ e K^+ ao ligarem-se especificamente à subunidade α , na superfície extracelular da membrana, bloqueando a enzima no estado conformacional E_2 fosforilado (Rose e Valdes Jr., 1994; Buckalew, 2005; Wasserstrom e Aistrup, 2005) - (Ver Figura 1.2).

O mecanismo proposto para o efeito inotrópico dos glicosídeos cardíacos é iniciado com a inibição da Na^+ , K^+ -ATPase, o que leva à inibição do efluxo de Na^+ , causando um aumento na concentração intracelular deste íon. Isto altera a atividade do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, causando uma elevação transitória de Ca^{2+} citoplasmático e, portanto, maior contratilidade do músculo cardíaco. A elevação da concentração intracelular de Ca^{2+} pode também ser a responsável pela sintomatologia observada na intoxicação por estas drogas (MacGregor e Walker, 1993; Hauptman e Kelly, 1999; Schwinger *et al.*, 2003; Wasserstrom e Aistrup, 2005).

A presença de um sítio altamente conservado de ligação de alta afinidade na subunidade α para a ouabaína sugere a existência de moduladores endógenos circulantes que controlem a atividade da Na^+ , K^+ -ATPase, ligando-se ao sítio da ouabaína. A existência de tais ligantes poderia ter implicações em muitos processos fisiológicos, tais como na modulação da contractilidade cardíaca, excreção renal de Na^+ , sensibilidade à insulina, hipertensão, neurotransmissão e alterações no crescimento e proliferação celular (MacGregor e Walker, 1993; Buckalew, 2005; Weidemann, 2005).

Vários compostos semelhantes aos glicosídeos cardíacos tem sido identificados a partir de diversos tecidos e fluidos corporais de mamíferos, os quais podem servir como ligantes da Na^+ , K^+ -ATPase (Hamlyn *et al.*, 1991; Bagrov *et al.*, 1998). Entre os candidatos a inibidores da Na^+ , K^+ -ATPase, o composto endógeno semelhante à ouabaína produzido pela glândula adrenal é o mais extensivamente estudado (Nicholls *et al.*, 2009). Porém existem evidências sugerindo que o hipotálamo também produz uma substância semelhante à ouabaína (Tymiak *et al.*,

1993; Wang *et al.*, 2002). Dados da literatura indicam que os níveis plasmáticos de compostos endógenos semelhantes à ouabaína estão aumentados em vários estados patológicos, incluindo insuficiência cardíaca congestiva (Gottlieb *et al.*, 1992), hipertensão (Manunta *et al.*, 1999) e hipertrofia do ventrículo esquerdo (Skoumal *et al.*, 2007).

1.5 Na⁺, K⁺-ATPase e o câncer

O transporte de muitos substratos, tais como glicose e aminoácidos, pelas células de mamíferos é dependente de Na⁺. Este íon atua como um co-substrato para o transporte e/ou para o gradiente eletroquímico fornecendo energia para a acumulação ativa de nutrientes. Uma vez que a manutenção do gradiente de Na⁺ é dependente da atividade da Na⁺, K⁺-ATPase, existe uma relação entre o crescimento celular e a atividade desta enzima (Shen *et al.*, 1978).

Mudanças no transporte de íons através da membrana celular são importantes na tumorigênese, e já estão presentes mesmo antes de evidências morfológicas do tumor (Weidemann, 2005). A transformação em uma célula maligna é dada pela alteração da superfície da membrana celular, tal qual mudanças no mecanismo de absorção, que afetam as concentrações internas de nutrientes que regulam o crescimento da célula. Um aumento na carga de Na⁺ através da membrana celular, por um aumento da permeabilidade deste íon, pode levar ao aumento da atividade da Na⁺, K⁺-ATPase como parte da tumorigênese. Com a transformação neoplásica, este aumento no transporte Na⁺ facilitaria o aumento do transporte de nutrientes (Shen *et al.*, 1978).

Não só a atividade da Na⁺, K⁺-ATPase difere entre as células normais e tumorais. Uma redução na densidade de Na⁺, K⁺-ATPase na membrana plasmática de células tumorais, bem como uma alteração na expressão (supressão ou indução) de isoformas, ocorrem nas células neoplásicas (Weidemann, 2005).

Estudos realizados há trinta anos, utilizando células de sarcoma e comparando-as com os fibroblastos, demonstrou uma densidade reduzida de receptores de ouabaína, ou seja, Na⁺, K⁺-ATPase, na membrana plasmática de células malignas (Latzkovits *et al.*, 1983). Estes resultados foram confirmados por

um estudo com pacientes com câncer urotelial (bexiga), revelando um padrão bifásico distinto de expressão de subunidades α e β da Na^+ , K^+ -ATPase com diminuição significativa na expressão de ambas as subunidades em tumores de grau I em relação aos tecidos morfológicamente normais. Porém, tumores de alto grau exibiram um aumento na expressão, sugerindo que a redução na expressão de subunidades da Na^+ , K^+ -ATPase pode ter ocorrido nos estágios iniciais do desenvolvimento do tumor, sendo a expressão das subunidades e a atividade da enzima aumentados durante a progressão do tumor (Espineda *et al.* 2003).

Com relação às alterações na expressão de isoformas, a presença de proteínas FXD associadas a tipos específicos de câncer afeta a função da bomba de sódio. Por exemplo, a FXD3 (um marcador de tumor mamário que medeia a diminuição na afinidade aparente da Na^+ , K^+ -ATPase por Na^+ e K^+) é altamente expressa em câncer de mama e próstata e; a FXD5 (relacionada aos canais iônicos) está expressa em vários tipos de câncer, mas somente em poucos tipos de tecidos normais (Geering, 2006).

Além disso, tem sido reportado que a expressão da isoforma β_1 está frequentemente reprimida em células de câncer epitelial derivadas de pâncreas, rim, cólon e mama. Esta redução na expressão de β_1 está correlacionada com um aumento da expressão do factor de transcrição Snail conhecido por regular negativamente a proteína caderina-E. Como resultado da redução na expressão de caderina-E, estas células de câncer epitelial destacam-se umas das outras, parecendo ser essencial para estas células serem capazes de se tornarem invasivas individualmente (Espineda *et al.* 2004; Rajasekaran *et al.*, 2005).

Alguns trabalhos apontam para a supressão ou estimulação da expressão de isoformas da subunidade α , principalmente α_1 e α_3 , de acordo com o tipo de câncer em questão (Mijatovic *et al.*, 2008).

Uma análise detalhada da expressão de subunidades α revelou uma diminuição na expressão de isoformas α_1 e um aumento na expressão de α_3 no processo de transformação tumoral de células de adenocarcinoma prostático (Mobasherri *et al.*, 2003), bem como em câncer de cólon e reto (Sakai *et al.*, 2004). Por outro lado, a isoforma α_1 está super expressa em outros tipos de câncer, incluindo, câncer de pulmão de células não pequenas (Mijatovic *et al.*, 2007b),

carcinoma de células renais (Seligson *et al.*, 2008), glioma (Lefranc *et al.*, 2008) e melanoma (Mathieu *et al.*, 2009).

1.6 Glicosídeos cardíacos e o câncer

Os efeitos dos glicosídeos cardíacos sobre a atividade da Na⁺, K⁺-ATPase e o uso dessas drogas na terapia de doenças cardiovasculares têm sido amplamente divulgados. No entanto, desde o início da Idade Média, o extrato da planta *Nerium oleander* (espirradeira) já era usado no tratamento do câncer, documentado a partir de vários locais geograficamente separados como Egito, Venezuela, Cuba e Índia (Moss, 1998).

Na década de 60, a inibição do crescimento de células neoplásicas *in vitro* por glicosídeos cardíacos foi relatada (Shiratori, 1967). Porém, a primeira evidência epidemiológica para o efeito anticâncer dos glicosídeos cardíacos foi reportada por Stenkvis em 1979. O estudo dele indicou que amostras de tecidos de câncer de mama retiradas de pacientes com insuficiência cardíaca congestiva tratados com glicosídeos cardíacos, exibiram mais características benignas do que amostras de tecidos de câncer de pacientes controle que não foram tratados com glicosídeos cardíacos (Stenkvis, 1979). Além disso, cinco anos depois da mastectomia, a taxa de recorrência para o grupo tratado foi 9,6 vezes menor do que para o grupo controle (Stenkvis, 1980). Observações em longo prazo constataram que a terapia com glicosídeos cardíacos reduziu significativamente a taxa de mortalidade por câncer de mama (Goldin e Safa, 1984; Stenkvis, 1999).

Além disso, Haux e colaboradores (2001) publicaram um estudo analítico-descritivo sobre os efeitos antineoplásicos de glicosídeos cardíacos sobre a leucemia e cânceres do trato renal/urinário. Este estudo indicou que as doses de glicosídeo cardíaco que são ativas contra o câncer são semelhantes às concentrações plasmáticas terapêuticas encontradas em pacientes cardíacos tratados com estas drogas.

Essas observações clínicas estabeleceram o efeito benéfico dos glicosídeos cardíacos para terapia contra o câncer (López-Lázaro *et al.*, 2005). Embora estes agentes pareçam ser seguros nas doses utilizadas para o tratamento de distúrbios

cardíacos, evidências adicionais ainda são necessárias antes que estes compostos sejam utilizados clinicamente (Haux *et al.*, 2001).

Esta questão é crítica, pois os glicosídeos cardíacos podem ter efeitos opostos com doses diferentes. Por exemplo, proscillaridina A, digoxina e ouabaína, na concentração de 30 nmol/L, estimulam a proliferação de fibroblastos humanos pela ativação de ERK1/2, enquanto estas drogas induzem apoptose nas mesmas células na concentração de 300 nmol/L, detectada pelo aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} e ativação de caspase-3 (Winnicka *et al.*, 2010).

Além do exposto acima, o fato da Na^+ , K^+ -ATPase também atuar como um transdutor de sinal despertou novos interesses nas propriedades anticâncer dessas drogas (Kometiani *et al.*, 2005). Estudos adicionais *in vivo* e *in vitro* confirmaram essas observações iniciais e a primeira geração de drogas anticâncer baseadas em glicosídeos cardíacos encontra-se em ensaios clínicos (Winnicka *et al.*, 2006; Mijatovic *et al.* 2007b; Prassas e Diamandis, 2008).

1.7 Apoptose induzida por inibidores da Na^+ , K^+ -ATPase

O termo apoptose é utilizado para descrever os processos morfológicos que levam à morte celular programada. É um processo ativo e definido, que desempenha um papel importante no desenvolvimento de organismos multicelulares e na regulação e manutenção das populações de células nos tecidos em condições fisiológicas e patológicas (Lawen, 2003).

Nas últimas três décadas, tem sido mostrado que os glicosídeos cardíacos são capazes de inibir a proliferação celular e possuem valiosa atividade citotóxica contra diferentes linhagens de células tumorais, sendo o fator principal dos efeitos anticâncer ocasionado através da apoptose (Rovinski *et al.*, 1987; Haux, 1999; Johansson *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2011; Cerella *et al.*, 2013; Babula *et al.*, 2013).

Os cardenólídeos ouabaína (Panayiotidis *et al.*, 2010), digitoxina (Haux, 1999), digoxina (Winnicka *et al.*, 2010), oleandrina (Raghavendra *et al.*, 2007) e o mais recentemente investigado UNBS1450 (Juncker *et al.*, 2011), induzem apoptose em células de diferentes tipos de câncer. Dados semelhantes foram encontrados

com os bufadienolídeos: bufalina (Yu *et al.*, 2008), cinobufagina (Xu *et al.*, 2011) e proscillaridina A (Winnicka *et al.*, 2007).

Outros mecanismos de apoptose induzidos por glicosídeos cardíacos tem sido reportados, tais como: a atenuação da via NFkB, uma “via chave” com efeitos antiapoptótico e pró-proliferativo (Manna *et al.*, 2000), o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (Newman *et al.*, 2006) e a ativação de MAPKs, dentre elas a JNK (proteína quinase c-Jun N-terminal) e a AP-1 (proteína ativadora – 1) (Okamoto *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2009).

A ativação da via apoptótica intrínseca (mitocondrial) ocorre em todos os estudos mencionados acima. Com a via intrínseca ativada, conseqüentemente, a liberação de citocromo *c* (proteína associada à membrana interna da mitocôndria, essencial na cadeia transportadora de elétrons) e perda do potencial de membrana mitocondrial foram documentadas (Huang *et al.*, 2012; Tailleur *et al.*, 2012).

Estudos adicionais demonstram a habilidade dos glicosídeos cardíacos de afetar a via apoptótica extrínseca, inicializada pela ligação dos receptores de morte (Fas e TNFR) e receptores de interferon e TRAIL aos seus ligantes na membrana plasmática da célula. O tratamento com ouabaína combinado com FasL ou TRAIL potencializou a apoptose (Panayiotidis *et al.*, 2010; Dong *et al.*, 2011).

Ambas as vias apoptóticas (intrínseca e extrínseca) ativadas pelos glicosídeos cardíacos estão relacionadas, principalmente, com a ativação de caspase-3 (Wannicka *et al.*, 2010). Embora a cascata proteolítica das caspases tenha um papel central na resposta apoptótica, sua ativação é fortemente regulada por uma variedade de outros factores. A família de proteínas Bcl-2 é conhecida por desempenhar um papel crucial na a regulação da apoptose como pontos de checagem entre a superfície da célula e os sinais de morte internos, formação do apoptossoma e ativação de a cascata de caspase (Burlacu, 2003).

No entanto, a apoptose não é o único tipo de morte celular provocada pelos inibidores da Na⁺, K⁺-ATPase. Alguns glicosídeos cardíacos são capazes de induzir autofagia, morte celular lisossomal com degradação dos componentes celulares em vacúolos autofágicos dentro da célula a morrer, principalmente, pela ação de proteínas proteossomais (Chowdhury *et al.*, 2006; Babula *et al.*, 2013).

O UNBS1450 induz a morte celular autofágica em células de câncer de pulmão de células não pequenas (Mijatovic *et al.*, 2006) e em células de glioblastoma (Lefranc e Kiss, 2008; Lefranc *et al.*, 2008). Já a oleandrina e a bufalina, induzem autofagia, respectivamente, em células humanas de câncer do pâncreas e cólon (Newman *et al.*, 2007; Xie *et al.*, 2011).

1.8 Compostos anticâncer inibidores da Na⁺, K⁺-ATPase

Um esforço tem sido feito para modificar a estrutura de glicosídeos cardíacos para aumentar sua citotoxicidade e existem diferentes abordagens para melhorar esta propriedade (Heasley, 2012). Duas delas estão baseadas na modificação do radical açúcar (Iyer *et al.*, 2010) e na combinação dos glicosídeos cardíacos com outros compostos usados na terapia anticâncer, tais como derivados baseados em platina (Ahmed *et al.*, 2009; Felth *et al.*, 2009). A mais importante abordagem está baseada na modificação do esqueleto básico dos glicosídeos cardíacos, modificando os grupamentos hidroxila existentes, afetando significativamente a atividade biológica destas drogas (Babula *et al.*, 2013).

Três derivados de ouabaína, digoxina e proscillaridina A contendo um grupamento carboxila no lugar de um radical lactona foram sintetizados e tiveram a sua atividade citotóxica avaliada em células de câncer de mama. Estes compostos perderam a capacidade de aumentar a concentração intracelular de Ca²⁺ e de exercer efeitos adversos sobre o coração, mas foram capazes de reduzir a síntese de DNA, aumentar a atividade de caspase-3 e inibir as topoisomerases I e II destas células (Winnicka *et al.*, 2008).

Derivados semi-sintéticos de glicosídeos cardíacos também tiveram suas propriedades citotóxicas testadas. O cardenólídeo semi-sintético UNBS1450 (19-hidroxi-2''-oxovoruscarina derivado da 2''-oxovoruscarina isolada da *Calotropis procera*, *Apocynaceae*) é ativo em células cancerosas que expressam diversas formas de resistência a múltiplas drogas (Mijatovic *et al.*, 2009).

O UNBS1450 além de ser uma molécula com propriedades citotóxica e antiproliferativa muito potentes (Mijatovic *et al.*, 2007b), também é um potente inibidor da atividade da enzima Na⁺, K⁺-ATPase, indicando uma estreita ligação

entre esta enzima e regulação do ciclo celular, proliferação e apoptose, inclusive em células resistentes a múltiplas drogas (Mijatovic *et al.*, 2007b; Juncker *et al.*, 2009; Mijatovic *et al.*, 2009).

Comparado com outros compostos de referência, como o taxol, irinotecano, oxaliplatina, mitoxantrone e temozolomida, o UNBS1450 é mais potente contra o câncer de pulmão das células não pequenas, o câncer de próstata refratário e glioma (Juncker *et al.*, 2009; Mijatovic *et al.*, 2009; Babula *et al.*, 2013).

Entretanto, o uso de inibidores da atividade da Na⁺, K⁺-ATPase na terapia anticâncer tem sido avaliado com compostos que não estão relacionados com os glicosídeos cardíacos, como por exemplo, o monoterpene álcool perílico que é utilizado no tratamento de vários tumores malignos, incluindo os glioblastomas (Garcia *et al.*, 2010).

Abordagens inovadoras para combater vários tipos de cânceres associados com prognósticos ruins envolvem a inibição de vários tipos de canais iônicos, e uma atenção especial tem sido dada a subunidade α_1 da Na⁺, K⁺-ATPase pelo grupo do Dr. Robert Kiss - ver item 1.5 (Mijatovic *et al.*, 2007b; Lefranc *et al.*, 2008; Mathieu *et al.*, 2009; Mijatovic *et al.*, 2012a; Mijatovic *et al.*, 2012b). Recentemente, com a nossa colaboração, este grupo adotou uma estratégia farmacológica que consistiu em analisar o efeito inibitório na atividade da Na⁺, K⁺-ATPase de seis compostos originais que foram ativos na inibição do crescimento de células neoplásicas *in vitro*, em especial contra as células de gliomas resistentes à apoptose (Lefranc *et al.*, 2013).

Esses achados sugerem que novos agentes anticâncer baseados na Na⁺, K⁺-ATPase possam ser desenvolvidos. Esses compostos seriam baseados não apenas na função da bomba de sódio na transdução de sinal, com os glicosídeos cardíacos e seus derivados como possíveis candidatos, mas também com o uso de agentes terapêuticos que afetam diretamente a expressão de subunidades desta enzima (Mijatovic *et al.*, 2009).

1.9 Glioblastoma multiforme (GBM)

Diferentes tipos de tumores gliais (gliomas) têm sido identificados e classificados de acordo com os tipos celulares predominantes no tecido tumoral. Os tumores astrocíticos (originados de astrócitos) correspondem a aproximadamente 75% dos casos de gliomas e apresentam uma subclassificação por graus, que variam de I a IV, quanto à malignidade. O grau I denominado astrocitoma pilocítico é considerado um tumor benigno e o glioblastoma multiforme (GBM) é caracterizado como grau IV, dado ao seu elevado grau de malignidade (Vescovi *et al.*, 2006; Ohgaki e Kleihues, 2007). A classificação proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS), utilizada como padrão de classificação internacional de tumores astrocíticos, apresenta as diferentes classes existentes (Tabela 1.2).

Tabela 1.2: Classificação dos tumores astrocíticos. Estabelecida pela OMS, em 2002.

Origem do tumor	Classificação
Astrocítico	Astrocitoma pilocítico (grau I)
	Astrocitoma difuso (grau II)
	Astrocitoma anaplásico (grau III)
	Glioblastoma (grau IV)

O GBM é o mais frequente e maligno tumor cerebral humano. É caracterizado como um astrocitoma de alto grau por apresentar capacidade infiltrante e ausência de limitação. As células tumorais dos GBMs apresentam um modelo de distribuição tecidual difuso no cérebro, que impede a retirada total cirúrgica do tumor, tornando o prognóstico para o GBM bastante desanimador, pois a sobrevida média, quando combinadas radioterapia e quimioterapia, é de aproximadamente 14,6 meses (Vescovi *et al.*, 2006). Estas células ajustam sua forma e volume rapidamente ao invadirem o parênquima cerebral, sendo essencial para este processo a atividade de mecanismos de transporte de íons (Lefranc, *et al.*, 2008). Outro fator importante que direciona a invasão de células transformadas é o microambiente inflamatório. A inflamação crônica contribui para o aumento de citocinas inflamatórias, que

favorecem a migração e invasão das células neoplásicas na carcinogênese (Grivennikov *et al.*, 2010).

Os GBMs podem ser classificados em primários, quando se manifestam rapidamente, não havendo evidência de lesão maligna precursora e acometem pessoas com idade média de 55 anos; ou secundários, quando se desenvolvem mais lentamente, a partir da progressão de um astrocitoma de grau II ou III e acometem preferencialmente adultos jovens, com idade média de quarenta anos (Ohgaki *et al.*, 2004).

Apesar destes tipos de tumores serem pouco diferenciados, ainda mantêm características que permitem sua classificação histológica, sendo este o método diagnóstico atualmente utilizado para a escolha da terapia mais adequada e determinação do prognóstico. Entretanto, a determinação do grau de malignidade pode variar com o observador, não garantindo a objetividade necessária para um diagnóstico preciso (Louis *et al.*, 2001). Melhorias significantes têm sido reportadas nesta área com o advento da classificação diagnóstica molecular, onde a superexpressão do receptor de EGF e mutações no gene TP53 ocorrem na evolução de glioblastomas primários e secundários, respectivamente (Louis, 2006; Louis *et al.*, 2007).

As estratégias terapêuticas convencionais utilizadas na atualidade que tem por objetivo a erradicação do tumor são: cirurgia, radioterapia e quimioterapia. A quimioterapia baseia-se na aplicação de compostos que levem à inibição do crescimento ou à morte da célula cancerosa. Porém, a capacidade das células tumorais em evadir-se da morte celular, bem como sua resistência à quimioterapia, constituem um desafio para a clínica. Por esse motivo, existe um grande interesse na identificação de novos compostos que sejam efetivos no tratamento de pacientes que não respondem aos quimioterápicos disponíveis. Os terpenos, por exemplo, são compostos naturais com propriedades antimitóticas que podem ser usados nesses casos (Belanger, 1998).

1.10 Álcool perílico

Novas drogas quimioterápicas tem sido desenvolvidas, sendo a maioria originada de fontes naturais, como os vegetais. Os terpenos são exemplos de tais compostos com propriedades antitumorais de grande interesse médico (Belanger, 1998; Fernandes *et al.*, 2005). Esses hidrocarbonetos são classificados de acordo com o número de unidades isoprênicas formadoras em: hemiterpenos (C_5 , 1 unidade isoprênica), monoterpenos (C_{10} , 2 unidades isoprênicas), sesquiterpenos (C_{15} , 3 unidades isoprênicas), diterpenos (C_{20} , 4 unidades isoprênicas) e politerpenos (C_5)_n (McGarvey e Croteau, 2005).

Monoterpenos tendem a ser altamente voláteis e frequentemente constituem os componentes primários de óleos essenciais, a fragrância principal das plantas, utilizados em perfumes e como aromatizantes para cosméticos e alimentos (Boik, 2001). O limoneno (Figura 1.6) é um monoterpeno monocíclico presente em cascas de frutos cítricos, principalmente de limão e laranja. Este composto de baixa toxicidade possui atividade quimiopreventiva e quimioterapêutica contra vários tipos de tumores, devido a sua capacidade de inibir a isoprenilação pós-traducional de GTPases, incluindo membros da família Ras. A isoprenilação é importante para a associação das GTPases com a membrana plasmática, tornando estas proteínas capazes de atuarem na via de sinalização requerida para o crescimento e proliferação celular (Gelb *et al.*, 1995; Holstein e Hohl, 2003; Nakada *et al.*, 2007).

A alta dose de limoneno (1000 mg/Kg/dia) necessária para os efeitos benéficos tem limitado seu uso. Por este motivo, outros monoterpenos passaram a ser investigados, principalmente seus metabólitos álcool perílico (POH) e ácido perílico (PA) (Figura 1.6). Em humanos, aproximadamente 40% do limoneno é metabolizado a PA. O POH também é metabolizado a PA, porém numa taxa mais alta, quando comparada com a do limoneno (Boik, 2001).

O POH e o PA também são inibidores da isoprenilação da proteína Ras, atuando desta forma, no controle da proliferação celular (Holstein e Hohl, 2003), na ativação das vias pró-apoptóticas e bloqueando o ciclo celular de diferentes células tumorais, além de aumentar a expressão da proteína pró-apoptótica Bax (Xu, *et al.*, 2004; Fernandes, *et al.*, 2005; Yeruva *et al.*, 2007; Chaudhary *et al.*, 2009).

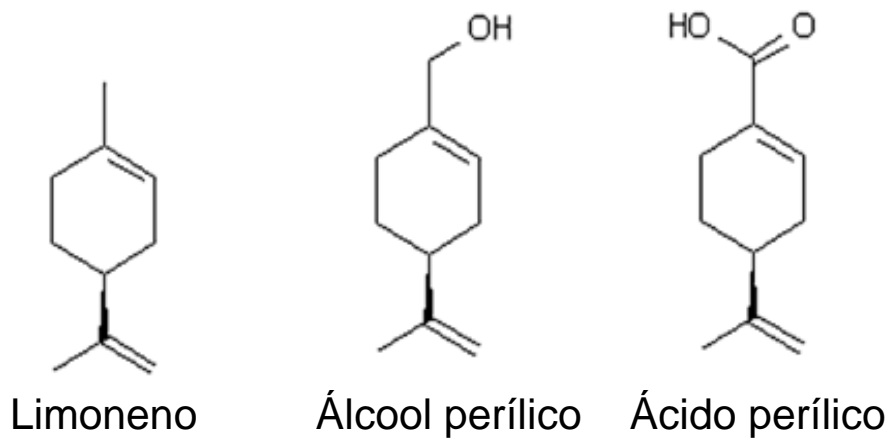


Figura 1.6: Estrutura química dos monoterpenos: limoneno, POH e PA. Adaptado de Holstein e Hohl (2003).

O POH, um monoterpene monocíclico hidroxilado também encontrado principalmente nos óleos essenciais de perila (*Perilla frutescens*), lavanda, hortelã, sálvia, sementes de aipo, bergamota selvagem, gengibre e cerejas, por possuir uma atividade antitumoral mais potente, é considerado como uma substância com potencial atividade regressora de diferentes tumores, incluindo mamários, pancreáticos e cerebrais (Yuri, *et al.*, 2004; Da Fonseca *et al.*, 2006a; 2006b; 2008 e 2011; Matos *et al.*, 2008). Apresenta também efeito radiosensibilizador (Rajesh *et al.*, 2003) e significativa inibição angiogênica (Loutrari *et al.*, 2004).

Estudos clínicos (Fase I/II) encontram-se em andamento com a administração oral de POH a pacientes portadores de diferentes tumores malignos (Ripple *et al.*, 1998; 2000; Hudes *et al.*, 2000; Murren *et al.*, 2002; Azzoli *et al.*, 2003; Morgan-Meadows *et al.*, 2003; Bailey *et al.*, 2004), dentre eles, câncer de próstata (Liu *et al.*, 2003), câncer de mama (Stearns *et al.*, 2004; Bailey *et al.*, 2008) e câncer de pâncreas (Matos *et al.*, 2008). Nenhuma evidência de toxicidade hepática, renal ou neurobiológica tem sido relatada. Porém foram observados efeitos colaterais afetando o trato gastrointestinal.

De acordo com essas evidências, estudos clínicos da administração por inalação de POH (Fase II) com pacientes portadores de gliomas malignos recidivos tem sido desenvolvidos. Estes estudos têm mostrado o efeito antitumoral, com diminuição da morbidade, melhora do quadro clínico-laboratorial, diminuição significativa da massa tumoral e aumento da sobrevida (maior que 18 meses) em vários pacientes, além de reduzir consideravelmente os efeitos colaterais que afetam o trato gastrointestinal, apresentando somente irritação local da mucosa nasal. (Da Fonseca *et al.*, 2006a; 2006b; 2008; 2009 e 2011).

Tumores recorrentes geralmente são resistentes à quimioterapia padrão com temozolomida, um agente alquilante de DNA. Uma vez que os glioblastomas se tornam resistente ao temozolomida, as opções disponíveis de tratamento ficam limitadas. O POH foi citotóxico para uma variedade de linhagens de células de glioma, incluindo as resistentes ao temozolomida. O POH também serviu como um agente quimiossensibilizante, reforçando a capacidade citotóxica do temozolomida (Cho *et al.*, 2012).

1.11 Álcool perfílico e Na⁺, K⁺-ATPase

Estudos realizados por nosso grupo demonstraram a capacidade do álcool perfílico em inibir a atividade da enzima Na⁺, K⁺-ATPase em preparações purificadas de rim e cérebro de cobaio, com maior especificidade para a isoforma α_1 presente no tecido renal. Ensaio utilizando homogeneizados brutos destes mesmos órgãos demonstraram um perfil de inibição semelhante, indicando certa seletividade do POH pela Na⁺, K⁺-ATPase (Garcia et. al, 2010).

O efeito inibitório, causado pelo POH, na atividade da Na⁺, K⁺-ATPase, foi reversível e estudos cinéticos definiram a inibição como não-competitiva para Na⁺ e K⁺, porém incompetitiva para ATP. Numa inibição do tipo incompetitiva, o inibidor não se liga diretamente a enzima, mas sim ao complexo enzima-substrato, neste caso, ao complexo enzima-ATP. Além disso, foi demonstrado que, ao contrário dos glicosídeos cardíacos, o POH atua na fase I do ciclo catalítico da Na⁺, K⁺-ATPase, o qual se inicia com a ligação de ATP à enzima. Embora uma interação direta do POH com um sítio definido da enzima possa ter sido demonstrada, não é possível descartar a possibilidade de que o POH ligue-se ao microambiente lipídico que envolve enzima, mesmo em sua forma purificada (Garcia *et al.*, 2010).

Duelund e colaboradores (2012) observaram que o limoneno e o POH aloca-se, preferencialmente, no ambiente hidrofóbico da membrana, mostrado pelos seus grandes coeficientes de partição da membrana. Estes terpenóides interferem com as transições de fase de membranas modelo, indicando que a sua presença na membrana modifica as propriedades globais da membrana modelo. Sugerindo que o limoneno e o POH exercem, pelo menos, parte dos seus possíveis efeitos biológicos, dentre eles, a inibição da Na⁺, K⁺-ATPase através de um efeito na membrana plasmática.

Drogas que inibem a atividade da enzima Na⁺, K⁺-ATPase podem ter um importante papel no tratamento do câncer, fazendo desta enzima um alvo para a terapia anticâncer (Aperia, 2007), especialmente, a subunidade α_1 , em células de glioblastomas resistentes à apoptose (Lefranc *et al.*, 2008; Lefranc e Kiss, 2008). Devido a isso, uma análise acerca da atuação do POH nas funções celulares envolvidas na diferenciação e na morte celular, moduladas via Na⁺, K⁺-ATPase, são necessárias.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar se o POH pode atuar sobre a ativação da proteína JNK, através da interação entre este monoterpene e a enzima Na^+ , K^+ -ATPase, modulando a proliferação e/ou morte celular.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar o efeito do POH e do PA, seu principal metabólito, sobre a atividade da Na^+ , K^+ -ATPase em células de GBM humano (linhagens U87 e U251), células não tumorais como astrócitos de camundongo e células de rim de macaco verde africano (VERO).
- Determinar o efeito do POH, PA e OUA sobre a viabilidade celular de astrócitos de camundongo, VERO, U87 e U251 e comparar com o efeito inibitório destas drogas na atividade da Na^+ , K^+ -ATPase.
- Verificar o efeito do POH na liberação de citocinas pró-inflamatórias pelas células de GBM humano das linhagens U87 e U251.
- Verificar o efeito do POH na ativação da proteína JNK nas células de astrócitos de camundongo, VERO, U87 e U251.
- Avaliar o efeito dos compostos metil β -ciclodextrina e dasatinibe na ativação da proteína JNK pelo POH nas células de GBM humano da linhagem U87.
- Avaliar o efeito do agente inibidor da proteína JNK na indução de apoptose mediada pelo POH nas células de GBM humano das linhagens U87 e U251.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultivo e manutenção das células

Células das linhagens de GBM humano U87-MG (U87) e U251 e células não tumorais oriundas da cultura de astrócitos de camundongos e da linhagem de rim de macaco verde africano (VERO) foram utilizadas nos experimentos realizados neste trabalho.

As linhagens de células U87 e VERO foram cultivadas em meio DMEM (Gibco). A linhagem U251 foi cultivada em meio DMEM-F12 (Gibco). Ambos os meios de cultura foram enriquecidos com 10% de soro fetal bovino inativado (Gibco), antibióticos (100 U/mL de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina) (LGC) e 2,25g/L de NaHCO₃. As culturas foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de atmosfera de CO₂. As três linhagens de células foram cedidas pela Dra. Lídia M. F. Amorim (Universidade Federal Fluminense).

As células eram repicadas duas vezes por semana, em fluxo laminar (Tox - Modelo FLV – Série 491) previamente limpo com álcool 70% e iluminado por luz UV por 30 minutos. Após desprezar o meio, as células eram lavadas por duas vezes com PBS/EDTA (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, EDTA 0,03 mM, pH 7,4 ajustado com HCl) e mantidas por 5 minutos com tripsina (Gibco) 0,25% a 37°C. Após a soltura total das células, meio de cultura era adicionado e as células repicadas na concentração de 2x10⁴ células/cm².

As culturas de células astrocíticas foram cedidas pela Dra. Flávia C. A. Gomes (Universidade Federal do Rio de Janeiro) e preparadas como descrito previamente por seu grupo (Gomes *et al.*, 1999). As células foram obtidas a partir de camundongos suíços neonatos. Para isso, as estruturas cerebrais foram removidas e as meninges delicadamente retiradas. O tecido foi mecanicamente dissociado com auxílio de pipeta *Pasteur*. A densidade de plaqueamento utilizada foi 3x10⁵ células por poço de 16 mm de diâmetro e 3x10⁶ células por poço de 35 mm de diâmetro, sobre as placas previamente cobertas com poli-lisina (50 µg/ml, Sigma). As culturas foram mantidas em meio DEMEM-F12 (Invitrogen), contendo 2 mM de glutamina, penicilina/estreptomicina (100 U/mL) (Invitrogen), suplementado com 10% de soro

fetal bovino (Invitrogen) por aproximadamente 7 dias na estufa a 37°C e 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias. Após a cultura atingir a confluência, as células foram submetidas às passagens com o intuito de se gerar culturas purificadas de astrócitos. Este protocolo resulta em uma cultura constituída de mais de 95% de células GFAP positivas.

3.2 Captação de Rb⁺

A determinação da atividade da enzima Na⁺ K⁺ ATPase em cultura de células U87, U251, VERO e astrócitos de camundongos foi realizada segundo o nosso grupo (Garcia *et al.* 2010), adaptado de Gill e colaboradores (2004) e Dos Santos e colaboradores (2009), através da quantificação de Rb⁺, o qual mimetiza o K⁺, incorporado pelas células. Para a realização dos experimentos, placas de cultura celular de 24 poços (U87, U251, VERO e astrócitos de camundongos) foram utilizadas com uma concentração de 3x10⁵ células/poço e incubadas por 24 horas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂, para que as células pudessem aderir à placa. Após 24 horas, todo meio de cultura presente na placa foi removido e os poços lavados com 1,0 mL de tampão fosfato (PBS) (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, pH 7,4 ajustado com HCl). Em seguida, foi adicionado 1,0 mL de solução de Hank (NaCl 136,9 mM, MgSO₄ 0,8mM, NaHCO₃ 5mM, Na₂HPO₄ 0,33 mM, NaH₂PO₄ 0,44 mM, CaCl₂ 1,5 mM, Glicose 3 mM, Hepes 5 mM e RbCl 5,4 mM) por poço com as diluições de POH (Sigma) contendo concentrações equivalentes a 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 3,0 e 4,0 mM ou OUA (Sigma) e PA (Sigma) nas concentração de 0,5 mM e 4,0 mM respectivamente. Controles negativos contendo ou não o veículo (DMSO 0,1% v/v, Sigma) também foram realizados. As células foram novamente incubadas em estufa a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂ por 30 minutos. Decorrido este tempo, os poços foram lavados 3 vezes com 1,0 mL de PBS. Após o término da terceira lavagem, as células foram lisadas com a adição de 0,6 ml de SDS (0,15% p/v) por poço. Uma alíquota de cada amostra foi encaminhada para a quantificação do Rb⁺.

A quantificação do Rb⁺ foi realizada no Instituto de Química da Universidade Federal Fluminense, em colaboração com o Dr. Ricardo E. Santelli, utilizando o

Espectrômetro de Emissão Óptica com Acoplamento de Plasma Induzido (ICP-OES) Ultima 2, fornecido pela Jobin Yvon.

3.3 Viabilidade celular

A avaliação do efeito citotóxico de diferentes concentrações de POH, PA e OUA foi feita através da determinação da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH), liberada no sobrenadante das células danificadas.

Os experimentos foram realizados em placas de cultura celular de 96 poços com concentração de 5×10^4 células por poço utilizando as células U87, U251, VERO e astrócitos de camundongos. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂. Após 24 horas de incubação, as placas foram vertidas e cada poço lavado com PBS. Após a lavagem, foram adicionados em cada poço diferentes concentrações de POH iguais a 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 4,0mM, PA 4,0 mM, OUA 0,5 mM (exceto no período de incubação de 24 horas), DMSO 0,1% (controle negativo) e TRITON X100 0,1% (controle positivo), diluídos em meio DMEM sem soro. As placas foram novamente incubadas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ por 30 minutos ou por 24 horas. Passado o tempo de incubação as placas foram submetidas a uma centrifugação de 200xg durante 4 minutos. O sobrenadante foi removido e transferido para tubos tipo Eppendorf devidamente identificados e estocados sob refrigeração, por no máximo três dias, para posterior dosagem da atividade de LDH liberada. Em seguida, foram adicionados 100µl de TRITON X100 0,1% em cada poço das placas, as quais foram incubadas durante 30 minutos em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. Terminado o período de incubação as placas foram novamente submetidas a uma centrifugação de 200xg por 4 minutos. Os sobrenadantes foram armazenados em microtubos devidamente identificados e estocados sob refrigeração, por no máximo três dias, para posterior dosagem da atividade de LDH intracelular. Para a quantificação da atividade da LDH liberada e intracelular utilizou-se a dosagem colorimétrica (Kit Desidrogenase Láctica - Doles) e a mensuração da absorvância foi realizada a 510 nm em espectrofotômetro (MicroNal B582).

3.4 Detecção da proteína JNK

Placas de cultura celular de 6 poços foram utilizadas com uma concentração de 1×10^6 células/poço (U87, U251, VERO e astrócitos de camundongos) e incubadas por 24 horas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂, para que as células pudessem aderir à placa. Após 24 horas, todo meio de cultura presente na placa foi removido e o tratamento foi realizado com a adição de diferentes concentrações de POH (0,1; 0,5; 1,5 mM) e DMSO 0,1%, diluídas em meio DEMEM/DMEM-F12. Após 30 minutos de incubação a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, todo o conteúdo dos poços foi removido. Em seguida, as drogas foram retiradas e os poços lavados com 1,0 mL de PBS. As placas foram colocadas sobre o gelo e foi adicionado o tampão de lise (170 mM NaCl, 11 mM Tris-HCl, TRITON X-100 1%, coquetel inibidor de protease e fosfatase (Roche)). As células lisadas foram alíquotadas em tubos tipo Eppendorf e mantidas no gelo. Em seguida, o tampão de amostra (6x) (Tris 25 mM, Glicerol 40 mL (85% v/v), SDS 28 mM, β-mercapto etanol 20 mL, 120 mg Azul de bromofenol) foi adicionado e as amostras de células lisadas aquecidas a 100°C por 5 – 10 minutos. Antes da aplicação do tampão de amostras, uma alíquota foi retirada para posterior dosagem de proteínas.

A dosagem de proteínas das amostras foi realizada de acordo com o Método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando albumina bovina como padrão, para que fosse estabelecida uma quantidade fixa de 50 µg de proteína para cada amostra a ser aplicada no gel de eletroforese.

A eletroforese foi feita em gel vertical de bis-acrilamida 10 % (SDS-PAGE). As amostras contendo 50 µg de proteína foram aplicadas em cada poço do gel. Em cada gel foi adicionado padrão de peso molecular (GE) para posterior localização da proteína de interesse. Logo após, as amostras foram submetidas a uma corrida de 2 horas sob a voltagem de 100V utilizando o sistema Mini-PROTEAN® (BIO-RAD).

Terminada a corrida das amostras, as proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose através do sistema de transferência à seco iBlot® 7-Minute Blotting System (Invitrogen).

Após a transferência, a membrana foi bloqueada com tampão tris salina tween20 – TBS/T (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4 ajustado com HCl, tween20 0,1% v/v) acrescido de leite em pó desnatado (5% p/v), sob agitação, por 1 hora e

30 minutos. Em seguida a membrana foi incubada com o anticorpo monoclonal anti-phospho-SAPK/JNK1/2 (Cell Signaling) feito em coelhos, na diluição de 1:1.000 sob agitação e refrigeração por 16 horas. Após este tempo as membranas foram lavadas três vezes com solução de TBS/T, e as proteínas de interesse foram então identificadas pela incubação da membrana por 1 hora e 30 minutos com o anticorpo secundário contra coelho (KPL), conjugado à enzima peroxidase, feito em cabras, na diluição de 1:20.000. Os anticorpos (primário e secundário) foram diluídos em solução bloqueadora (TBS/T acrescido de 5% de leite).

Após a detecção da proteína de interesse (ver próximo parágrafo), a membrana contendo proteínas foi lavada com TBS/T e incubada por 16 horas com o anticorpo policlonal anti-SAPK/JNK1/2 (Cell Signaling), na diluição de 1:1000 sob agitação e refrigeração. Todos os procedimentos seguintes, como lavagem e diluição do anticorpo secundário, foram feitos de acordo com as condições estabelecidas para a incubação anterior.

A detecção das proteínas de interesse foi feita com o Kit Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent (GE) e a membrana exposta ao filme de autoradiografia (Hyperfilm ECL - GE). Os resultados foram analisados pelo programa Image Master 2D Elite 4.01 (GE) em que as bandas foram digitalizadas e analisadas por tamanho e intensidade.

3.5 Tratamento com dasatinibe e metil β -ciclodextrina

Para o pré-tratamento, as células U87 foram semeadas em placas de cultura celular de 6 poços com uma concentração de 1×10^6 células/poço e incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, para que as células pudessem aderir à placa. Após 24 horas, todo meio de cultura presente na placa foi removido e o pré-tratamento foi realizado com a adição de meio de cultura puro, metil β -ciclodextrina 7,5 mM (diluída diretamente em meio de cultura - Sigma), dasatinibe 10 nM (previamente diluído em DMSO – LC laboratories). Após 30 minutos de incubação a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, todo o conteúdo dos poços foi removido e as células seguiram para o tratamento com POH conforme o item anterior.

3.6 Dosagem de citocinas

Placas de cultura celular de 24 poços foram preparadas com as células U87 e U251 na concentração de 3×10^5 células/poço e incubadas por 24 horas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂, para que as células pudessem aderir à placa. Após 24 horas, todo meio de cultura presente na placa foi removido e o tratamento foi realizado com a adição de POH (0,5 e 1,5 mM), DMSO 0,1% ou com os controles positivos (LPS 5 µg/mL e OUA 1 µM) por 1, 6 e 24 horas, diluídos em meio DEMEM/DMEM-F12. Após os períodos de incubação a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, as placas foram centrifugadas (200xg – 10 minutos), os sobrenadantes coletados e armazenados a -20°C.

As dosagens das citocinas IL-1β, IL-6, IL-8 e TNFα foram realizadas através da técnica de ELISA, utilizando-se anticorpos monoclonais específicos e exatamente de acordo com as instruções do fabricante dos kits (R&D System).

3.7 Tratamento com inibidor de JNK V e detecção de apoptose

Para relacionarmos a apoptose induzida pelo POH com a ativação via da JNK, células das linhagens de GBM humano U87 e U251 foram pré-tratadas com o inibidor da ativação de JNK1/2/3 (1,3-Benzotiazol-2-il-(2-((2-(3-piridinil)etil)amino)-4-pirimidinil)acetoneitrila), chamado de inibidor JNK V, antes do tratamento com POH.

No pré-tratamento, as células U87 e U251 foram semeadas em placas de cultura celular de 24 poços com uma concentração de $2,5 \times 10^5$ células/poço e incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, para que as células pudessem aderir à placa. Após 24 horas, todo meio de cultura presente na placa foi removido e o pré-tratamento foi realizado com a adição de meio de cultura puro e 0,5 µM de inibidor de JNK V (previamente diluído em DMSO). Após 30 minutos de incubação a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, todo o conteúdo dos poços foi removido e o tratamento foi realizado com a adição de DMSO 0,1%, DMSO 0,1% em conjunto com inibidor de JNK V 0,5 µM, POH 1,5 mM e POH 1,5 mM em conjunto com inibidor de JNK V 0,5 µM, diluídos em meio DEMEM/DMEM-F12. Após 24 horas de incubação a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, as placas foram centrifugadas a 200xg por 10 minutos e as células foram lavadas com PBS/EDTA. Após esta etapa,

as células foram destacadas pela adição de 200 µL de tripsina 0,25% diluída em 10x em PBS/EDTA. Para paralisar a ação da tripsina, foi adicionado 300 µL da solução de albumina bovina em PBS (5% p/v). Em seguida, células foram centrifugadas a 200xg por 10 minutos e lavadas com PBS gelado. As células foram suspensas em 100 µL de tampão de ligação de anexina (puro, só com anexina V-FITC, só com iodeto de propídio (IP) ou com anexina V-FITC + IP) segundo as especificações do kit de detecção de apoptose TACS Annexin V-FITC (R&D Systems) e incubadas por 15 minutos protegidas da luz e em temperatura ambiente. Por último, foi adicionado 400 µL de tampão de ligação de anexina (puro) e as amostras foram avaliadas em citômetro de fluxo BD Accuri C6 (BD Biosciences) e as análises foram realizadas com o programa do próprio aparelho (BD Accuri software), a partir de 10.000 eventos (células) adquiridos.

3.8 Análise estatística

A análise estatística, assim como os gráficos foram feitos utilizando-se o Programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad software Inc. EUA). A existência de diferenças significativa entre dois grupos foi testada pelo teste de *t* de *Student*. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeito do POH e do PA na atividade da Na⁺, K⁺-ATPase

O álcool perílico (POH), monoterpeneo substancialmente encontrado em diversos vegetais, apresenta a capacidade de induzir apoptose em células de câncer (Xu, *et al.*, 2004; Fernandes, *et al.*, 2005; Yeruva *et al.*, 2007; Chaudary *et al.*, 2009) e é utilizado na terapia de diferentes neoplasias, incluindo os gliomas (Da Fonseca *et al.*, 2006a; 2006b; 2008 e 2011). Estes efeitos causados pelo POH podem estar, pelo menos em parte, relacionados com a inibição da atividade da Na⁺, K⁺-ATPase, já que este monoterpeneo é um inibidor desta enzima (Garcia *et al.*, 2010; Duelund *et al.*, 2012).

Como primeiro passo no estudo da propriedade inibitória do POH sobre a proliferação de células de glioma, nós avaliamos a atividade da Na⁺, K⁺-ATPase em células tumorais e não tumorais baseando-se na incorporação de Rb⁺ pelas células na ausência e na presença de OUA 0,5 mM. A utilização de Rb⁺ não radioativo tem se mostrado reprodutível em substituir o K⁺ e sensível para a determinação da atividade enzimática (Gill *et al.*, 2004; Dos Santos *et al.*, 2009; Garcia *et al.*, 2010).

A atividade da Na⁺, K⁺-ATPase presente nas células foi inibida pelo POH (0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 3,0 e 4,0 mM), de maneira dose dependente, durante 30 minutos de incubação (Figura 4.1).

As concentrações capazes de inibir em 50% (IC₅₀) a atividade enzimática nas linhagens de GBM humano U251 e U87 foram semelhantes (1,8 mM e 2,0 mM, respectivamente) e bem próximos ao valor (1,5 mM), anteriormente encontrado pelo nosso grupo utilizando outra linhagem de células de GBM humano, a A172 (Garcia *et al.*, 2010). Nestas três linhagens de GBM humano, o POH inibiu totalmente a captação de Rb⁺ na concentração de 4,0 mM.

Para a linhagem não tumoral VERO, o valor foi ligeiramente mais elevado (2,4 mM) e não alcançou 100% de inibição com 4,0 mM. Entretanto, esta diferença nos valores de IC₅₀ não foi significativamente diferente, o que era de se esperar, uma vez que células renais e de GBM expressam a mesma isoforma da subunidade α da

Na⁺, K⁺-ATPase, a isoforma α_1 (Blanco, 2005; Mijatovic *et al.*, 2007b), pela qual o POH apresenta um maior grau de seletividade (Garcia *et al.*, 2010).

Além de utilizarmos a célula VERO para avaliarmos comparativamente o efeito do POH entre as células tumorais e não tumorais, utilizamos astrócitos de camundongos, dada a dificuldade em utilizar culturas humanas de células astrocíticas não tumorais. O IC₅₀ do POH para essas células foi de 1,4 mM e a captação de Rb⁺ foi completamente inibida já na concentração de 2,0 mM. Isto pode ser explicado pelo fato destas células expressarem, principalmente, as isoformas α_2 e α_3 da Na⁺, K⁺-ATPase, as quais são mais sensíveis ao efeito inibitório do POH (Blanco, 2005; Garcia *et al.*, 2010).

O efeito do ácido perílico (PA), o principal metabólito produzido rapidamente no organismo humano após administração de POH também foi verificado (Figura 4.2).

O PA não mostrou nenhum efeito sobre a atividade da Na⁺, K⁺-ATPase presente nas células avaliadas, mesmo na alta concentração de 4,0 mM. De fato, este resultado não foi surpresa porque, anteriormente, o PA na concentração de 5 mM mostrou menos de 20% de inibição sobre a atividade da Na⁺, K⁺-ATPase purificada a partir de rim e cérebro de cobaia (Garcia *et al.*, 2010).

As doses de POH aplicadas a pacientes em condições experimentais variam na faixa de gramas/m² de superfície corporal por dia, em várias doses, por via oral (Azzoli *et al.*, 2003) e na ordem de 220 mg/dia, divididos em 4 doses por via intranasal (Da Fonseca *et al.*, 2008). No entanto, os baixos valores plasmáticos de POH não podem ser medidos com precisão, apenas os níveis de seus metabólitos (PA e ácido diidroperílico) são detectáveis, talvez em função da rápida degradação do POH (Bailey *et al.* 2004). Desta forma, é vantajosa a sua administração em relação aos glicosídeos cardíacos, pois a sua rápida metabolização diminuiria os efeitos adversos indesejáveis na função cardíaca. É curioso notar que as doses terapêuticas usadas de POH são bastante superiores às usadas para glicosídeos cardíacos, com a mesma finalidade (López-Lázaro *et al.*, 2005).

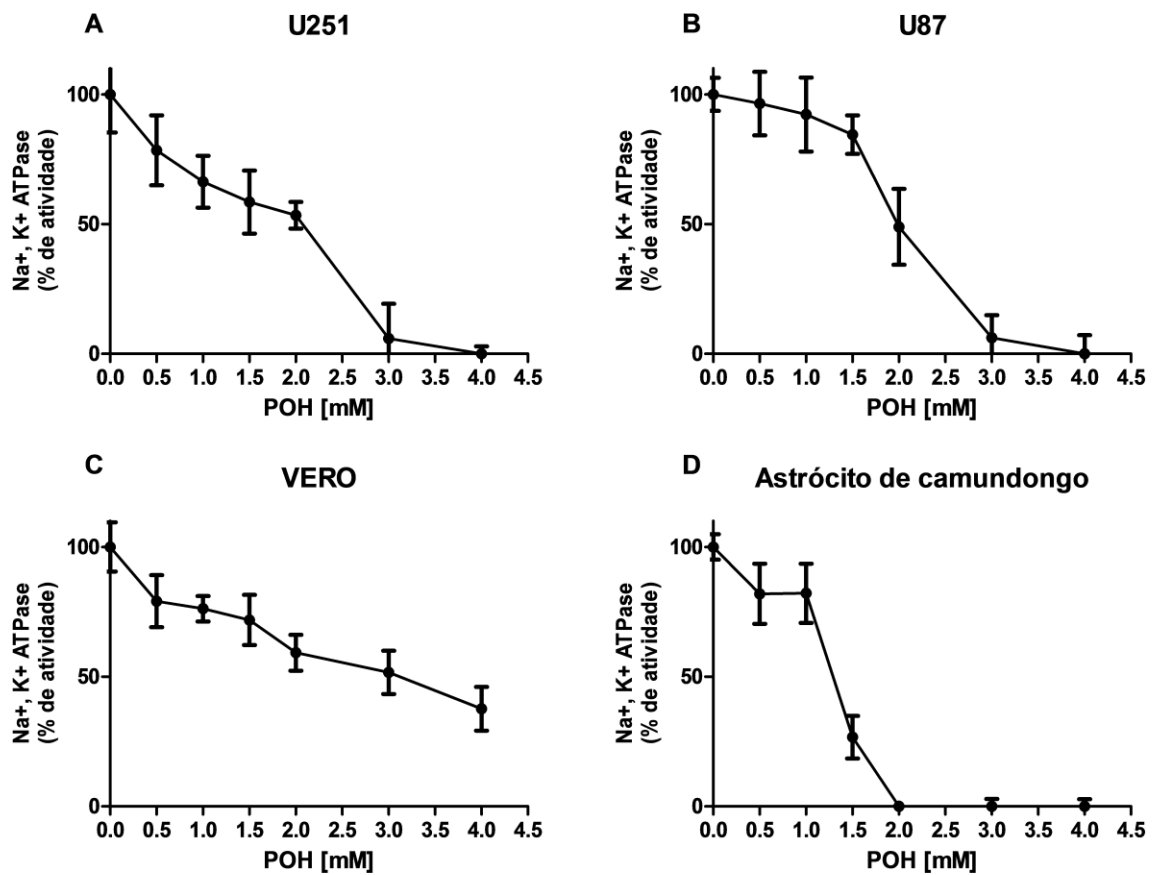


Figura 4.1: Efeito do POH sobre a atividade da Na⁺, K⁺-ATPase presente nas células das linhagens (A) U251, (B) U87, (C) VERO e (D) nos astrócitos de camundongo. As células foram tratadas com POH (0,5 – 4,0 mM) por 30 minutos. A atividade foi a diferença entre a incorporação de Rb⁺ em ausência e presença de 0,5 mM de ouabaína. Cada ponto é a média ± DP de, pelo menos, quatro experimentos diferentes em triplicata.

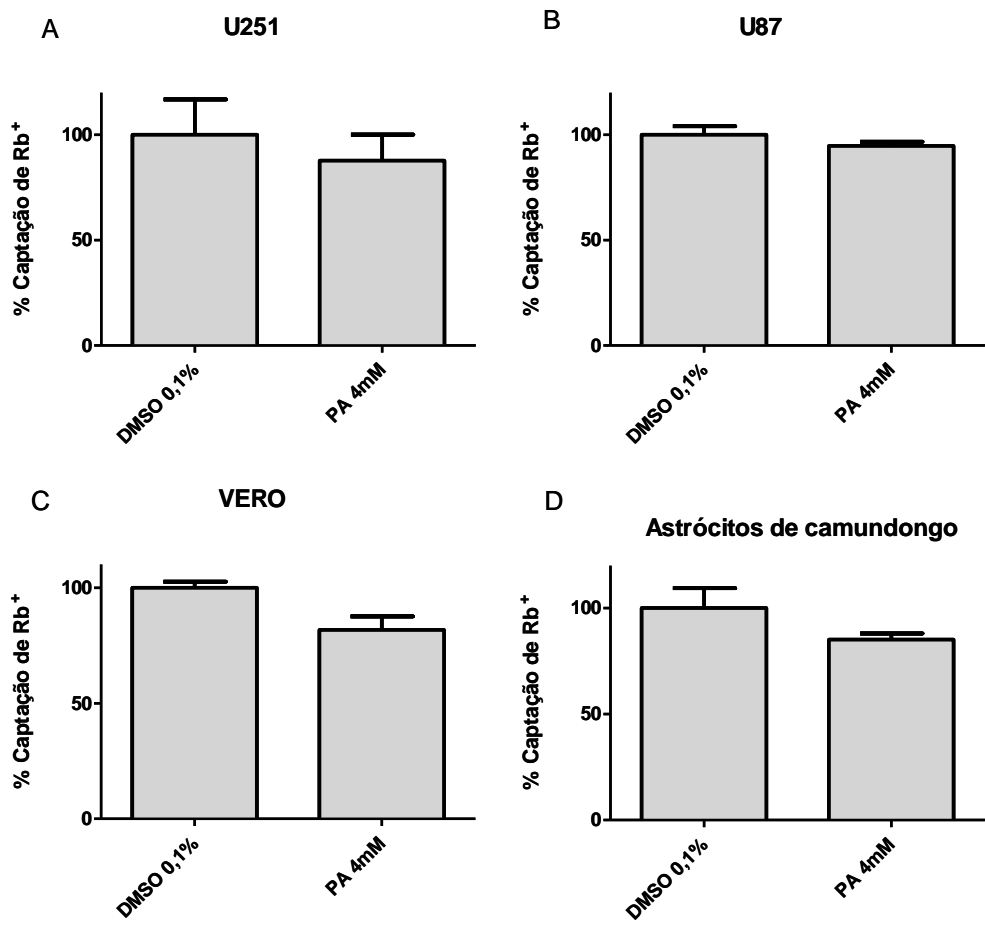


Figura 4.2: Efeito do PA sobre a captação de Rb⁺ pelas células das linhagens (A) U251, (B) U87, (C) VERO e (D) astrócitos de camundongo. As células foram tratadas com PA (4,0 mM) por 30 minutos. Nenhuma diferença significativa foi observada. Os valores são a média ± DP de, pelo menos, quatro experimentos diferentes em triplicata.

4.2 Efeito citotóxico do POH, do PA e da OUA em 30 minutos

Para averiguarmos se o efeito da inibição (total ou parcial) da captação de Rb^+ pelas células (U251, U87, VERO e de astrócitos de camundongo) foi real ou se foi provocada pela morte celular, foi realizada a avaliação da viabilidade celular. As células foram incubadas por 30 minutos, em presença de diferentes concentrações de POH, PA e ouabaína (OUA). A morte celular foi determinada pela medida da atividade da enzima LDH liberada no sobrenadante das culturas tratadas e não tratadas.

O POH só diminuiu significativamente a viabilidade celular na concentração de 4,0 mM (Figura 4.3), mostrando que a redução na captação de Rb^+ deve ter ocorrido através da inibição da atividade da Na^+ , K^+ ATPase, e não devido a morte destas células.

Da mesma forma, a OUA (Figura 4.4) e o PA (Figura 4.5), nas concentrações usadas (0,5 mM e 4,0 mM, respectivamente), não promoveram alteração na viabilidade celular.

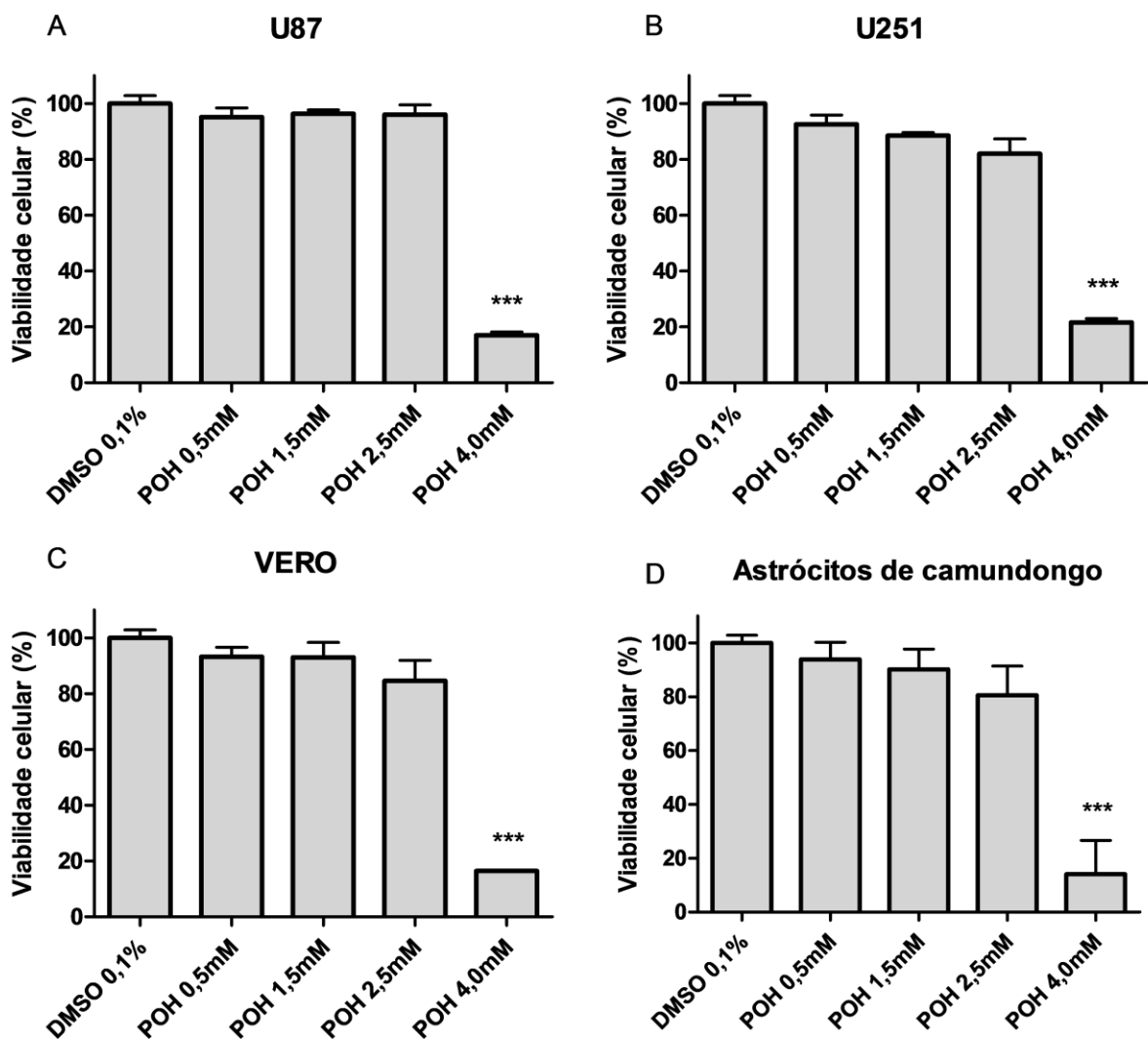


Figura 4.3: Efeito do POH sobre a viabilidade das células das linhagens (A) U251, (B) U87, (C) VERO e (D) dos astrócitos de camundongo. As células foram tratadas com POH (0,5 – 4,0 mM) por 30 minutos e a atividade da LDH liberada foi quantificada. Cada ponto é a média \pm DP de, pelo menos, três experimentos diferentes. *** $p < 0,001$ vs. o grupo controle (DMSO 0,1%).

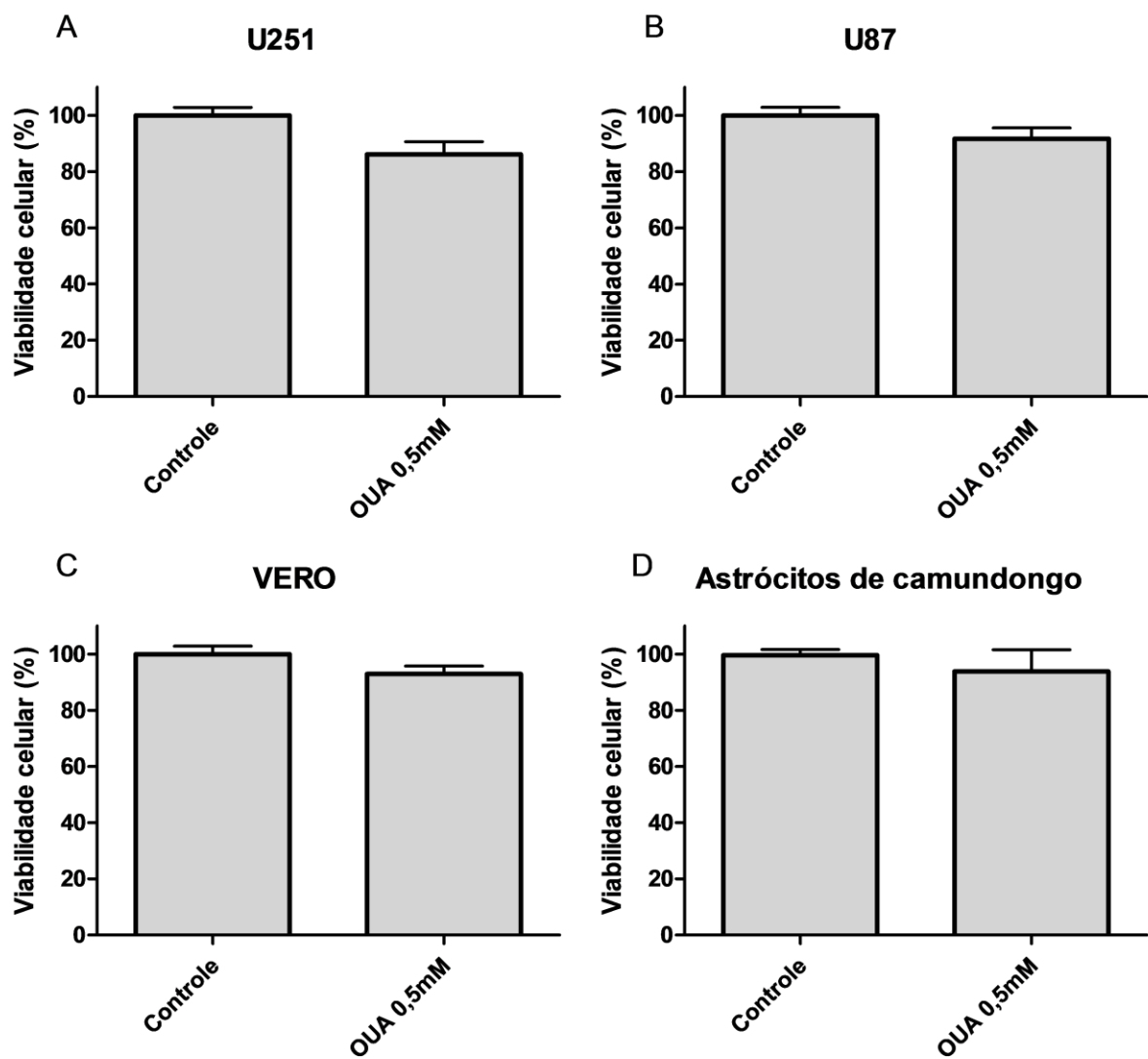


Figura 4.4: Efeito da ouabaína sobre a viabilidade das células das linhagens (A) U251, (B) U87, (C) VERO e (D) dos astrócitos de camundongo. As células foram tratadas com OUA (0,5 mM) por 30 minutos e a atividade da LDH liberada foi quantificada. Nenhuma diferença significativa foi observada. Cada ponto é a média \pm DP de, pelo menos, três experimentos diferentes.

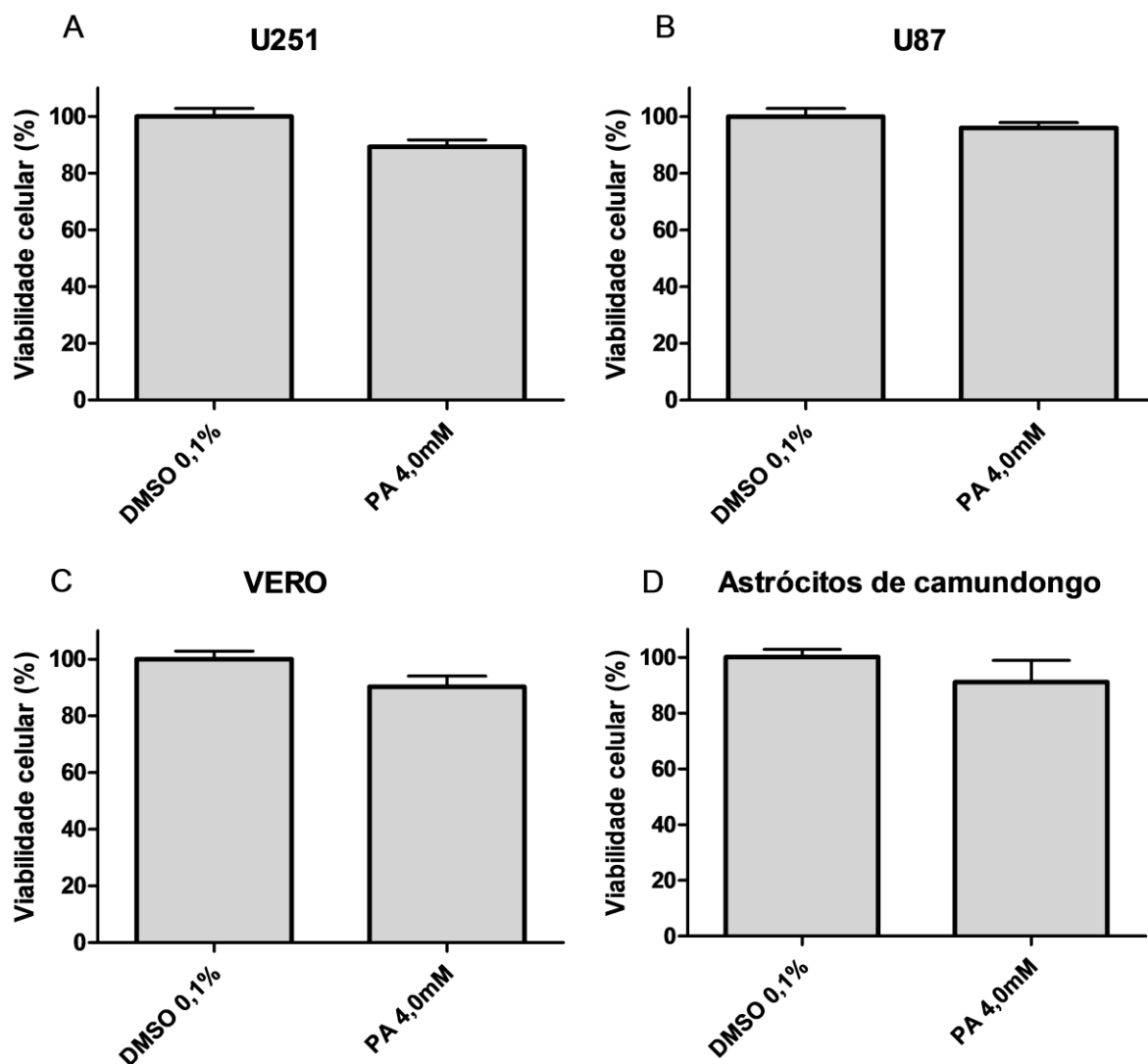


Figura 4.5: Efeito do PA sobre a viabilidade das células das linhagens (A) U251, (B) U87, (C) VERO e (D) dos astrócitos de camundongo. As células foram tratadas com PA (4,0 mM) por 30 minutos e a atividade da LDH liberada foi quantificada. Nenhuma diferença significativa foi observada. Cada ponto é a média \pm DP de, pelo menos, três experimentos diferentes.

4.3 Efeito citotóxico do POH e do PA em 24 horas

Estudos sugerem que novos agentes anticâncer baseados na Na⁺, K⁺-ATPase possam ser desenvolvidos. Desta forma, compostos semelhantes ou não aos glicosídeos cardíacos, capazes de afetar a atividade da Na⁺, K⁺-ATPase, tiveram suas propriedades citotóxicas testadas (Ahmed *et al.*, 2009; Felth *et al.*, 2009; Mijatovic *et al.*, 2009; Iyer *et al.*, 2010; Heasley, 2012; Babula *et al.*, 2013).

Para analisarmos o efeito citotóxico do POH e do PA, as células de GBM humano (U251 e U87) e as não tumorais (VERO e astrócitos de camundongo) foram tratadas por um período de 24 horas, com diferentes concentrações de POH (0,5, 1,5, 2,5 e 4,0 mM) e com uma alta concentração de PA (4,0 mM). A viabilidade celular foi mensurada através da atividade da enzima LDH liberada no sobrenadante das culturas tratadas com POH e PA.

Como mostrado na Figura 4.6, o POH apresentou potencial citotóxico sobre todas as linhagens de células utilizadas neste estudo.

Tanto as células tumorais quanto às células não tumorais tiveram sua viabilidade significativamente diminuída já na concentração de 0,5 mM e de acordo com o aumento na dose de POH, comparado com as células tratadas com o veículo (DMSO 0,1%). A concentração de POH capaz de inibir a proliferação das células em 50% (IC₅₀) foi calculada e não foi significativamente diferente entre os tipos celulares. Na média, o IC₅₀ foi de 1,2 mM ± 0,24. Nas células VERO o IC₅₀ foi de 0,9 mM e nos astrócitos de camundongo o IC₅₀ foi de 1,4 mM. Nas linhagens de GBM humano o IC₅₀ foi de 1,4 e 1,1 mM para as células U251 e U87, respectivamente. Resultados semelhantes foram obtidos por Cho e colaboradores (2012), onde o IC₅₀ foi na faixa de 1,6 – 1,8 mM de POH, utilizando as linhagens U87, U251 e a LN229 (uma outra linhagem de células de glioma humano), mesmo tendo utilizado metodologia diferente.

No entanto, o PA (Figura 4.7) diminuiu a viabilidade destas células com menor intensidade em comparação com o POH.

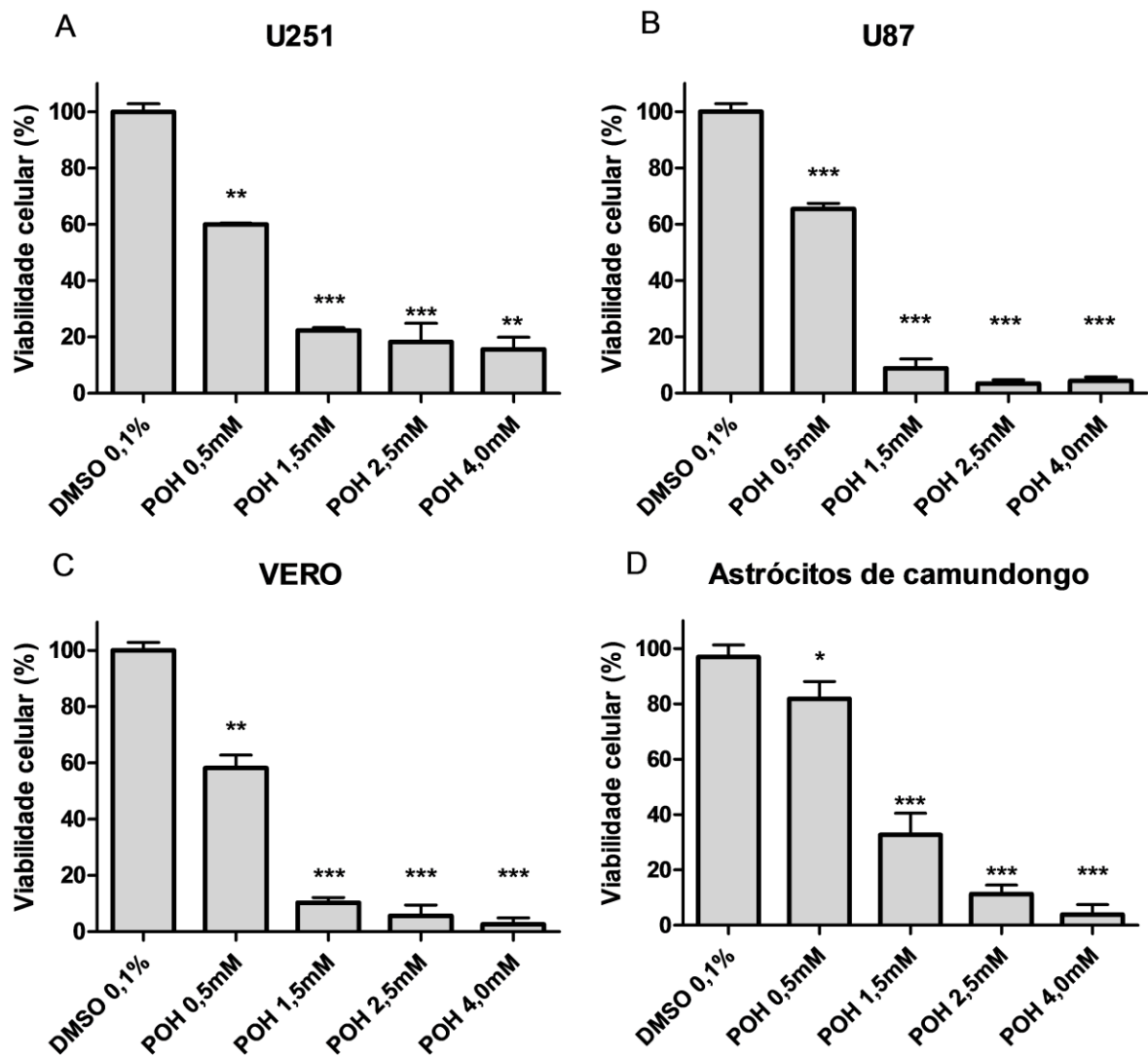


Figura 4.6: Efeito do POH sobre a viabilidade das células das linhagens (A) U251, (B) U87, (C) VERO e (D) dos astrócitos de camundongo. As células foram tratadas com POH (0,5 – 4,0 mM) por 24 horas e a atividade da LDH liberada foi quantificada. Cada ponto é a média \pm DP de, pelo menos, três experimentos diferentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. o grupo controle (DMSO 0,1%).

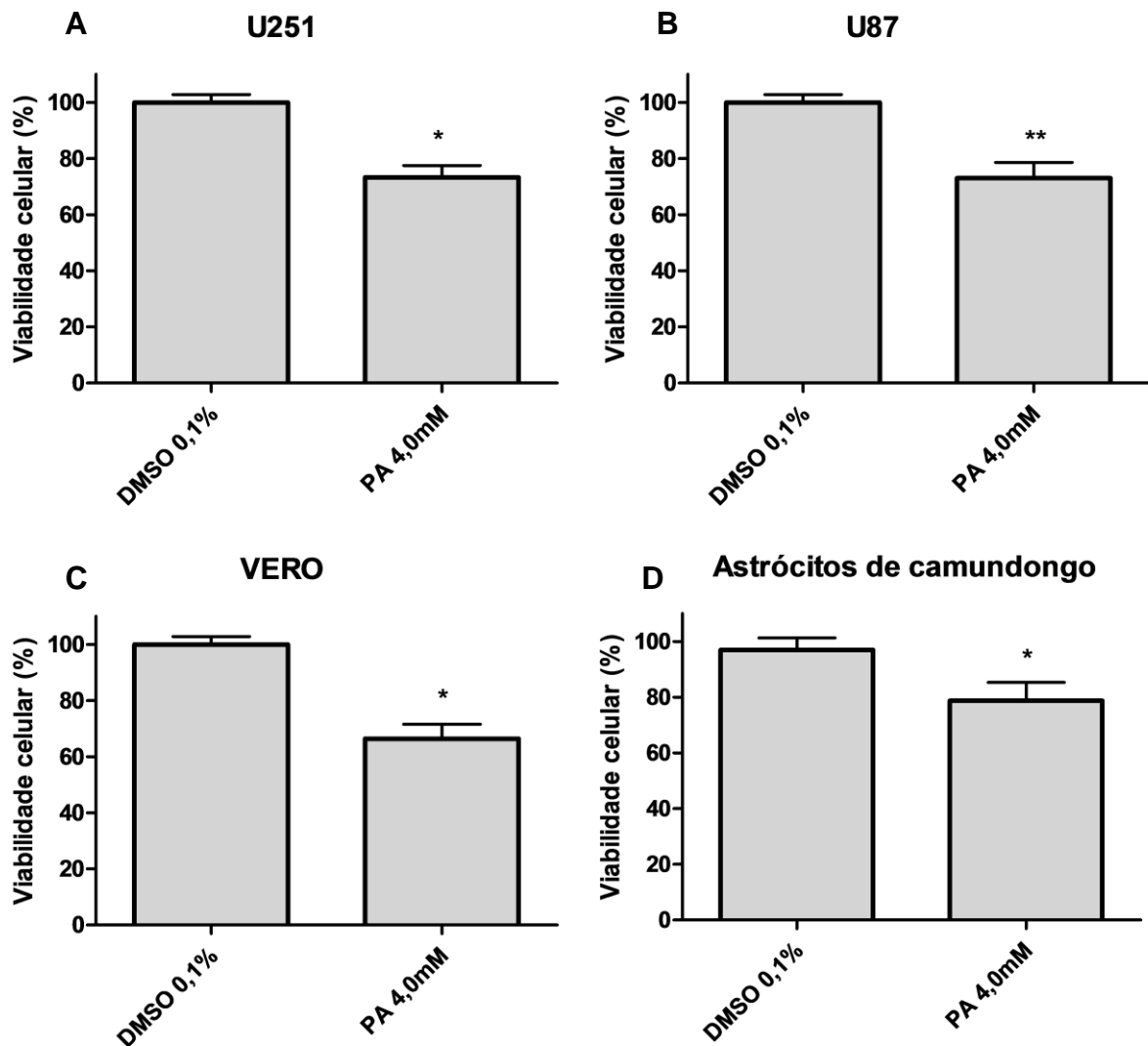


Figura 4.7: Efeito do PA sobre a viabilidade das células das linhagens (A) U251, (B) U87, (C) VERO e (D) dos astrócitos de camundongo. As células foram tratadas com PA (4,0 mM) por 24 horas e a atividade da LDH liberada foi quantificada. Cada ponto é a média \pm DP de, pelo menos, três experimentos diferentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs. o grupo controle (DMSO 0,1%).

4.4 Efeito do POH na ativação da proteína JNK

Devido a sua atuação na sinalização celular, modulando funções celulares fundamentais como proliferação, diferenciação e apoptose, a Na⁺, K⁺-ATPase tem sido vista como um alvo para drogas, em especial, para aquelas com atividade antitumoral (Kometiani *et al.*, 2005; Aperia, 2007; Babula, 2013).

Diversos trabalhos tem relacionado a ação de glicosídeos cardíacos com a indução de apoptose em diferentes células tumorais (Haux, 1999; López-Lázaro *et al.*, 2005; Mijatovic *et al.*, 2007a; Prassas e Diamandis *et al.*, 2008; Ark *et al.*, 2010; Cerella *et al.*, 2013). Estes dados abrem espaço para que outras substâncias, que alterem a atividade da Na⁺, K⁺-ATPase, possam ser avaliadas quanto a ativação de vias de sinalização que levam à apoptose.

Neste ponto, é importante enfatizar que o POH induz a apoptose em diferentes células tumorais, incluindo as células de glioma. No entanto, o exato mecanismo de ação desta droga é desconhecido (Rajesh *et al.*, 2003; Fernandes *et al.*, 2005). Por outro lado, o POH é um inibidor que apresenta certa especificidade especialmente para a isoforma α_1 da Na⁺, K⁺ ATPase (Garcia *et al.*, 2010) e sabe-se que nos glioblastomas existe uma super-expressão desta isoforma, situada na estrutura das cavéolas, atuando como moduladora nos mecanismos que levam à apoptose, migração e proliferação celular (Lefranc *et al.*, 2008; Lefranc e Kiss, 2008).

Considerando os fatos já discutidos, verificamos através da técnica de *western blot* a ativação da JNK, uma das principais proteínas da via das MAPKs que comandam o crescimento e/ou a morte celular (Uddin *et al.*, 2008).

As células de GBM humano da linhagem U87 foram tratadas por 30 minutos com crescentes doses de POH (0,1, 0,5 e 1,5 mM). Os resultados mostram que o POH aumentou a p-JNK1/2 nestas células de maneira dependente da concentração (Figura 4.8).

O mesmo tratamento foi dado às células de GBM humano da linhagem U251, porém os experimentos foram realizados com o POH nas concentrações de 0,5 e 1,5 mM, já que a concentração de 0,1 mM não produziu nenhum efeito significativo na linhagem U87. No entanto, nestas células o POH aumentou significativamente a

expressão de p-JNK1/2 somente na concentração de 1,5 mM (Figura 4.9).

Resultados similares aos encontrados com as células U251 foram obtidos com o uso de astrócitos de camundongo, onde somente a concentração de 1,5 mM de POH aumentou significativamente a ativação da JNK1/2 (Figura 4.10).

Já em relação às células VERO, o POH não aumentou significativamente a p-JNK1/2 (Figura 4.11).

Estudos com fibroblastos tem revelado que a JNK ativada é suficiente para provocar a liberação de citocromo *c* independente de caspase e dar sequência a apoptose, sendo apenas requisitada a proteína pró-apoptótica Bax, membro da família Bcl2 (Lei *et al.*, 2002). Adicionalmente, o POH aumenta a expressão de Bax em células de câncer de pulmão de células não pequenas (Yeruva *et al.*, 2007; Chaudhary *et al.*, 2009).

Embora a fosforilação da JNK pelo POH ainda não tenha sido descrita, Satomi e colaboradores (1999) mostraram que o POH induz aumento na expressão e na fosforilação da proteína c-Jun (envolvida na proliferação e apoptose celular) em células de câncer de mama. Esta fosforilação ocorreu de maneira rápida e no sítio N-terminal normalmente fosforilado pela JNK. Segundo estes pesquisadores, a ativação de c-Jun pelo POH nestas células pode representar uma resposta precoce pertinente a apoptose. Desta maneira, o POH parece modular a cascata de sinalização da JNK (Satomi *et al.*, 1999).

Com relação à ativação de JNK em células de GBM humano, foi recentemente reportado que a piperlongumine, um alcalóide com propriedades lipofílicas, naturalmente encontrado em plantas da espécie da *Piper longum L.* pode ativar as MAPKs JNK e p-38 levando à apoptose as células de GBM das linhagens U87, LN229 e 8MG-BA através do acúmulo de espécies reativas de oxigênio (Liu *et al.*, 2013).

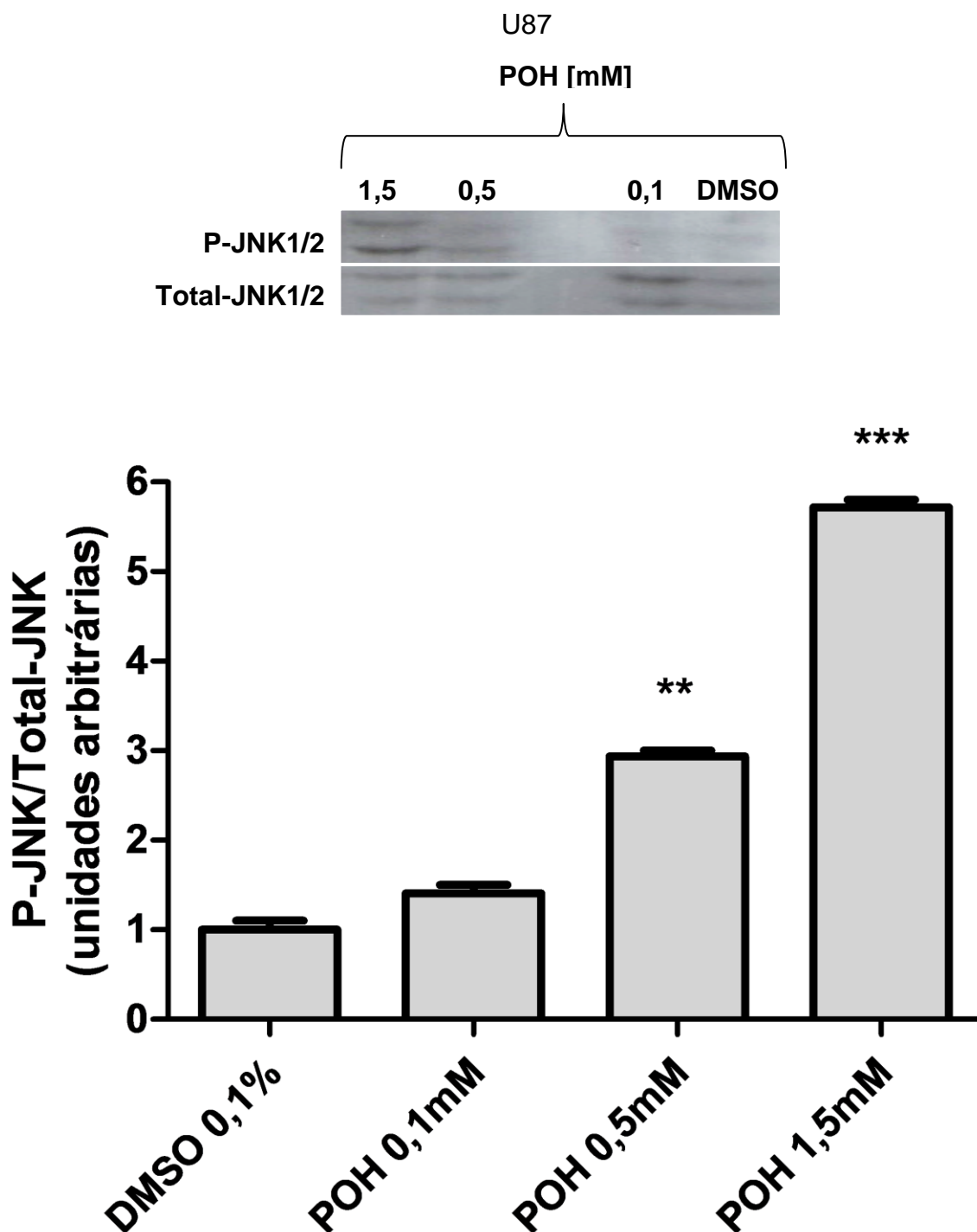


Figura 4.8: Efeito do POH sobre a ativação da proteína JNK1/2 em células U87. As células foram tratadas com POH (0,1; 0,5 e 1,5 mM) por 30 minutos. O gráfico mostra a análise densitométrica da JNK1/2 fosforilada (p-JNK) relativa à JNK1/2 total e está representado em unidades arbitrárias pela razão entre a densidade das bandas de western blotting para p-JNK1/2 e JNK1/2 total corrigidas pelo controle. A figura é representativa de 3 experimentos independentes. O gráfico representa a média \pm DP de, pelo menos, três experimentos diferentes. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. o grupo controle (DMSO 0,1%).

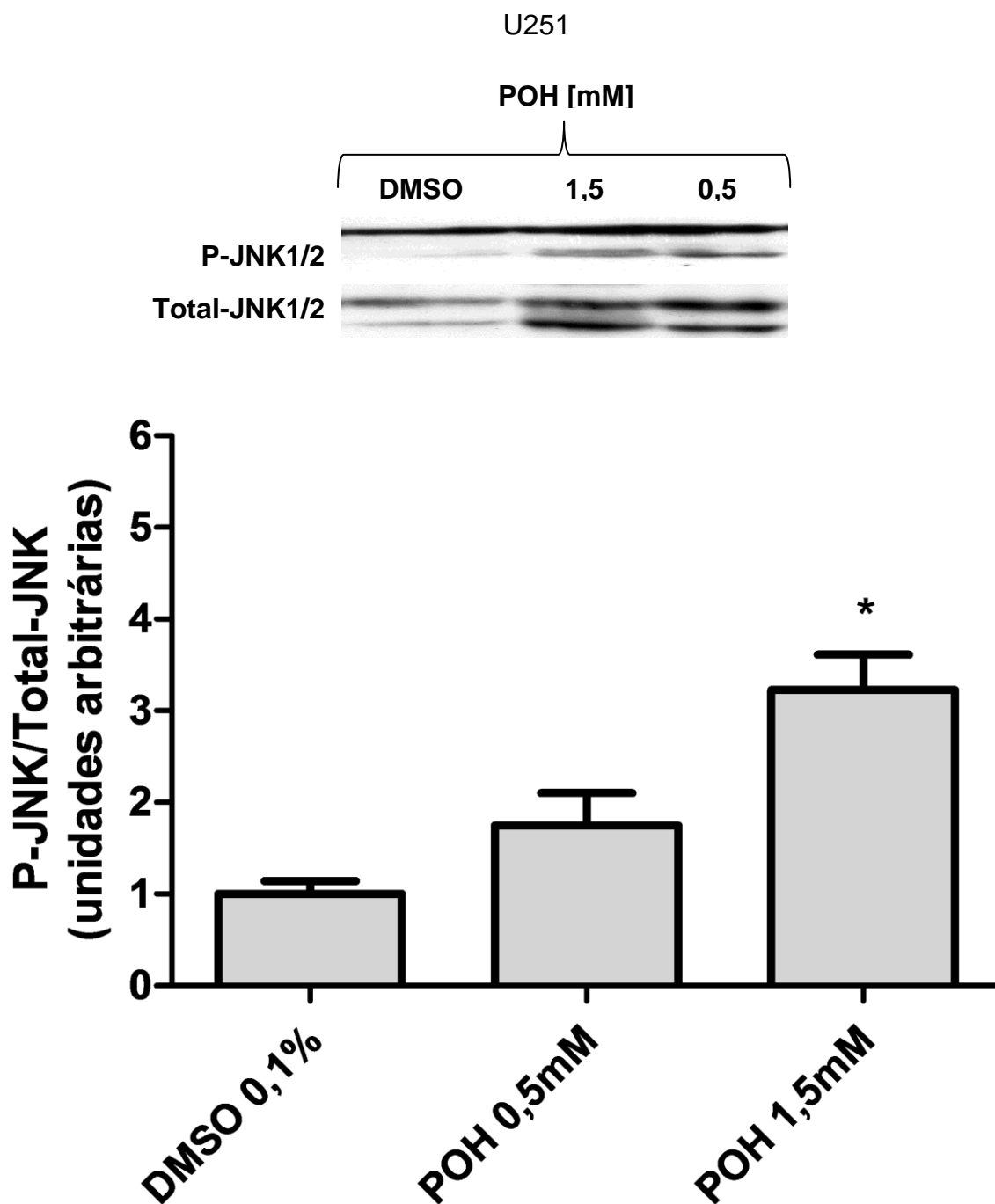


Figura 4.9: Efeito do POH sobre a ativação da proteína JNK1/2 em células U251. As células foram tratadas com POH (0,5 e 1,5 mM) por 30 minutos. O gráfico mostra a análise densitométrica da JNK1/2 fosforilada (p-JNK) relativa à JNK1/2 total e está representado em unidades arbitrárias pela razão entre a densidade das bandas de western blotting para p-JNK1/2 e JNK1/2 total corrigidas pelo controle. A figura é representativa de 3 experimentos independentes. O gráfico representa a média \pm DP de, pelo menos, três experimentos diferentes. * $p < 0,05$ vs. o grupo controle (DMSO 0,1%).

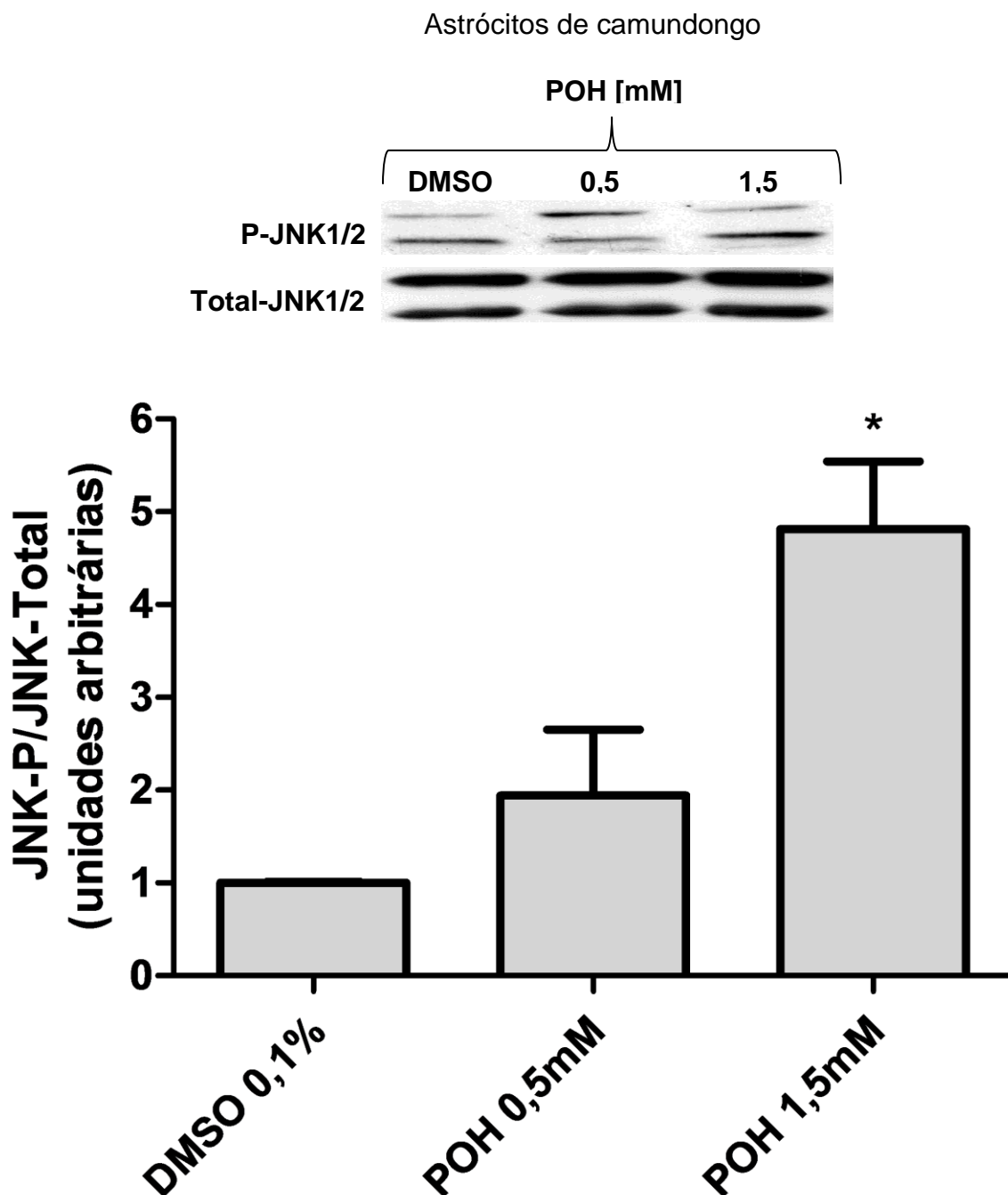


Figura 4.10: Efeito do POH sobre a ativação da proteína JNK1/2 em astrócitos de camundongo. As células foram tratadas com POH (0,5 e 1,5 mM) por 30 minutos. O gráfico mostra a análise densitométrica da JNK1/2 fosforilada (p-JNK) relativa à JNK1/2 total e está representado em unidades arbitrárias pela razão entre a densidade das bandas de western blotting para p-JNK1/2 e JNK1/2 total corrigidas pelo controle. A figura é representativa de 3 experimentos independentes. O gráfico representa a média \pm DP de, pelo menos, três experimentos diferentes. * $p < 0,05$ vs. o grupo controle (DMSO 0,1%).

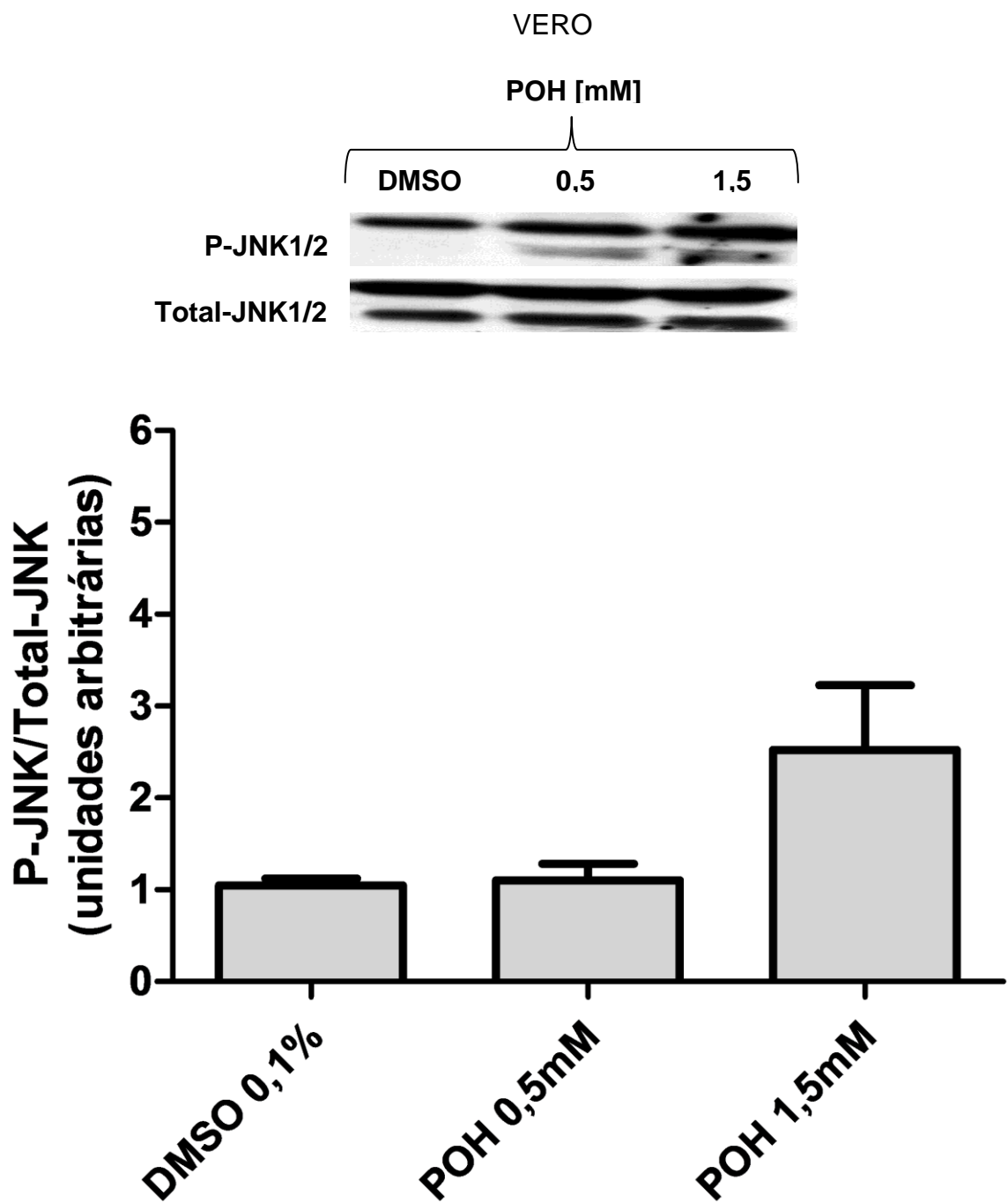


Figura 4.11: Efeito do POH sobre a ativação da proteína JNK1/2 em células VERO. As células VERO foram tratadas com POH (0,5 e 1,5 mM) por 30 minutos. O gráfico mostra a análise densitométrica da JNK1/2 fosforilada (p-JNK) relativa à JNK1/2 total e está representado em unidades arbitrárias pela razão entre a densidade das bandas de western blotting para p-JNK1/2 e JNK1/2 total corrigidas pelo controle. A figura é representativa de 3 experimentos independentes. O gráfico representa a média \pm DP de, pelo menos, três experimentos diferentes.

4.5 Efeito da metil β -ciclodextrina e do dasatinibe na ativação da proteína JNK

A sinalização celular mediada pela Na^+ , K^+ -ATPase é inicializada nas cavéolas, subfrações da membrana plasmática ricas em colesterol e esfingomiéline, onde a subunidade α_1 desta enzima interage com diferentes proteínas sinalizadoras, principalmente com a Src que é a responsável pela comunicação entre a Na^+ , K^+ -ATPase e outras proteínas. Com o complexo Na^+ K^+ -ATPase-Src ativado, diferentes vias de sinalização são iniciadas de forma específica dependendo do estímulo e do tipo celular, dentre elas, a via das MAPKs (Xie e Cai, 2003; Reinhard *et al.*, 2013).

Para relacionarmos a fosforilação da JNK induzida pelo POH com a Na^+ , K^+ ATPase, avaliamos esta ativação da JNK na presença do dasatinibe, um inibidor da proteína c-Src e de outros membros da família Src quinase (Ahluwalia *et al.*, 2010), e da metil β -ciclodextrina, um depletor de colesterol da membrana celular (Giltaire *et al.*, 2011), no intuito de bloquear a via desta MAPK no sinalossoma, microdomínio da cavéola onde ocorre a formação do complexo Na^+ , K^+ -ATPase-Src.

As células de GBM humano da linhagem U87 foram selecionadas para este experimento por terem apresentado maior ativação de JNK, quando tratadas com o POH, em comparação com as outras linhagens de células utilizadas neste trabalho.

As células foram pré-tratadas por 30 minutos com 7,5 mM de metil β -ciclodextrina ou com 10 nM de dasatinibe. Controles sem pré-tratamento também foram realizados. Posteriormente, o tratamento foi realizado, onde as células foram incubadas com DMSO 0,1% ou com 1,5 mM de POH durante 30 minutos e a expressão e a fosforilação da JNK1/2 foi detectada por *western blot*.

O efeito inicialmente provocado pelo POH na ativação da JNK1/2 foi significativamente reduzido pelo dasatinibe, através da inibição da família Src quinase, e pela depleção de colesterol, utilizando a metil β -ciclodextrina (Figura 4.12). Os dois tratamentos parecem impedir a ativação da Na^+ , K^+ ATPase no sinalossoma. Estes resultados fortalecem nossa hipótese de que a Na^+ , K^+ ATPase esteja diretamente envolvida nos mecanismos que levam à ativação da JNK pelo POH em células de GBM humano, disparando a morte celular através da ativação da Na^+ , K^+ ATPase no sinalossoma. Juntos, estes resultados mostram que a Na^+ , K^+ -ATPase pode estar envolvida nos mecanismos que levam à ativação da JNK, pelo POH, em células de GBM humano (Figura 4.12).

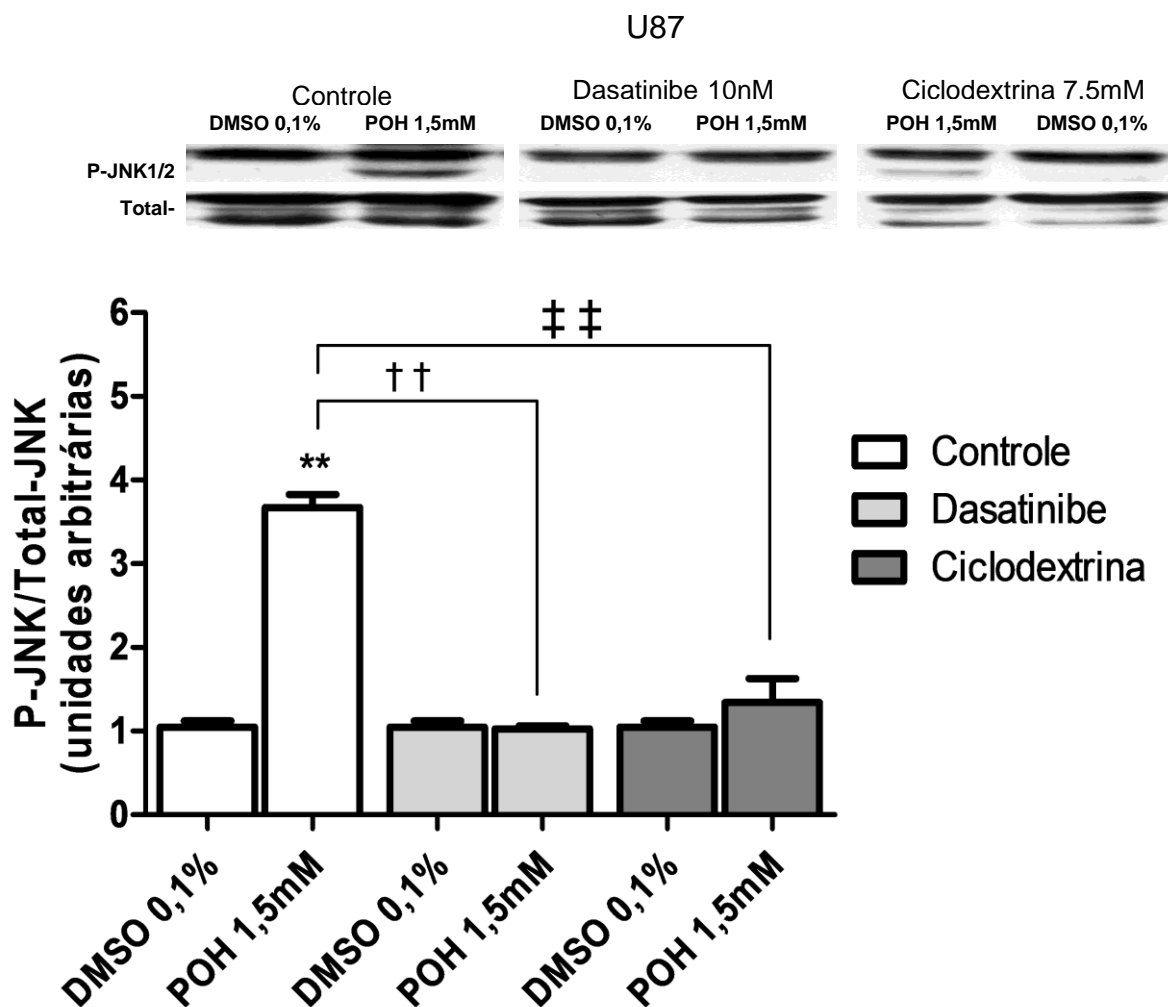


Figura 4.12: Efeito do dasatinibe e da metil β -ciclodextrina na ativação da proteína JNK pelo POH em células U87. As células foram pré-tratadas com 10 nM de dasatinibe e 7,5 mM de metil β -ciclodextrina por 30 minutos. Após o pré-tratamento, DMSO (0,1%) ou POH (1,5 mM) foram adicionados. Passados 30 minutos de incubação, a expressão de JNK1/2 e p-JNK1/2 foi detectada por “western blot”. Os dados foram representados pela média \pm DP de, pelo menos, três experimentos diferentes. ** $p < 0,01$ vs. o grupo controle (DMSO 0,1%). †† $p < 0,01$; ‡‡ $p < 0,01$ vs. o grupo controle (POH 1,5 mM sem o pré-tratamento).

4.6 Efeito do POH na liberação de citocinas

A liberação de interleucinas (IL) pode ser mediada via ativação das MAPKs (Qu *et al.*, 2012), podendo inclusive, ser induzida por glicosídeos cardíacos, através da enzima Na⁺, K⁺ - ATPase, em células embrionárias do citotrofoblasto (Uddin *et al.*, 2008).

Nos glioblastomas, a presença citocinas pró-inflamatórias está associada com o crescimento do tumor e, conseqüentemente, com sua malignidade. O fator de necrose tumoral (TNF- α) e a IL-1 β estão relacionados com o aumento na expressão dos mediadores pró-tumorigênicos IL-6 e IL-8. A IL-6 induz a proliferação das células tumorais e IL-8 apresenta propriedades quimiotáticas e angiogênica, além de amplificar o microambiente inflamatório. (Grivennikov *et al.*, 2010; Yeung *et al.*, 2012).

Para averiguarmos o efeito do POH na liberação de citocinas, em especial, as interleucinas IL-1 β , IL-6 e IL-8 e o TNF- α , células de GBM humano das linhagens U251 e U87 foram tratadas com DMSO 0,1%, POH (0,5 e 1,5 mM) ou com os controles positivos (LPS 5 μ g/mL e OUA 1 μ M) por 1, 6 e 24 horas. Após os períodos de incubação, os sobrenadantes das células foram recolhidos e as dosagens de citocinas foram realizadas através da técnica de ELISA.

Durante os três períodos de incubação utilizados, o POH (0,5 e 1,5 mM) não alterou a liberação de IL-1 β , IL-6 e TNF- α em nenhuma das duas linhagens de GBM. O mesmo também foi observado com a IL-8 em ambas as linhagens, nas incubações de 1 e 6 horas, e nas de 24 horas, somente com as células U87 (dados não mostrados). No entanto, Cho e colaboradores (2012) encontraram uma diminuição na liberação de IL-8 em células U87 após 48 horas de incubação, utilizando 0,6 mM de POH. Por outro lado, um aumento na liberação de IL-8 após 24 horas de incubação foi detectado na linhagem U251, apenas na concentração de 1,5 mM de POH (Figura 4.13). Este aumento pode ser uma estratégia destas células para driblar os efeitos provocados pelo POH, uma vez que a IL-8 potencializa invasão do GBM (Grivennikov *et al.*, 2010; Yeung *et al.*, 2012).

U251 - 24h

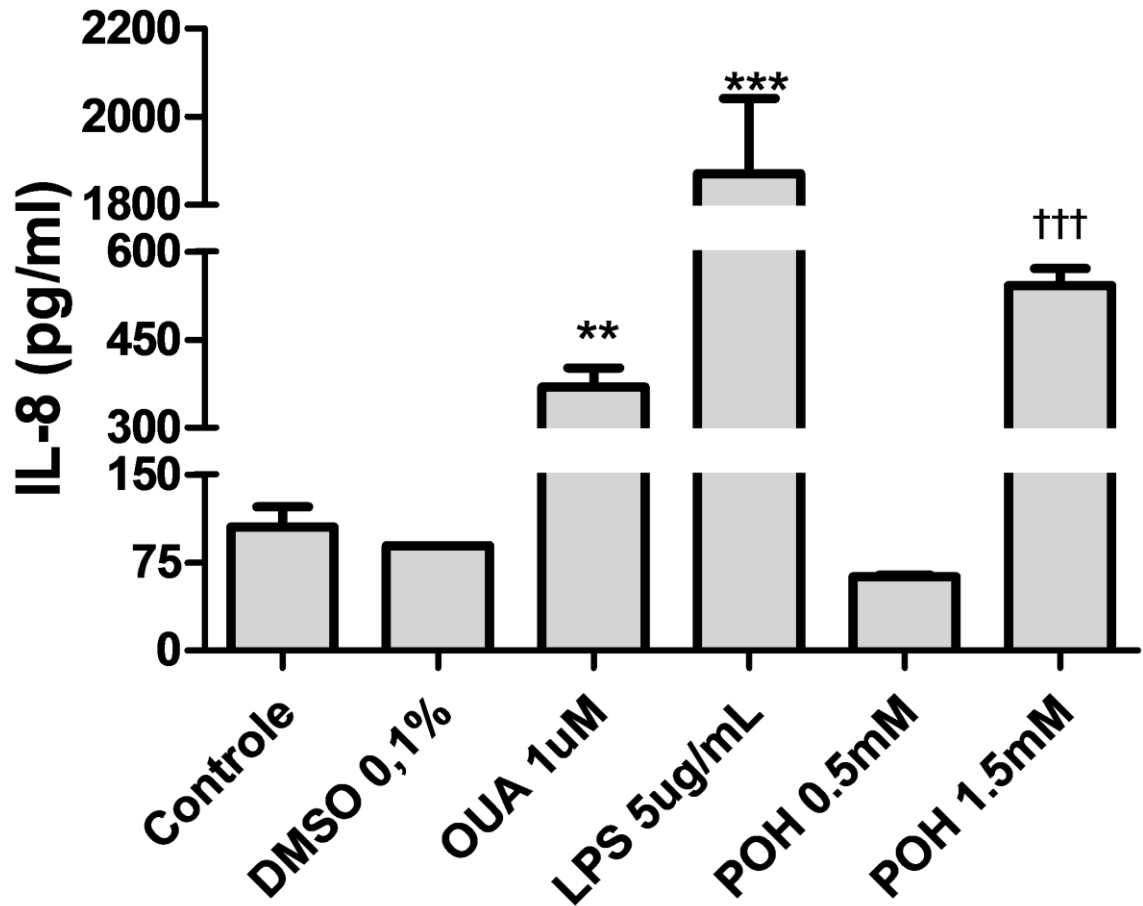


Figura 4.13: Efeito do POH na liberação de IL-8 em células U251. As células foram tratadas com DMSO 0,1%, POH (0,5 e 1,5 mM) e com diferentes controles positivos (LPS 5 µg/mL e OUA 1 µM) por 24 horas. Controle sem tratamento também foi realizado. A detecção de IL-8 foi realizada por ELISA. Os dados foram representados pela média \pm DP de, pelo menos, três experimentos diferentes. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. o grupo controle (sem tratamento). ††† $p < 0,001$ vs. o grupo controle (DMSO 0,1%).

4.7 Efeito da inibição da JNK na indução de apoptose pelo POH

Células de GBM humano são levadas à apoptose quando tratadas com POH (Rajesh *et al.*, 2003; Fernandes *et al.*, 2005) e, como mostrado anteriormente, a ativação da proteína JNK parece estar envolvida neste fenômeno celular.

Para avaliarmos o envolvimento da JNK na apoptose induzida por POH, células de GBM humano das linhagens U87 e U251 foram pré-tratadas, por 30 minutos, com inibidor de JNK V (0,5 μ M). Também foram realizados controles sem o pré-tratamento. Em seguida, o tratamento foi realizado com a adição de DMSO 0,1% ou POH 0,5 mM combinados ou não com 0,5 μ M de inibidor de JNK V. As células foram incubadas por 24 horas e a apoptose foi determinada por citometria de fluxo, através da marcação com anexina V-FITC e iodeto de propídio.

A análise da fluorescência do iodeto de propídio e da anexina V-FITC revelou populações de células viáveis e apoptóticas, como mostrado nos respectivos quadrantes (Figuras 4.14 e 4.16). O quadrante inferior esquerdo de cada ponto mostra as células viáveis. O quadrante inferior direito e o superior direito representam apoptose inicial e apoptose tardia ou necrose, respectivamente. O quadrante superior esquerdo representa a necrose.

As células da linhagem U87 do grupo controle, tratadas apenas com DMSO 0,1%, estão representadas na Figura 4.14A. O POH (0,5 mM) (Figura 4.14B) mostrou um aumento significativo na população de células apoptóticas (71% \pm 6,08) em comparação com o grupo controle. Além disso, grupos de células que também receberam o pré-tratamento, por 30 minutos, com inibidor de JNK V (0,5 μ M) e posterior tratamento durante 24 horas com este mesmo inibidor em conjunto com DMSO 0,1% (Figura 4.14C) ou com 0,5 mM de POH (Figura 4.14D), foram avaliados. Neste caso, 36,4% (\pm 2,05) das células que foram tratadas com POH e inibidor de JNK V entraram em apoptose (Figura 4.14D). Este valor foi maior em relação ao grupo controle (Figura 4.14C), porém significativamente menor comparado ao grupo tratado apenas com POH (Figura 4.14B). Estes resultados estão expressos na Figura 4.15.

Em comparação com o grupo controle (DMSO 0,1%) (Figura 4.16A), o POH (0,5 mM) também aumentou significativamente a população de células apoptóticas (71,2% \pm 7,9) da linhagem U251 (Figura 4.16B). Entretanto, as células pré-tratadas

com inibidor de JNK V (0,5 μ M), por 30 minutos, e em seguida, tratadas por 24 horas, com o inibidor de JNK V mais DMSO 0,1% (Figura 4.16C) ou 0,5 mM de POH (Figura 4.16D) apresentaram resultados diferentes em relação às células U87. Pois 52,6% (\pm 8,02) das células tratadas com POH e inibidor de JNK V entraram em apoptose (Figura 4.16D). Em relação ao grupo controle (Figura 4.16C), este valor foi significativamente maior, porém esta diminuição não foi significativa quando comparada ao grupo tratado apenas com POH (Figura 4.16B). A Figura 4.17 representa estes resultados.

Esses resultados com as células de GBM humano das linhagens U87 e U251 mostram que a inibição da ativação da proteína JNK reduz o efeito apoptótico ocasionado pela ação do POH, demonstrando a participação desta proteína na indução da apoptose nestas células de GBM. No entanto, esta redução na apoptose induzida pelo POH não ocorreu com a mesma intensidade nas duas linhagens utilizadas. Curiosamente, além desta diferença observada no bloqueio da apoptose entre as células tumorais, o efeito do POH na ativação da JNK também foi menor nas células U25, como visto anteriormente (ver Figuras 4.8 e 4.9). Uma vez que ambas as linhagens de GBM foram levadas à apoptose pelo POH com a mesma potência (ver Figuras 4.15 e 4.17), parte desta via pode ser independente da JNK nas células U251. Possivelmente pela ativação de outras MAPKs (p38, por exemplo) ou com o envolvimento da via PI3K/Akt que também estão relacionadas com o complexo Na⁺, K⁺-ATPase-Src (Yang *et al.*, 2012; Reinhard *et al.*, 2013).

U87

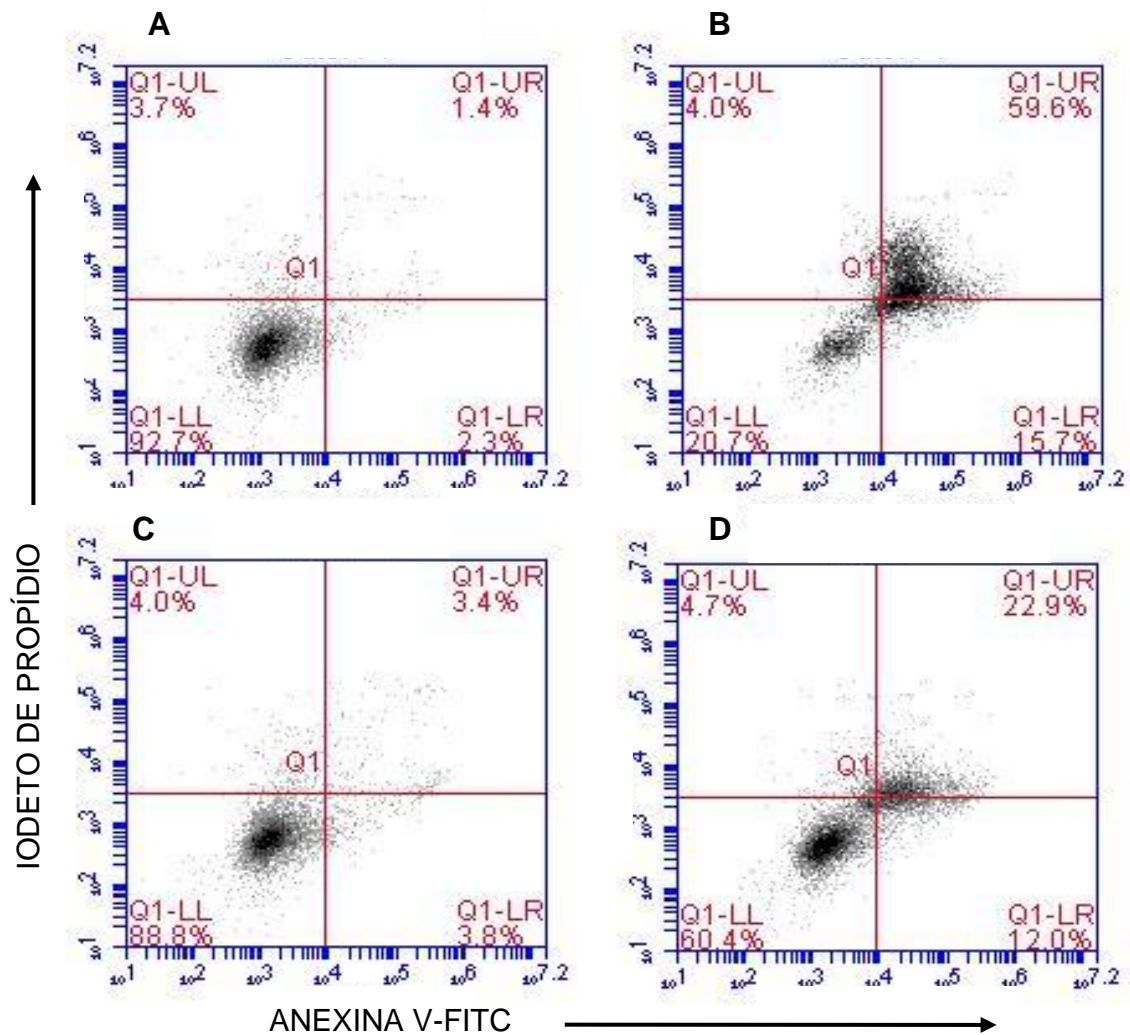


Figura 4.14: Efeito da inibição da JNK na indução de apoptose pelo POH em células U87. Antes do tratamento, as células U87 foram incubadas sem (A e B) ou com (C e D) inibidor de JNK V (0,5 μ M) por 30 minutos. As células foram tratadas com DMSO 0,1% (A); POH 0,5 mM (B); DMSO 0,1% e inibidor de JNK V (C); POH 0,5 mM e inibidor de JNK V (D). Após 24 horas de incubação, as células foram marcadas com anexina V-FITC e iodeto de propídio e analisadas por citometria.

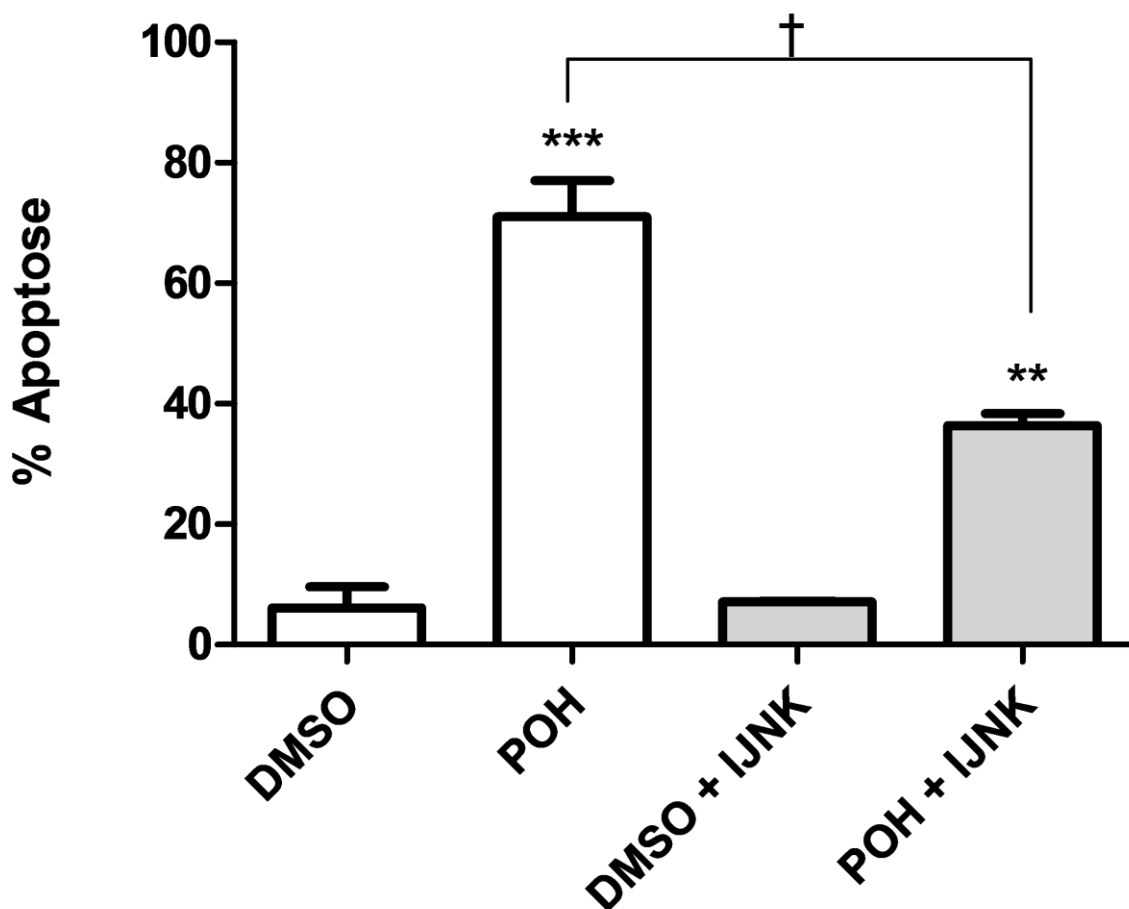


Figura 4.15: Efeito da inibição da JNK na indução de apoptose pelo POH em células U87. Percentagem da população de células apoptóticas (quadrante superior direito + quadrante inferior direito) de GBM humano da linhagem U87, calculada a partir dos dados representados na Figura 4.14. Os dados foram representados pela média \pm DP de, pelo menos, três experimentos diferentes. *** $p < 0,001$ vs. o grupo controle (DMSO 0,1%); ** $p < 0,01$ vs. o grupo controle (DMSO 0,1% + inibidor de JNK V (0,5 μ M)). \dagger $p < 0,05$ vs. o grupo controle (POH 0,5 mM sem o inibidor de JNK V).

U251

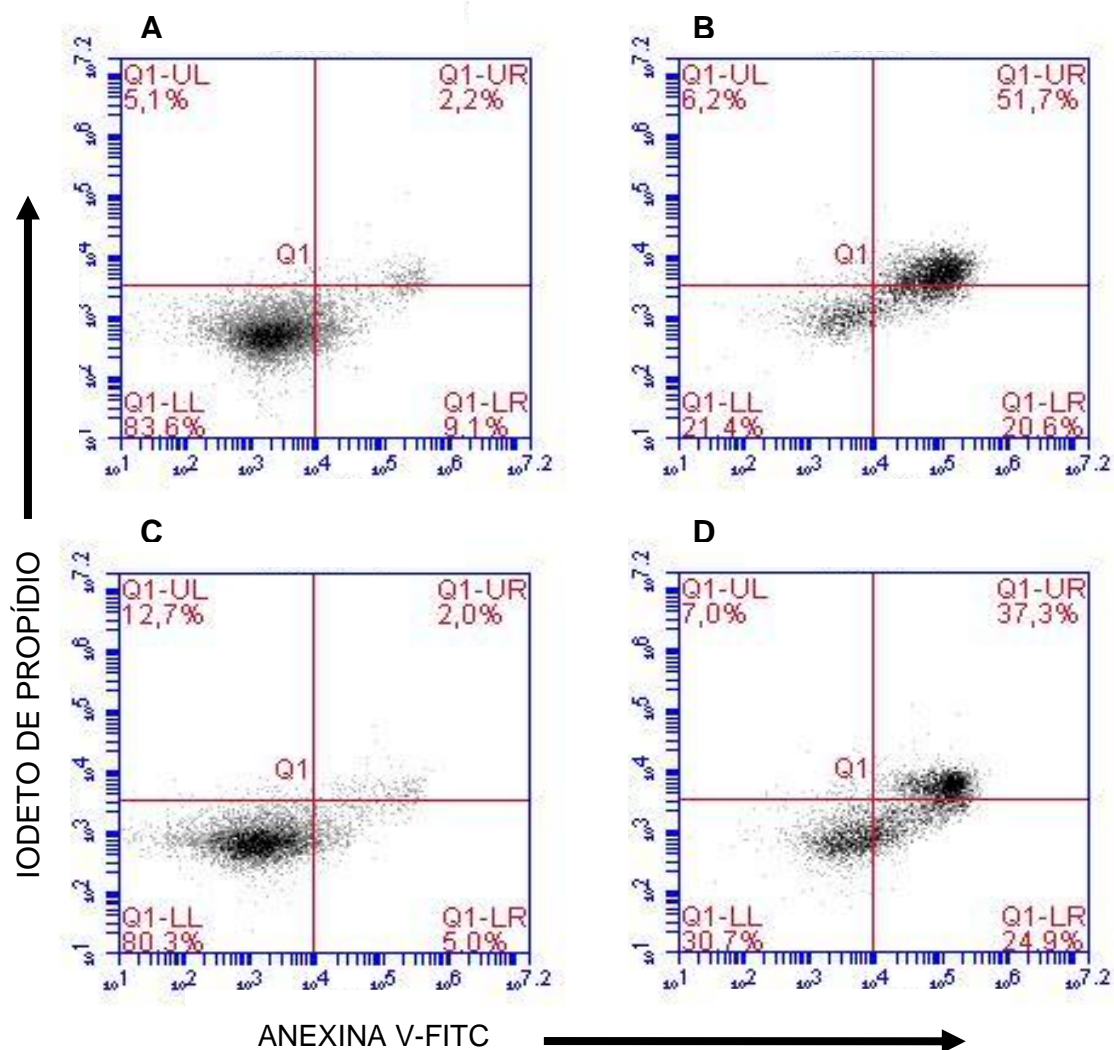


Figura 4.16: Efeito da inibição da JNK na indução de apoptose pelo POH em células U251. Antes do tratamento, as células U251 foram incubadas sem (A e B) ou com (C e D) inibidor de JNK V (0,5 μ M) por 30 minutos. As células foram tratadas com DMSO 0,1% (A); POH 0,5 mM (B); DMSO 0,1% e inibidor de JNK V (C); POH 0,5 mM e inibidor de JNK V (D). Após 24 horas de incubação, as células foram marcadas com anexina V-FITC e iodeto de propídio e analisadas por citometria.

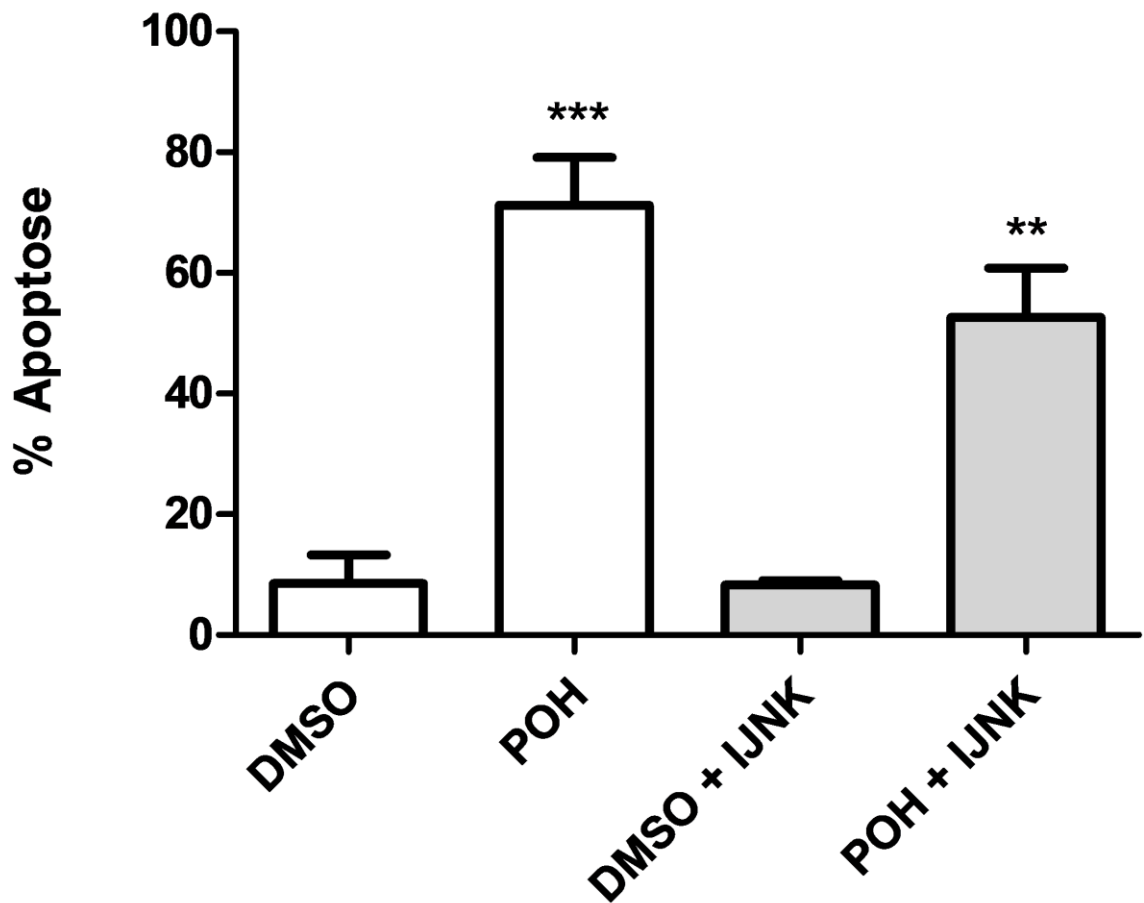


Figura 4.17: Efeito da inibição da JNK na indução de apoptose pelo POH em células U251. Percentagem da população de células apoptóticas (quadrante superior direito + quadrante inferior direito) de GBM humano da linhagem U251, calculada a partir dos dados representados na Figura 4.16. Os dados foram representados pela média \pm DP de, pelo menos, três experimentos diferentes. *** $p < 0,001$ vs. o grupo controle (DMSO 0,1%); ** $p < 0,01$ vs. o grupo controle (DMSO 0,1% + inibidor de JNK V (0,5 μ M)). A diferença entre o grupo tratado (POH 0,5 mM + inibidor de JNK V) e o grupo controle (POH 0,5 mM sem o inibidor de JNK V) não foi, estatisticamente, significativa.

A enzima Na^+ , K^+ -ATPase, em particular, a composta pela isoforma α_1 , exerce um importante papel na sobrevivência dos GBMs (Lefranc e Kiss, 2008; Lefranc *et al.*, 2008). Inibidores da atividade desta enzima, em especial o glicosídeo cardíaco UNBS1450 e o monoterpene POH são capazes de provocar a morte nestas células neoplásicas através da indução da autofagia e apoptose, respectivamente (Fernandes *et al.*, 2005; Lefranc *et al.*, 2008; Garcia *et al.*, 2010).

O processo autofágico iniciado pelo UNBS1450 em células de GBM foi elucidado por Lefranc e colaboradores (2008), porém o fenômeno apoptótico provocado pelo POH nestas mesmas células ainda permanece em aberto.

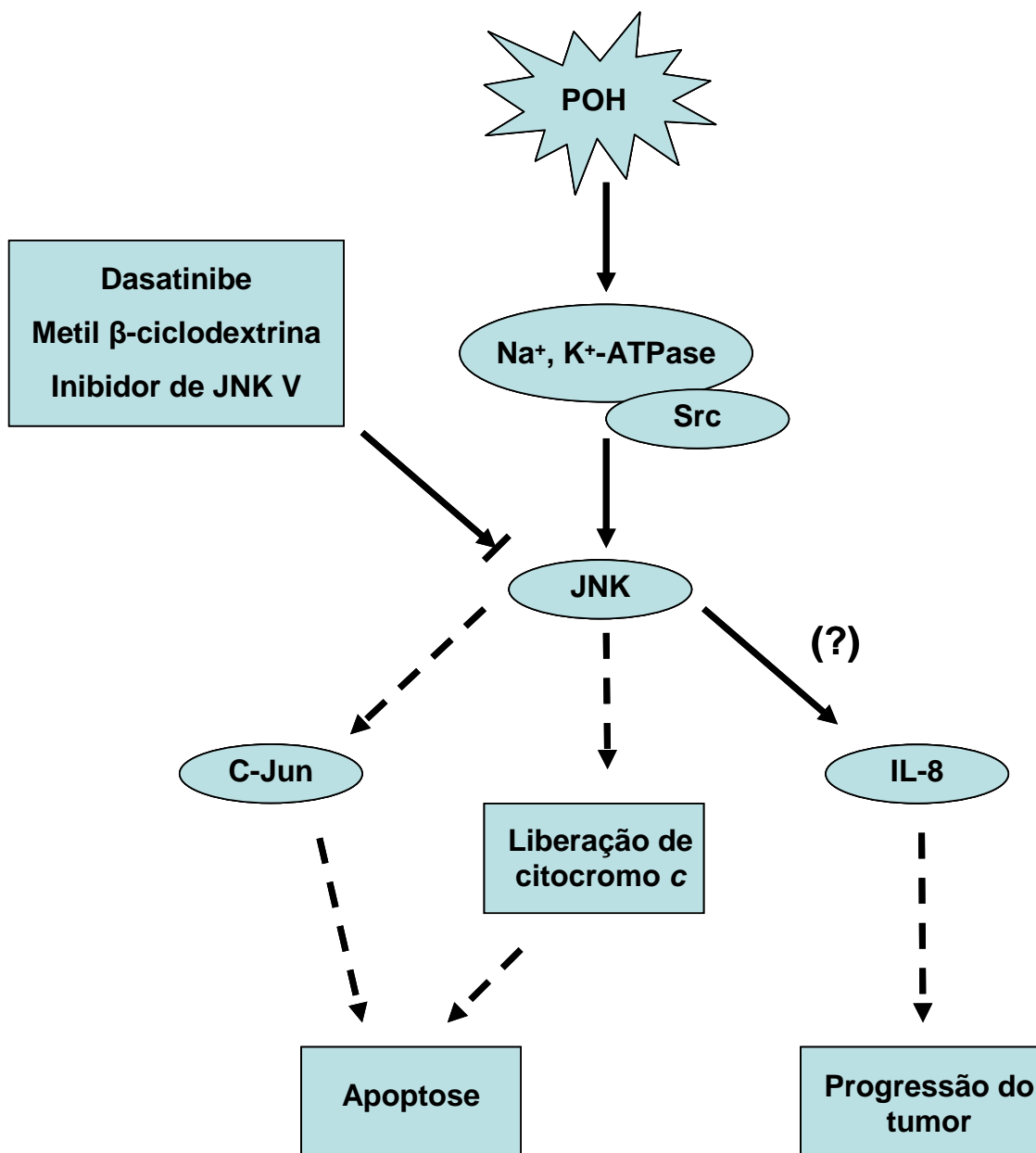


Figura 4.18: Diagrama esquemático mostrando o possível relacionamento entre a apoptose em células de GBM e a via Na^+ , K^+ -ATPase-Src-JNK. As linhas sólidas no diagrama indicam os achados deste estudo, enquanto que as linhas tracejadas mostram os mecanismos moleculares conhecidos. (?) Relação não analisada neste estudo.

5 CONCLUSÃO

- O POH inibiu a atividade da Na^+ , K^+ -ATPase em todas as linhagens de células utilizadas neste estudo, apresentando valores de IC_{50} , em 30 minutos, iguais a 1,8 e 2,0 mM para as células U251 e U87, respectivamente, 1,4 mM para astrócitos de camundongo e 2,4 mM para as células VERO. A captação de Rb^+ foi totalmente inibida com 2,0 mM de POH nos astrócitos de camundongo e com 4,0 mM nas células de GBM. As células VERO não alcançaram 100% de inibição com 4,0 mM de POH. A viabilidade destas células não foi afetada pelo POH e nem pela ouabaína (controle positivo), ratificando que a redução na captação de Rb^+ ocorreu através da inibição da atividade da Na^+ , K^+ ATPase, e não devido a morte destas células;
- O PA não alterou a atividade da Na^+ , K^+ -ATPase, nem a viabilidade celular;
- A incubação mais prolongada com POH reduziu a viabilidade das células das linhagens tumorais (U87 e U251) e das não tumorais (VERO e astrócitos de camundongo) durante as 24 horas de incubação. Foram encontrados valores de IC_{50} iguais a 0,9 mM (VERO), 1,4 mM (astrócitos de camundongo), 1,1 mM (U87) e 1,4 mM (U251);
- O POH (0,5 e 1,5 mM) induz a ativação da fosforilação da JNK1/2 nas células U87. Na linhagem U251 e nos astrócitos de camundongo este aumento foi significativo apenas com 1,5 mM de POH. O POH não alterou a ativação de JNK1/2 nas células VERO;
- A ativação da JNK1/2 induzida pelo POH (1,5 mM) parece envolver a Src quinase e domínios ricos em colesterol da membrana celular nas células U87, indicando a possível participação do complexo Na^+ , K^+ -ATPase-Src presente no sinalossoma nesta via de sinalização intracelular;
- O POH (0,5 e 1,5 mM) não alterou a liberação de IL-1 β , IL-6 e TNF- α nas duas linhagens de GBM humano;

- Ocorreu um aumento na detecção de IL-8 somente na linhagem U251 e apenas durante a incubação por 24 horas de com 1,5 mM de POH, indicando possivelmente uma alternativa destas células para esquivar-se do efeito citotóxico do POH;
- A apoptose ocasionada pelo POH nas células de GBM humano U87 e U251 envolve a ativação da JNK na deflagração da via apoptótica em ambas as células;
- O conjunto dos resultados obtidos mostram que o mecanismo de sinalização celular mediado pela Na⁺, K⁺ ATPase pode ter um importante papel no mecanismo de ação antitumoral do POH em células de glioma.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abriel H, Hasler U, Geering K, Horisberger JD. Role of the intracellular domain of the beta subunit in Na,K pump function. *Biochim Biophys Acta*. 1999; 1418(1):85-96.
- Ahluwalia MS, de Groot J, Liu WM, Gladson CL. Targeting Src in glioblastoma tumors and brain metastases: rationale and preclinical studies. *Cancer Lett*. 2010; 298(2):139-49.
- Ahmed Z, Deyama Y, Yoshimura Y, Suzuki K. Cisplatin sensitivity of oral squamous carcinoma cells is regulated by Na⁺,K⁺-ATPase activity rather than copper-transporting P-type ATPases, ATP7A and ATP7B. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2009; 63(4):643-50.
- Aizman O, Uhlén P, Lal M, Brismar H, Aperia A. Ouabain, a steroid hormone that signals with slow calcium oscillations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98(23):13420-4.
- Albers RW. Biochemical aspects of active transport. *Annu Rev Biochem*. 1967; 36:727-56.
- Aperia A. New roles for an old enzyme: Na,K-ATPase emerges as an interesting drug target. *J Intern Med*. 2007; 261(1):44-52.
- Appel C, Gloor S, Schmalzing G, Schachner M, Bernhardt RR. Expression of a Na,K-ATPase beta 3 subunit during development of the zebrafish central nervous system. *J Neurosci Res*. 1996; 46(5):551-64.
- Ark M, Ozdemir A, Polat B. Ouabain-induced apoptosis and Rho kinase: a novel caspase-2 cleavage site and fragment of Rock-2. *Apoptosis*. 2010; 15(12):1494-506.
- Azzoli CG, Miller VA, Ng KK, Krug LM, Spriggs DR, Tong WP, et al. A phase I trial of perillyl alcohol in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2003; 51(6):493-8.

- Babula P, Masarik M, Adam V, Provaznik I, Kizek R. From Na⁺/K⁺-ATPase and cardiac glycosides to cytotoxicity and cancer treatment. *Anticancer Agents Med Chem.* 2013; 13(7):1069-87.
- Bagrov AY, Fedorova OV, Dmitrieva RI, Howald WN, Hunter AP, Kuznetsova EA, et al. Characterization of a urinary bufodienolide Na⁺,K⁺-ATPase inhibitor in patients after acute myocardial infarction. *Hypertension.* 1998; 31(5):1097-103.
- Bailey HH, Attia S, Love RR, Fass T, Chappell R, Tutsch K, et al. Phase II trial of daily oral perillyl alcohol (NSC 641066) in treatment-refractory metastatic breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2008; 62(1):149-57.
- Bailey HH, Wilding G, Tutsch KD, Arzoomanian RZ, Alberti D, Feierabend C, et al. A phase I trial of perillyl alcohol administered four times daily for 14 days out of 28 days. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2004; 54(4):368-76.
- Barlet-Bas C, Arystarkhova E, Cheval L, Marsy S, Sweadner K, Modyanov N, et al. Are there several isoforms of Na,K-ATPase alpha subunit in the rabbit kidney? *J Biol Chem.* 1993; 268(16):11512-5.
- Béguin P, Wang X, Firsov D, Puoti A, Claeys D, Horisberger JD, et al. The gamma subunit is a specific component of the Na,K-ATPase and modulates its transport function. *EMBO J.* 1997; 16(14):4250-60.
- Belanger JT. Perillyl alcohol: applications in oncology. *Altern Med Rev.* 1998; 3(6):448-57.
- Blanco G. The NA/K-ATPase and its isozymes: what we have learned using the baculovirus expression system. *Front Biosci.* 2005; 10:2397-411.
- Blanco G, Mercer RW. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am J Physiol.* 1998; 275(5 Pt 2):F633-50.
- Blanco G, Sánchez G, Melton RJ, Tourtellotte WG, Mercer RW. The alpha4 isoform of the Na,K-ATPase is expressed in the germ cells of the testes. *J Histochem Cytochem.* 2000; 48(8):1023-32.

- Blanco G, Sánchez G, Mercer RW. Differential regulation of Na,K-ATPase isozymes by protein kinases and arachidonic acid. *Arch Biochem Biophys.* 1998; 359(2):139-50.
- Boik J. Natural compounds in cancer therapy. 1st ed. Princeton, Minnesota, U.S.A. *Oregon Medical Press*; 2001.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72:248-54.
- Buckalew VM. Endogenous digitalis-like factors. An historical overview. *Front Biosci.* 2005; 10:2325-34.
- Burth P, Younes-Ibrahim M, Gonçalves FH, Costa ER, Faria MV. Purification and characterization of a Na⁺, K⁺ ATPase inhibitor found in an endotoxin of *Leptospira interrogans*. *Infect Immun.* 1997; 65(4):1557-60.
- Cerella C, Dicato M, Diederich M. Assembling the puzzle of anti-cancer mechanisms triggered by cardiac glycosides. *Mitochondrion.* 2013; 13(3):225-34.
- Chaudhary SC, Alam MS, Siddiqui MS, Athar M. Perillyl alcohol attenuates Ras-ERK signaling to inhibit murine skin inflammation and tumorigenesis. *Chem Biol Interact.* 2009; 179(2-3):145-53.
- Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK. Current concepts in apoptosis: The physiological suicide program revisited. *Cell Mol Biol Lett.* 2006; 11:506-25.
- Cho HY, Wang W, Jhaveri N, Torres S, Tseng J, Leong MN, et al. Perillyl alcohol for the treatment of temozolomide-resistant gliomas. *Mol Cancer Ther.* 2012; 11(11):2462-72.
- Cortes VF, Veiga-Lopes FE, Barrabin H, Alves-Ferreira M, Fontes CF. The gamma subunit of Na⁺, K⁺-ATPase: role on ATPase activity and regulatory phosphorylation by PKA. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006; 38(11):1901-13.
- Da Fonseca CO, Landeiro JA, Clark SS, Quirico-Santos T, da Costa Carvalho MaG, Gattass CR. Recent advances in the molecular genetics of malignant gliomas

disclose targets for antitumor agent perillyl alcohol. *Surg Neurol.* 2006a; 65 Suppl 1:S1:2-1:8; discussion S1:8-1:9.

Da Fonseca CO, Masini M, Futuro D, Caetano R, Gattass CR, Quirico-Santos T. Anaplastic oligodendroglioma responding favorably to intranasal delivery of perillyl alcohol: a case report and literature review. *Surg Neurol.* 2006b; 66(6):611-5.

Da Fonseca CO, Schwartzmann G, Fischer J, Nagel J, Futuro D, Quirico-Santos T, et al. Preliminary results from a phase I/II study of perillyl alcohol intranasal administration in adults with recurrent malignant gliomas. *Surg Neurol.* 2008; 70(3):259-66; discussion 66-7.

Da Fonseca CO, Silva JT, Lins IR, Simão M, Arnobio A, Futuro D, et al. Correlation of tumor topography and peritumoral edema of recurrent malignant gliomas with therapeutic response to intranasal administration of perillyl alcohol. *Invest New Drugs.* 2009; 27(6):557-64.

Da Fonseca CO, Simão M, Lins IR, Caetano RO, Futuro D, Quirico-Santos T. Efficacy of monoterpene perillyl alcohol upon survival rate of patients with recurrent glioblastoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2011; 137(2):287-93.

Dong Y, Yin S, Li J, Jiang C, Ye M, Hu H. Bufadienolide compounds sensitize human breast cancer cells to TRAIL-induced apoptosis via inhibition of STAT3/Mcl-1 pathway. *Apoptosis.* 2011; 16(4):394-403.

Dos Santos MaC, Burth P, Younes-Ibrahim M, Gonçalves CF, Santelli RE, Oliveira EP, et al. Na/K-ATPase assay in the intact guinea pig liver submitted to in situ perfusion. *Anal Biochem.* 2009; 385(1):65-8.

Duelund L, Amiot A, Fillon A, Mouritsen OG. Influence of the active compounds of *Perilla frutescens* leaves on lipid membranes. *J Nat Prod.* 2012; 75(2):160-6.

Espineda C, Seligson DB, James Ball W, Rao J, Palotie A, Horvath S, et al. Analysis of the Na,K-ATPase alpha- and beta-subunit expression profiles of bladder cancer using tissue microarrays. *Cancer.* 2003; 97(8):1859-68.

- Espineda CE, Chang JH, Twiss J, Rajasekaran SA, Rajasekaran AK. Repression of Na/K-ATPase beta-1-subunit by the transcription factor snail in carcinoma. *Mol Biol Cell*. 2004; 15: 1364-73.
- Felth J, Rickardson L, Rosén J, Wickström M, Fryknäs M, Lindskog M, et al. Cytotoxic effects of cardiac glycosides in colon cancer cells, alone and in combination with standard chemotherapeutic drugs. *J Nat Prod*. 2009; 72(11):1969-74.
- Fernandes J, da Fonseca CO, Teixeira A, Gattass CR. Perillyl alcohol induces apoptosis in human glioblastoma multiforme cells. *Oncol Rep*. 2005; 13(5):943-7.
- Garcia DG, Amorim LM, de Castro Faria MV, Freire AS, Santelli RE, Da Fonseca CO, et al. The anticancer drug perillyl alcohol is a Na/K-ATPase inhibitor. *Mol Cell Biochem*. 2010; 345(1-2):29-34.
- Geering K. FXYD proteins: new regulators of Na-K-ATPase. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006; 290(2):F241-50.
- Gelb MH, Tamanoi F, Yokoyama K, Ghomashchi F, Esson K, Gould MN. The inhibition of protein prenyltransferases by oxygenated metabolites of limonene and perillyl alcohol. *Cancer Lett*. 1995; 91(2):169-75.
- Gill S, Gill R, Wicks D, Despotovski S, Liang D. Development of an HTS assay for Na⁺, K⁺-ATPase using nonradioactive rubidium ion uptake. *Assay Drug Dev Technol*. 2004; 2(5):535-42.
- Giltaire S, Lambert S, Poumay Y. HB-EGF synthesis and release induced by cholesterol depletion of human epidermal keratinocytes is controlled by extracellular ATP and involves both p38 and ERK1/2 signaling pathways. *J Cell Physiol*. 2011; 226(6):1651-9.
- Goldin AG, Safa AR. Digitalis and cancer. *Lancet*. 1984; 1(8386):1134.
- Gomes FC, Garcia-Abreu J, Galou M, Paulin D, Moura Neto V. Neurons induce GFAP gene promoter of cultured astrocytes from transgenic mice. *Glia*. 1999; 26(2):97-108.

- Gottlieb SS, Rogowski AC, Weinberg M, Krichten CM, Hamilton BP, Hamlyn JM. Elevated concentrations of endogenous ouabain in patients with congestive heart failure. *Circulation*. 1992; 86(2):420-5.
- Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010; 140(6):883-99.
- Haas M, Askari A, Xie Z. Involvement of Src and epidermal growth factor receptor in the signal-transducing function of Na⁺/K⁺-ATPase. *J Biol Chem*. 2000; 275(36):27832-7.
- Hamlyn JM, Blaustein MP, Bova S, DuCharme DW, Harris DW, Mandel F, et al. Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991; 88(14):6259-63.
- Hanks JH, Wallace JH. Determination of cell viability. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1958; 98(1):188-92.
- Hauptman PJ, Kelly RA. Digitalis. *Circulation*. 1999; 99(9):1265-70.
- Haux J. Digitoxin is a potential anticancer agent for several types of cancer. *Med Hypotheses*. 1999; 53(6):543-8.
- Haux J, Klepp O, Spigset O, Tretli S. Digitoxin medication and cancer; case control and internal dose-response studies. *BMC Cancer*. 2001; 1:11.
- Heasley B. Chemical synthesis of the cardiotoxic steroid glycosides and related natural products. *Chemistry*. 2012; 18(11):3092-120.
- Holstein SA, Hohl RJ. Monoterpene regulation of Ras and Ras-related protein expression. *J Lipid Res*. 2003; 44(6):1209-15.
- Huang WW, Yang JS, Pai SJ, Wu PP, Chang SJ, Chueh FS, et al. Bufalin induces G(0)/G(1) phase arrest through inhibiting the levels of cyclin D, cyclin E, CDK2 and CDK4, and triggers apoptosis via mitochondrial signaling pathway in T24 human bladder cancer cells. *Mutat Res*. 2012; 732(1-2):26-33.

- Hudes GR, Szarka CE, Adams A, Ranganathan S, McCauley RA, Weiner LM, et al. Phase I pharmacokinetic trial of perillyl alcohol (NSC 641066) in patients with refractory solid malignancies. *Clin Cancer Res.* 2000; 6(8):3071-80.
- Iyer AK, Zhou M, Azad N, Elbaz H, Wang L, Rogalsky DK, et al. A Direct Comparison of the Anticancer Activities of Digitoxin MeON-Neoglycosides and O-Glycosides: Oligosaccharide Chain Length-Dependent Induction of Caspase-9-Mediated Apoptosis. *ACS Med Chem Lett.* 2010; 1(7):326-30.
- Jaitovich AA, Bertorello AM. Na⁺, K⁺ -ATPase: an indispensable ion pumping-signaling mechanism across mammalian cell membranes. *Semin Nephrol.* 2006; 26(5):386-92.
- Johansson S, Lindholm P, Gullbo J, Larsson R, Bohlin L, Claesson P. Cytotoxicity of digitoxin and related cardiac glycosides in human tumor cells. *Anticancer Drugs.* 2001; 12(5):475-83.
- Jorgensen PL. Purification and characterization of (Na⁺ + K⁺)-ATPase. VI. Differential tryptic modification of catalytic functions of the purified enzyme in presence of NaCl and KCl. *Biochim Biophys Acta.* 1977; 466(1):97-108.
- Juncker T, Cerella C, Teiten MH, Morceau F, Schumacher M, Ghelfi J, et al. UNBS1450, a steroid cardiac glycoside inducing apoptotic cell death in human leukemia cells. *Biochem Pharmacol.* 2011; 81(1):13-23.
- Juncker T, Schumacher M, Dicato M, Diederich M. UNBS1450 from *Calotropis procera* as a regulator of signaling pathways involved in proliferation and cell death. *Biochem Pharmacol.* 2009; 78(1):1-10.
- Jørgensen PL. Mechanism of the Na⁺, K⁺ pump. Protein structure and conformations of the pure (Na⁺ +K⁺)-ATPase. *Biochim Biophys Acta.* 1982; 694(1):27-68.
- Jørgensen PL. Structure, function and regulation of Na,K-ATPase in the kidney. *Kidney Int.* 1986; 29(1):10-20.
- Kaplan JH. Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annu Rev Biochem.* 2002; 71:511-35.

- Kim JH, Song AR, Sohn HJ, Lee J, Yoo JK, Kwon D, et al. IL-1 β and IL-6 activate inflammatory responses of astrocytes against *Naegleria fowleri* infection via the modulation of MAPKs and AP-1. *Parasite Immunol.* 2013; 35(3-4):120-8.
- Kometiani P, Liu L, Askari A. Digitalis-induced signaling by Na⁺/K⁺-ATPase in human breast cancer cells. *Mol Pharmacol.* 2005; 67(3):929-36.
- Kühlbrandt W. Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004; 5(4):282-95.
- Latzkovits L, Torday C, Jánossy T, Erdös E. Manifestation of K⁺ transport alterations in cultured tumour cells of mice. *Acta Chir Hung.* 1983; 24(4):287-94.
- Lawen A. Apoptosis – An introduction. *Bioessays.* 2003; 25(9):888-96.
- Lefranc F, Kiss R. The sodium pump alpha1 subunit as a potential target to combat apoptosis-resistant glioblastomas. *Neoplasia.* 2008; 10(3):198-206.
- Lefranc F, Mijatovic T, Kondo Y, Sauvage S, Roland I, Debeir O, et al. Targeting the alpha 1 subunit of the sodium pump to combat glioblastoma cells. *Neurosurgery.* 2008; 62(1):211-21; discussion 21-2.
- Lefranc F, Xu Z, Burth P, Mathieu V, Revelant G, de Castro Faria MV, et al. 4-Bromo-2-(piperidin-1-yl)thiazol-5-yl-phenyl methanone (12b) inhibits Na⁺/K⁺-ATPase and Ras oncogene activity in cancer cells. *Eur J Med Chem.* 2013; 63:213-23.
- Lei K, Nimnual A, Zong WX, Kennedy NJ, Flavell RA, Thompson CB, et al. The Bax subfamily of Bcl2-related proteins is essential for apoptotic signal transduction by c-Jun NH(2)-terminal kinase. *Mol Cell Biol.* 2002; 22(13):4929-42.
- Li Z, Xie Z. The Na/K-ATPase/Src complex and cardiotoxic steroid-activated protein kinase cascades. *Pflugers Arch.* 2009; 457(3):635-44.
- Liang M, Tian J, Liu L, Pierre S, Liu J, Shapiro J, et al. Identification of a pool of non-pumping Na/K-ATPase. *J Biol Chem.* 2007; 282(14):10585-93.
- Liu G, Oettel K, Bailey H, Ummersen LV, Tutsch K, Staab MJ, et al. Phase II trial of perillyl alcohol (NSC 641066) administered daily in patients with metastatic

- androgen independent prostate cancer. *Invest New Drugs*. 2003; 21(3):367-72.
- Liu JM, Pan F, Li L, Liu QR, Chen Y, Xiong XX, et al. Piperlongumine selectively kills glioblastoma multiforme cells via reactive oxygen species accumulation dependent JNK and p38 activation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013; 437(1):87-93.
- Liu L, Mohammadi K, Aynafshar B, Wang H, Li D, Liu J, et al. Role of caveolae in signal-transducing function of cardiac Na⁺/K⁺-ATPase. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003; 284(6):C1550-60.
- López-Lázaro M, Pastor N, Azrak SS, Ayuso MJ, Austin CA, Cortés F. Digitoxin inhibits the growth of cancer cell lines at concentrations commonly found in cardiac patients. *J Nat Prod*. 2005; 68(11):1642-5.
- Louis DN. Molecular pathology of malignant gliomas. *Annu Rev Pathol*. 2006; 1:97-117.
- Louis DN, Holland EC, Cairncross JG. Glioma classification: a molecular reappraisal. *Am J Pathol*. 2001; 159(3):779-86.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*. 2007; 114(2):97-109.
- Loutrari H, Hatziapostolou M, Skouridou V, Papadimitriou E, Roussos C, Kollis FN, et al. Perillyl alcohol is an angiogenesis inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004; 311(2):568-75.
- MacGregor SE, Walker JM. Inhibitors of the Na⁺, K⁺-ATPase. *Comp Biochem Physiol*. 1993; 105C(1):1-9.
- Manna SK, Sah NK, Newman RA, Cisneros A, Aggarwal BB. Oleandrin suppresses activation of nuclear transcription factor-kappaB, activator protein-1, and c-Jun NH2-terminal kinase. *Cancer Res*. 2000; 60(14):3838-47.

- Manunta P, Stella P, Rivera R, Ciurlino D, Cusi D, Ferrandi M, et al. Left ventricular mass, stroke volume, and ouabain-like factor in essential hypertension. *Hypertension*. 1999; 34(3):450-6.
- Mathieu V, Pirker C, Martin de Lassalle E, Vernier M, Mijatovic T, DeNeve N, et al. The sodium pump alpha1 sub-unit: a disease progression-related target for metastatic melanoma treatment. *J Cell Mol Med*. 2009; 13(9B):3960-72.
- Matos JM, Schmidt CM, Thomas HJ, Cummings OW, Wiebke EA, Madura JA, et al. A pilot study of perillyl alcohol in pancreatic cancer. *J Surg Res*. 2008; 147(2):194-9.
- McGarvey DJ, Croteau R. Terpenoid metabolism. *Plant Cell*. 1995; 7(7):1015-26.
- Mijatovic T, Dufrasne F, Kiss R. Cardiotoxic steroids-mediated targeting of the Na(+)/K(+)-ATPase to combat chemoresistant cancers. *Curr Med Chem*. 2012b; 19(5):627-46.
- Mijatovic T, Dufrasne F, Kiss R. Na(+)/K(+)-ATPase and cancer. *Pharm Pat Anal*. 2012a; 1(1):91-106.
- Mijatovic T, Ingrassia L, Facchini V, Kiss R. Na+/K+-ATPase alpha subunits as new targets in anticancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*. 2008; 12(11):1403-17.
- Mijatovic T, Jungwirth U, Heffeter P, Hoda MA, Dornetshuber R, Kiss R, et al. The Na+/K+-ATPase is the Achilles heel of multi-drug-resistant cancer cells. *Cancer Lett*. 2009; 282(1):30-4.
- Mijatovic T, Mathieu V, Gaussin JF, De Nève N, Ribaucour F, Van Quaquebeke E, et al. Cardenolide-induced lysosomal membrane permeabilization demonstrates therapeutic benefits in experimental human non-small cell lung cancers. *Neoplasia*. 2006; 8(5):402-12.
- Mijatovic T, Roland I, Van Quaquebeke E, Nilsson B, Mathieu A, Van Vynckt F, et al. The alpha1 subunit of the sodium pump could represent a novel target to combat non-small cell lung cancers. *J Pathol*. 2007b; 212(2):170-9.

- Mijatovic T, Van Quaakebeke E, Delest B, Debeir O, Darro F, Kiss R. Cardiotonic steroids on the road to anti-cancer therapy. *Biochim Biophys Acta*. 2007a; 1776(1):32-57.
- Miyakawa-Naito A, Uhlén P, Lal M, Aizman O, Mikoshiba K, Brismar H, et al. Cell signaling microdomain with Na,K-ATPase and inositol 1,4,5-trisphosphate receptor generates calcium oscillations. *J Biol Chem*. 2003; 278(50):50355-61.
- Mobasheri A, Avila J, Cózar-Castellano I, Brownleader MD, Trevan M, Francis MJ, et al. Na⁺, K⁺-ATPase isozyme diversity; comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions. *Biosci Rep*. 2000; 20(2):51-91.
- Mobasheri A, Fox R, Evans I, Cullingham F, Martín-Vasallo P, Foster CS. Epithelial Na, K-ATPase expression is down-regulated in canine prostate cancer; a possible consequence of metabolic transformation in the process of prostate malignancy. *Cancer Cell Int*. 2003; 3(1):8.
- Morgan-Meadows S, Dubey S, Gould M, Tutsch K, Marnocha R, Arzoomanin R, et al. Phase I trial of perillyl alcohol administered four times daily continuously. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2003; 52(5):361-6.
- Moss TM. Comments on the medicinal action of herbs. *J Emerg Nurs*. 1998; 24(6):554.
- Murren JR, Pizzorno G, DiStasio SA, McKeon A, Peccerillo K, Gollerkari A, et al. Phase I study of perillyl alcohol in patients with refractory malignancies. *Cancer Biol Ther*. 2002; 1(2):130-5.
- Nakada M, Nakada S, Demuth T, Tran NL, Hoelzinger DB, Berens ME. Molecular targets of glioma invasion. *Cell Mol Life Sci*. 2007; 64(4):458-78.
- Newman RA, Kondo Y, Yokoyama T, Dixon S, Cartwright C, Chan D, et al. Autophagic cell death of human pancreatic tumor cells mediated by oleandrin, a lipid-soluble cardiac glycoside. *Integr Cancer Ther*. 2007; 6(4):354-64.

- Newman RA, Yang P, Hittelman WN, Lu T, Ho DH, Ni D, et al. Oleandrin-mediated oxidative stress in human melanoma cells. *J Exp Ther Oncol*. 2006; 5(3):167-81.
- Nicholls MG, Lewis LK, Yandle TG, Lord G, McKinnon W, Hilton PJ. Ouabain, a circulating hormone secreted by the adrenals, is pivotal in cardiovascular disease. Fact or fantasy? *J Hypertens*. 2009; 27(1):3-8.
- Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res*. 2004; 64(19):6892-9.
- Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol*. 2007; 170(5):1445-53.
- Okamoto K, Fujisawa K, Hasunuma T, Kobata T, Sumida T, Nishioka K. Selective activation of the JNK/AP-1 pathway in Fas-mediated apoptosis of rheumatoid arthritis synoviocytes. *Arthritis Rheum*. 1997; 40(5):919-26.
- Panayiotidis MI, Bortner CD, Cidlowski JA. On the mechanism of ionic regulation of apoptosis: would the Na⁺/K⁺-ATPase please stand up? *Acta Physiol (Oxf)*. 2006; 187(1-2):205-15.
- Panayiotidis MI, Franco R, Bortner CD, Cidlowski JA. Ouabain-induced perturbations in intracellular ionic homeostasis regulate death receptor-mediated apoptosis. *Apoptosis*. 2010; 15(7):834-49.
- Pierre SV, Xie Z. The Na,K-ATPase receptor complex: its organization and membership. *Cell Biochem Biophys*. 2006; 46(3):303-16.
- Prassas I, Diamandis EP. Novel therapeutic applications of cardiac glycosides. *Nat Rev Drug Discov*. 2008; 7(11):926-35.
- Preiss R, Banaschak H. Na,K-ATPase in excitation-contraction coupling of vascular smooth muscle from cattle. *Acta Biol Med Ger*. 1979; 38(1):83-96.
- Qu WS, Tian DS, Guo ZB, Fang J, Zhang Q, Yu ZY, et al. Inhibition of EGFR/MAPK signaling reduces microglial inflammatory response and the associated

- secondary damage in rats after spinal cord injury. *J Neuroinflammation*. 2012; 9:178.
- Raghavendra PB, Sreenivasan Y, Manna SK. Oleandrin induces apoptosis in human, but not in murine cells: dephosphorylation of Akt, expression of FasL, and alteration of membrane fluidity. *Mol Immunol*. 2007; 44(9):2292-302.
- Rajasekaran SA, Barwe SP, Rajasekaran AK. Multiple functions of Na,K-ATPase in epithelial cells. *Semin Nephrol*. 2005; 25(5):328-34.
- Rajesh D, Stenzel RA, Howard SP. Perillyl alcohol as a radio-/chemosensitizer in malignant glioma. *J Biol Chem*. 2003; 278(38):35968-78.
- Razani B, Woodman SE, Lisanti MP. Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol Rev*. 2002; 54(3):431-67.
- Reinhard L, Tidow H, Clausen MJ, Nissen P. Na(+),K (+)-ATPase as a docking station: protein-protein complexes of the Na(+),K (+)-ATPase. *Cell Mol Life Sci*. 2013; 70(2):205-22.
- Ripple GH, Gould MN, Arzoomanian RZ, Alberti D, Feierabend C, Simon K, et al. Phase I clinical and pharmacokinetic study of perillyl alcohol administered four times a day. *Clin Cancer Res*. 2000; 6(2):390-6.
- Ripple GH, Gould MN, Stewart JA, Tutsch KD, Arzoomanian RZ, Alberti D, et al. Phase I clinical trial of perillyl alcohol administered daily. *Clin Cancer Res*. 1998; 4(5):1159-64.
- Rose AM, Valdes R. Understanding the sodium pump and its relevance to disease. *Clin Chem*. 1994; 40(9):1674-85.
- Rossier MF, Krause KH, Lew PD, Capponi AM, Vallotton MB. Control of cytosolic free calcium by intracellular organelles in bovine adrenal glomerulosa cells. Effects of sodium and inositol 1,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem*. 1987; 262(9):4053-8.
- Rovinski JM, Tewalt GL, Sneden AT. Maquiroside A, a new cytotoxic cardiac glycoside from *Maquira calophylla*. *J Nat Prod*. 1987; 50(2):211-6.

- Sakai H, Suzuki T, Maeda M, Takahashi Y, Horikawa N, Minamimura T, et al. Up-regulation of Na(+),K(+)-ATPase alpha 3-isoform and down-regulation of the alpha1-isoform in human colorectal cancer. *FEBS Lett.* 2004; 563(1-3):151-4.
- Satomi Y, Miyamoto S, Gould MN. Induction of AP-1 activity by perillyl alcohol in breast cancer cells. *Carcinogenesis.* 1999; 20(10):1957-61.
- Schwinger RH, Bundgaard H, Müller-Ehmsen J, Kjeldsen K. The Na, K-ATPase in the failing human heart. *Cardiovasc Res.* 2003; 57(4):913-20.
- Seligson DB, Rajasekaran SA, Yu H, Liu X, Eeva M, Tze S, et al. Na,K-adenosine triphosphatase alpha1-subunit predicts survival of renal clear cell carcinoma. *J Urol.* 2008; 179(1):338-45.
- Shen SS, Hamamoto ST, Bern HA, Steinhardt RA. Alteration of sodium transport in mouse mammary epithelium associated with neoplastic transformation. *Cancer Res.* 1978; 38(5):1356-61.
- Shinoda T, Ogawa H, Cornelius F, Toyoshima C. Crystal structure of the sodium-potassium pump at 2.4 Å resolution. *Nature.* 2009; 459(7245):446-50.
- Shiratori O. Growth inhibitory effect of cardiac glycosides and aglycones on neoplastic cells: in vitro and in vivo studies. *Gann.* 1967; 58(6):521-8.
- Skou JC. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim Biophys Acta.* 1957; 23(2):394-401.
- Skou JC. Enzymatic basis for active transport of Na⁺ and K⁺ across cell membrane. *Physiol Rev.* 1965; 45:596-617.
- Skou JC. The identification of the sodium pump. *Biosci Rep.* 2004; 24(4-5):436-51.
- Skoumal R, Szokodi I, Aro J, Földes G, Göz M, Seres L, et al. Involvement of endogenous ouabain-like compound in the cardiac hypertrophic process in vivo. *Life Sci.* 2007; 80(14):1303-10.
- Stearns V, Coop A, Singh B, Gallagher A, Yamauchi H, Lieberman R, et al. A pilot surrogate end point biomarker trial of perillyl alcohol in breast neoplasia. *Clin Cancer Res.* 2004; 10(22):7583-91.

- Stenkvis B. Is digitalis a therapy for breast carcinoma? *Oncol Rep.* 1999; 6(3):493-6.
- Stenkvis B, Bengtsson E, Eklund G, Eriksson O, Holmquist J, Nordin B, et al. Evidence of a modifying influence of heart glucosides on the development of breast cancer. *Anal Quant Cytol.* 1980; 2(1):49-54.
- Stenkvis B, Bengtsson E, Eriksson O, Holmquist J, Nordin B, Westman-Naeser S. Cardiac glycosides and breast cancer. *Lancet.* 1979; 1(8115):563.
- Steyn PS, van Heerden FR. Bufadienolides of plant and animal origin. *Nat Prod Rep.* 1998; 15(4):397-413.
- Tailler M, Senovilla L, Lainey E, Thépot S, Métivier D, Sébert M, et al. Antineoplastic activity of ouabain and pyrithione zinc in acute myeloid leukemia. *Oncogene.* 2012; 31(30):3536-46.
- Therien AG, Blostein R. Mechanisms of sodium pump regulation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000; 279(3):C541-66.
- Therien AG, Pu HX, Karlsh SJ, Blostein R. Molecular and functional studies of the gamma subunit of the sodium pump. *J Bioenerg Biomembr.* 2001; 33(5):407-14.
- Toyoshima C, Kanai R, Cornelius F. First crystal structures of Na⁺,K⁺-ATPase: new light on the oldest ion pump. *Structure.* 2011; 19(12):1732-8.
- Tymiak AA, Norman JA, Bolgar M, DiDonato GC, Lee H, Parker WL, et al. Physicochemical characterization of a ouabain isomer isolated from bovine hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90(17):8189-93.
- Uddin MN, Horvat D, Glaser SS, Mitchell BM, Puschett JB. Examination of the cellular mechanisms by which marinobufagenin inhibits cytotrophoblast function. *J Biol Chem.* 2008; 283(26):17946-53.
- Vescovi AL, Galli R, Reynolds BA. Brain tumour stem cells. *Nat Rev Cancer.* 2006; 6(6):425-36.
- Wang HY, O'Doherty GA. Modulators of Na/K-ATPase: a patent review. *Expert Opin Ther Pat.* 2012; 22(6):587-605.

- Wang H, Haas M, Liang M, Cai T, Tian J, Li S, et al. Ouabain assembles signaling cascades through the caveolar Na⁺/K⁺-ATPase. *J Biol Chem.* 2004; 279(17):17250-9.
- Wang H, Leenen FH. Brain sodium channels mediate increases in brain "ouabain" and blood pressure in Dahl S rats. *Hypertension.* 2002; 40(1):96-100.
- Wang Z, Zheng M, Li Z, Li R, Jia L, Xiong X, et al. Cardiac glycosides inhibit p53 synthesis by a mechanism relieved by Src or MAPK inhibition. *Cancer Res.* 2009; 69(16):6556-64.
- Wasserstrom JA, Aistrup GL. Digitalis: new actions for an old drug. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005; 289(5):H1781-93.
- Weidemann H. Na/K-ATPase, endogenous digitalis like compounds and cancer development -- a hypothesis. *Front Biosci.* 2005; 10:2165-76.
- Williams TM, Lisanti MP. The Caveolin genes: from cell biology to medicine. *Ann Med.* 2004; 36(8):584-95.
- Winnicka K, Bielawski K, Bielawska A. Cardiac glycosides in cancer research and cancer therapy. *Acta Pol Pharm.* 2006; 63(2):109-15.
- Winnicka K, Bielawski K, Bielawska A, Milyk W. Apoptosis-mediated cytotoxicity of ouabain, digoxin and proscillaridin A in the estrogen independent MDA-MB-231 breast cancer cells. *Arch Pharm Res.* 2007; 30(10):1216-24.
- Winnicka K, Bielawski K, Bielawska A, Milyk W. Dual effects of ouabain, digoxin and proscillaridin A on the regulation of apoptosis in human fibroblasts. *Nat Prod Res.* 2010; 24(3):274-85.
- Winnicka K, Bielawski K, Bielawska A, Surazyński A. Antiproliferative activity of derivatives of ouabain, digoxin and proscillaridin A in human MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells. *Biol Pharm Bull.* 2008; 31(6):1131-40.
- Xie CM, Chan WY, Yu S, Zhao J, Cheng CH. Bufalin induces autophagy-mediated cell death in human colon cancer cells through reactive oxygen species generation and JNK activation. *Free Radic Biol Med.* 2011; 51(7):1365-75.

- Xie Z, Cai T. Na⁺-K⁺-ATPase-mediated signal transduction: from protein interaction to cellular function. *Mol Interv.* 2003; 3(3):157-68.
- Xu M, Floyd HS, Greth SM, Chang WC, Lohman K, Stoyanova R, et al. Perillyl alcohol-mediated inhibition of lung cancer cell line proliferation: potential mechanisms for its chemotherapeutic effects. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2004; 195(2):232-46.
- Xu ZW, Wang FM, Gao MJ, Chen XY, Shan NN, Cheng SX, et al. Cardiotonic steroids attenuate ERK phosphorylation and generate cell cycle arrest to block human hepatoma cell growth. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2011; 125(3-5):181-91.
- Yang CH, Kao YH, Huang KS, Wang CY, Lin LW. *Cordyceps militaris* and mycelial fermentation induced apoptosis and autophagy of human glioblastoma cells. *Cell Death Dis.* 2012; 3(11):e431.
- Yeruva L, Pierre KJ, Elegbede A, Wang RC, Carper SW. Perillyl alcohol and perillic acid induced cell cycle arrest and apoptosis in non small cell lung cancer cells. *Cancer Lett.* 2007; 257(2):216-26.
- Yeung YT, Bryce NS, Adams S, Braidy N, Konayagi M, McDonald KL, et al. p38 MAPK inhibitors attenuate pro-inflammatory cytokine production and the invasiveness of human U251 glioblastoma cells. *J Neurooncol.* 2012; 109(1):35-44.
- Yu CH, Kan SF, Pu HF, Jea Chien E, Wang PS. Apoptotic signaling in bufalin- and cinobufagin-treated androgen-dependent and -independent human prostate cancer cells. *Cancer Sci.* 2008; 99(12):2467-76.
- Yu SP. Na⁽⁺⁾, K⁽⁺⁾-ATPase: the new face of an old player in pathogenesis and apoptotic/hybrid cell death. *Biochem Pharmacol.* 2003; 66(8):1601-9.
- Yuri T, Danbara N, Tsujita-Kyutoku M, Kiyozuka Y, Senzaki H, Shikata N, et al. Perillyl alcohol inhibits human breast cancer cell growth in vitro and in vivo. *Breast Cancer Res Treat.* 2004; 84(3):251-60.

Zhao Q, Guo Y, Feng B, Li L, Huang C, Jiao B. Neriifolin from seeds of *Cerbera manghas* L. induces cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Fitoterapia*. 2011; 82(5):735-41.