

MARGARETH MAYER

**ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE A ATIVIDADE ANTI-TUMORAL *IN VITRO* DO ÁCIDO ÚSNICO E A ATIVAÇÃO DA VIA METABÓLICA
p53**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas como um dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Biologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

ORIENTADORA: PROF^a DR^a. NEREIDE STELA SANTOS MAGALHÃES

ORIENTADORA EXTERNA: DR^a. VIRGÍNIA APPLEYARD

**RECIFE
FEVEREIRO, 2006**

Mayer, Margareth

Estudo da relação entre a atividade anti-tumoral *in vitro* do ácido úsnico e a ativação da via metabólica p53 / Margareth Mayer. – Recife: O Autor, 2006.

103 folhas : il., fig., tab., gráfs.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Ciências Biológicas. Biologia.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Ciências biológicas – Biotecnologia 2. Ácido úsnico – Atividade anticancerígena – Linhagens celulares humanas 3. Atividade gene p53 4. Genotoxicidade 5. Microtúbulos 6. Fármacos I. Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Nereide Stela Santos Magalhães (Orientadora)

Departamento de Bioquímica (UFPE), Recife-PE



Prof^a. Dr^a. Maria Tereza Santos Correia

Departamento de Bioquímica (UFPE), Recife-PE



Prof^a. Dr^a. Ana Maria dos Anjos Carneiro-Leão

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (UFRPE), Recife-PE



Prof^a. Dr^a. Silene Carneiro Nascimento

Instituto de Antibióticos (UFPE), Recife-PE



Prof^o. Dr^o. Remildo Albuquerque Nogueira

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (UFRPE), Recife-PE

Para:

Clarisse, Natacha, André, Beatrice, Creusa e
Izabel Eugênia

In Memoriam: Celina e Djalma

AGRADECIMENTOS

Realizar qualquer trabalho científico significa agrupar pessoas com atribuições correlatas, sem as quais seria mais difícil alcançar nossos objetivos. Devemos, pois, formalizar nossos agradecimentos.

À Prof^a. Dr^a. Nereide Stela Santos Magalhães, pesquisadora do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, orientadora desse trabalho, pelo suporte.

À Dr^a. Virgínia Appleyard, pesquisadora pós-doutora do Departamento de Cirurgia e Oncologia Molecular do Ninewells Hospital da Faculdade de Medicina da Universidade de Dundee, Escócia, orientadora externa desse trabalho pela sua competente orientação e apoio.

À Prof^a. Dr^a. Tereza Correia pelas orientações e conselhos tão pertinentes.

Aos Profs Drs. Ana Maria Carneiro Leão, Ana F. Porto e Romildo Nogueira pelos inúmeros esclarecimentos.

Às Professoras Heloisa Flora Bastos, Ângela Vasconcelos Almeida e Eneiri Albuquerque Coutinho, amigas e companheiras em tantos desafios.

À Ana Katarina de Araújo, do Comut da UFRPE, pela gentil e inestimável ajuda na obtenção de artigos científicos.

À Dr^a Izabel Eugênia da Costa e Silva que, com sua capacidade de síntese, nos ajudou a organizar as idéias.

A toda equipe do Departamento de Cirurgia e Oncologia Molecular do Ninewells Hospital da Faculdade de Medicina da Universidade de Dundee, Escócia, pela acolhida e ajuda na realização desse trabalho, especialmente ao Dr. Alastair Thompson e Karen Murray.

Aos professores do Programa de Doutorado do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco.

A Waldetrudes Pinto Jansen, bibliotecária da UFRPE, pelo apoio técnico na elaboração da bibliografia.

À Prof^a Dr^a Helena Simões, Diretora do DMFA da UFRPE e aos professores desse departamento, meus companheiros de ofício.

A todos os professores das redes públicas do Estado de Pernambuco, aos quais ensinei e com quem aprendi que compartilham comigo o ideal de re-significar o papel do PROFESSOR como aquele que luta pela valorização da vida, do conhecimento, da ética, da cidadania e do respeito à natureza.

A todos os meus amigos, queridos e éticos, que dão a minha vida a alegria de compartilhar.

SUMÁRIO

Lista de Ilustrações

Lista de Tabelas

Lista de Quadros

Lista de Abreviaturas

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 O ácido úsnico.....	19
1.1.1 Mecanismos de ação do ácido úsnico.....	22
1.1.2 Atividade anticancerígena do ácido úsnico.....	24
1.2 Câncer.....	26
1.2.1 Estágios no desenvolvimento de um tumor.....	28
1.2.2 Cancerização e ciclo celular.....	29
1.2.3 As seis características do câncer.....	33
1.3 p53, um gene supressor de tumor.....	35
1.3.1 p53 – uma via de sinalização num universo de conexões (<i>Bioregulatory Networks</i>).....	41
2. JUSTIFICATIVA.....	45
3. OBJETIVOS.....	47
REFERÊNCIAS.....	48
CAPÍTULO I.....	64
• Usnic acid, a non-genotoxic compound with anti-cancer properties.....	65

CAPÍTULO II.....	70
• Does usnic acid affect microtubules in human cancer cells?.....	71
• Legenda das figures do capítulo II.....	86
4. CONCLUSÕES.....	91
5. PERSPECTIVAS.....	92
ANEXOS.....	94
• Resumo I apresentado em 2005 à Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular decorrente do trabalho de tese.....	95
• Resumo II remetido em 2006 à Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular decorrente do trabalho de tese.....	96
• Cópia, com fator de impacto, da revista Anti-Cancer Drugs.....	97
• Normas de publicação da revista Anti-Cancer Drugs.....	98

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

Figura 1. Estrutura química do (+)-Ácido úsnico.....	20
Figura 2. Tipos e aspectos morfológicos de crescimento celular anormal.....	29
Figura 3. Ciclo celular de células somáticas.....	31
Figura 4. Pontos de checagem (<i>checkpoint</i>) do ciclo celular.....	32
Figura 5. As características principais de células cancerosas.....	34
Figura 6. Relação entre p53 e eventos relacionados ao ciclo celular e injúrias teciduais.....	35
Figura 7. Os quatro domínios distintos que constituem a proteína p53.....	37
Figura 8. Proteína p53 ligada à molécula de DNA por meio do domínio de ligação.....	38
Figura 9. Estrutura do domínio de oligomerização da proteína p53.....	39
Figura 10. Complexo tetramérico unido por meio do domínio de oligomerização.....	40
Figura 11. Estrutura molecular da proteína p53.....	40
Figura 12. Via metabólica envolvendo o p53.....	43

CAPÍTULO I

Figure 1. <i>In vitro</i> usnic acid dose-response assay.....	67
Figure 2. Effect of usnic acid on the induction of p53 and p21 and Ser ¹⁵ phosphorylation.....	67

CAPÍTULO II

Figure 1. Chemical structure of (+)-usnic acid.....87

Figure 2. Effect of usnic acid on the morphology of H1299 cells.....88

**Figure 3. Panel 1 - Effect of usnic acid on formation and stabilization of
microtubules in MCF7 cells.....89**

**Panel 2 - Effect of usnic acid on formation and stabilization of
microtubules in H1299 cells.....90**

PERSPECTIVAS

Figura 13. Inativação do p53 pelo Papilomavírus.....92

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Table 1. β-Gal assay for evaluating the effect of usnic acid on p53 transcriptional activity.....	67
---	-----------

CAPÍTULO II

Table 1. Effects of usnic acid on the mitotic indices of MCF7 and H1299 cells.....	85
---	-----------

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Algumas atividades biológicas do Ácido Úsnico descritas

na literatura.....21

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	American tissues culture collection
ATM	Ataxia telangiectasia mutada
AU	Ácido úsnico
BAX	Proteína indutora da apoptose
Bp	Pares de bases
CBP/p300	Acetiltransferases
Cdk2	Ciclina dependente de quinase
CREB	cAMP responsive element binding protein
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO-12	Monoclonal antibodies specific to the core of p53
ECL	Enhanced chemiluminescence
FPS15	Antibodies polyclonal specific for phospho-Ser15
HaCaT	Linhagem celular derivada de queratinócitos humanos
IC ₅₀	Concentração inibitória 50% população células
INCA	Instituto Nacional do Câncer
KD	KiloDalton
Mdm2	Proteína ubiquitina-ligase
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MPP ⁺	1-methyl-4-phenylpyridinium
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
OD ₍₅₄₀₎	Densidade ótica em 540nm
p21	Inibidor de complexo ciclina-cdk
p53	Proteína p53
p53	Gene responsável pela codificação da proteína p53
RGAFos-LacZ	Plasmídeo
Ser15	Serina 15
WAF1	Anticorpo monoclonal específico para p21
WHO	World Health Organization
β-GAL	β-Galactosidase

RESUMO

O ácido úsnico é um metabólito de líquen que apresenta uma grande variedade de atividades biológicas, dentre as quais, citotoxicidade frente a células oriundas de tumores malignos humanos. Apesar da existência de revisões recentes sobre a atividade citotóxica do ácido úsnico, o mecanismo de ação desta droga ainda não foi completamente elucidado. Não existe na literatura referência ao envolvimento do gene supressor de tumor *p53* com os efeitos do ácido úsnico. Na sua forma normal, a proteína *p53* atua em resposta a diferentes estresses celulares levando à transcrição de genes que induzem a retenção do ciclo celular ou apoptose. Entre as formas de atuação do *p53* está a repressão de genes que codificam proteínas associadas à polimerização e estabilização de microtúbulos. Estas funções são perdidas quando ocorrem mutações em sua via metabólica, o que acontece em mais de 50% dos tumores cancerosos humanos. O objetivo deste trabalho foi investigar se o mecanismo da ação anticancerígena do ácido úsnico envolve a ativação da via metabólica *p53*. Para estudos da sensibilidade de linhagens cancerígenas ao ácido úsnico, foram realizados ensaios pelo método colorimétrico do MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyl-tetrazolium bromide], utilizando-se várias concentrações do fármaco (1 a 60 μ M) por 72h, frente às seguintes linhagens de células malignas humanas: MCF7(câncer de mama, positiva para receptores de estrogênio, *p53* normal), MDA-MB-231(câncer de mama, negativa para receptores de estrogênio, *p53* inativo), H1299 (câncer de pulmão, nula para *p53*). Para determinar o envolvimento do *p53* na ação citotóxica do ácido úsnico, os níveis das proteínas *p53* e *p21* (um inibidor de quinases dependentes de ciclinas cuja expressão é controlada pelo *p53*) em células MCF7 tratadas com 29 μ M de ácido úsnico por 24h foram determinados utilizando-se ensaios western blot com o anticorpo monoclonal DO-12 (específico para *p53*) e WAF1 (específico para *p21*). Para verificar se a ação anticancerígena do ácido úsnico resulta em dano ao DNA celular, a fosforilação da SER15 do *p53* (um marcador para danos em DNA) foi investigada, após tratamento de células MCF7 com 29 μ M de ácido úsnico por 24h. Nestes estudos, ensaios western blot foram realizados com o anticorpo policlonal FOSFO-SER15, específico para serina fosforilada. Para verificar se o aumento nos níveis da proteína *p53* detectados após o tratamento com ácido úsnico eram acompanhados por um aumento em sua atividade transcricional, foram executados ensaios com β -Gal. Nesta metodologia utilizaram-se fibroblastos T22 de camundongos, portadores do plasmídeo RG Δ Fos-LacZ (contendo o resíduo de 36 pb do sítio de ligação para o *p53*), tratados com diferentes concentrações de ácido úsnico. Para a investigação dos efeitos do ácido úsnico na formação e estabilização de microtúbulos, células MCF7 foram tratadas com 29 μ M de ácido úsnico por 24h, fixadas em metanol e tratadas com anticorpo monoclonal anti- β -tubulina. O ácido úsnico mostrou atividade citotóxica frente às várias linhagens celulares oriundas de tumores malignos humanos, promovendo elevação nos níveis das proteínas *p53* e *p21*. Entretanto, este aumento não foi acompanhado de incremento na atividade transcricional nem da fosforilação da SER15 do *p53*. Também não foram detectadas modificações na formação dos microtúbulos. As propriedades anticancerígenas do ácido úsnico como agente não genotóxico que atua de uma forma independente do *p53* fazem dele um candidato em potencial para novas terapias de câncer.

PALAVRAS CHAVE

Ácido Úsnico, proteína p53, atividade gene P53, genotoxicidade, linhagens celulares tumorais: MCF7, MDA-MB-231 e H1299, microtubulos.

ABSTRACT

Usnic acid is a metabolite of lichen that exerts a wide variety of biological activities including cytotoxicity against cells derived from human malignant tumours. Although cytotoxicity of usnic acid has been extensively reviewed, its mechanism of action is still unclear. There are no data in the literature about the involvement of the tumour suppressor p53 with the effects of usnic acid. Wild type p53 responds to different forms of cellular stress by acting as a transcription factor, regulating the expression of genes that will lead to inhibition of cellular proliferation by inducing cell cycle arrest or apoptosis. p53 actions include the down regulation of genes that encode proteins associated to the polymerization and stabilization of microtubules. These functions are lost when mutations occur in the p53 pathway, which happens in more than 50% of human cancers. The objective of this work was to investigate the relationship between the antineoplastic activity of usnic acid and p53 pathway. To establish the sensitivity of cancer cell lines to usnic acid, MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium) assays were performed using a variety of drug concentrations (1 to 60 μ M) for 72h against the following cell lines: MCF7 (oestrogen positive, wild type for p53) and MDA-MB-231 (oestrogen negative, non-functional p53) and the lung cancer cell line H1299 (p53 null). To investigate the involvement of p53 in the cytotoxic activity of usnic acid, the protein levels of p53 and p21 (a cyclin dependent kinase inhibitor whose expression is under the control of p53) in MCF7 cells treated with 29 μ M usnic acid for 24h were determined with western blot assays using the antibodies DO-12 (specific for p53) and WAF1 (specific for p21). To establish whether the anticancer activity of usnic acid results in DNA damage, the phosphorylation of p53 SER15 (a DNA damage marker) was investigated following MCF7 cells treatment with 29 μ M usnic acid for 24h. For this study the FPS15 antibody (polyclonal, specific for phosphor-SER15) was used. To determine if the transcriptional activity of p53 correlated with the increase in its protein level the β -Gal assay was performed. T22 mouse fibroblast cells bearing the reporter plasmid RG Δ Fos-LacZ (containing a 36 bp p53 binding site) were treated with different concentrations of usnic acid. To investigate the effects of usnic acid on the polymerization and stabilization of microtubules, MCF7 cells were exposed to 29 μ M usnic acid for 24h, fixed with methanol and treated with monoclonal anti- β -tubulin antibody. Usnic acid showed cytotoxic activity against the several human cancer cells tested, with increase in the p53 and p21 protein levels. However, this was not correlated with increase in p53 transcriptional activity or with p53 SER15 phosphorylation. Furthermore, no modifications in the microtubule formation were detected. The property of usnic acid as a non-genotoxic anticancer agent that works in a p53-independent manner makes it a potential candidate for novel cancer therapy.

KEY WORDS

Usnic acid, p53 activity, genotoxicity, MCF7, MDA-MB-231, H1299 cells, microtubules.

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença genética em nível molecular que afeta uma em cada três pessoas no planeta (PECORINO, 2005). Pelo menos no último século, todos os esforços intelectuais e tecnológicos empreendidos na cura dessa doença contribuíram para revelar um intrincado mecanismo de comunicação molecular, intra e intercelular que, em condições fisiológicas, atua na manutenção da homeostase dos sistemas vivos. Essa complexa rede de sinalização é constituída por vias metabólicas formadas de genes, proteínas e pequenas moléculas que contêm inúmeros pontos de regulação, sinais divergentes e locais de cruzamento com outras cascatas de sinalização, exercendo mútuas influências (TANIGUCHI et al., 2006).

Segundo Barabási (2004), a chave para pesquisa biomédica pós-genômica é catalogar sistematicamente todas as moléculas e suas interações nas células vivas, para entender como seu funcionamento e interação determinam os princípios que regem essa maquinaria complexa, tanto em nível celular quanto intercelular.

De posse desse conhecimento é possível entender como os processos de carcinogênese desvirtuam essas vias sinalizadoras, transformando células normais em células cancerosas, que passam a comandar o metabolismo celular em prol do seu próprio desenvolvimento. Investigar as correlações entre as rotas moleculares dessas vias e a ação de substâncias bioativas, pode dar suporte ao desenvolvimento de terapias mais efetivas com a utilização de fármacos direcionados a alvos específicos, de modo a maximizar os seus efeitos terapêuticos contra o câncer.

Nesse contexto, este trabalho se propõe a acrescentar mais uma peça no enorme quebra-cabeças que é estabelecer conexões entre a ação de fármacos, como o Ácido Úsnico, e vias metabólicas envolvidas nos processos de cancerização. Nessa perspectiva, o entendimento dos mecanismos de ação do AU frente a células oriundas de linhagens tumorais humanas, que expressam ou não vias de sinalização envolvidas nos processos de divisão celular e cancerização, pode dar suporte a possíveis usos terapêuticos desse fármaco.

1.1. O ÁCIDO ÚSNICO

Os líquens são formados por uma associação simbiótica entre representantes de três reinos. Os parceiros dominantes, os fungos (reino Fungi), associam-se a algas (reino Protista) e/ou cianobactérias (reino Monera), os quais lhes fornecem alimentos produzidos por fotossíntese (BRODO et al., 2005). Considerando-se o tipo de parceria estabelecida, o liquenologista Trevor Goward (2005) sugere que os “líquens são fungos que descobriram a agricultura”.

Como forma de adaptação à vida em habitats marginais, os líquens sintetizam um arsenal de mais de 800 tipos de metabólitos já identificados (MÜLLER, 2001). São compostos bioquímicos que atuam como controladores da exposição à luz, repelentes de herbívoros (NIMIS & SKERT, 2006), microbicidas e substâncias que inibem a proliferação de outros líquens em habitats muito competitivos (BRODO et al., 2005). Estes compostos vêm sendo utilizados pelas suas propriedades terapêuticas na medicina tradicional em várias sociedades ao longo dos séculos (COCCHIETTO et al., 2002; HUNECK, 1999).

Dentre os metabólitos liquênicos mais estudados estão os depsídeos, as depsidonas, dibenzofuranos, xantonas, antraquinonas e ácidos úsnicos (HONDA et al., 1998). O ácido úsnico (AU) ou [2,6-diacetil-7,9-dihidroxi-8,9b-dimetil-1,3(2h,9bH)-dibenzeno-furadiona], cuja fórmula estrutural é $C_{18}H_{16}O_7$, ilustrado na Figura 1, ocorre na natureza em duas formas enantioméricas (+) e (-), dependendo da projeção do grupo metila angular do carbono quiral 9b. Sua massa molecular expressa como equivalente grama é estimada em 344,32 g, sendo um dos mais abundantes metabólitos secundários de líquens. Segundo Ingólfssdóttir (2002), desde que foi isolado pela primeira vez em 1844, o AU tem sido o metabólito mais

estudado e um dos poucos disponíveis comercialmente na forma tautomérica (+)-Ácido Úsnico (Sigma Aldrich).

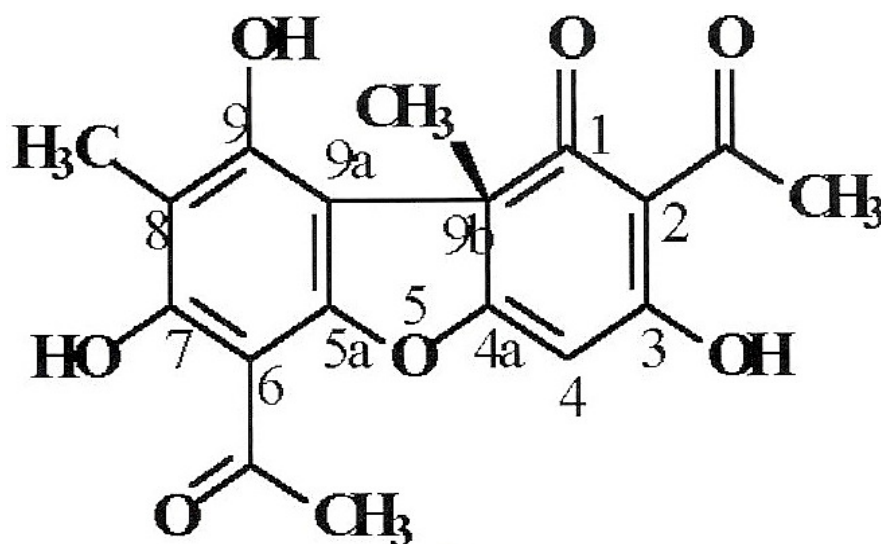


Figura 1. Estrutura química do (+)-Ácido úsnico (SANTOS et al., 2005).

Usado inicialmente para o tratamento da tuberculose pulmonar (VARTIA, 1973), sua ação vem sendo amplamente pesquisada nos cinco continentes, frente a variados modelos biológicos *in vitro* e *in vivo*, em diferentes vias de administração e dosagens, por uma gama de pesquisadores de diversas especialidades, como resumido no Quadro 1.

Quadro 1 – Algumas atividades biológicas do Ácido Úsnico descritas na literatura

ATIVIDADE BIOLÓGICA	MODELO TESTADO	REFERÊNCIAS
Antiproliferativa, antimitótica e citotóxica	<i>In vitro</i> : L1210 (carcinoma Lewis); P388 (leucemia murina)	TAKAI et al. (1979)
	<i>In vitro</i> : HaCaT (linhagem celular derivada de queratinócitos humanos)	SUNIL KUMAR & MÜLLER (1999a e 1999b)
	<i>In vitro</i> : <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (efeito na atividade respiratória), <i>Nicotiana tabacum</i> (células e protoplastos), K-562 e HEC-50	CARDARELLI et al. (1997) KRISTMUNDSDÓTTIR, et al. (2005)
	<i>In vitro</i> : NCI-H292 (carcinoma de pulmão humano)	SANTOS et al. (2005)
	<i>In vivo</i> : Sarcoma-180	RIBEIRO-COSTA et al. (2004)
Antimicrobiana Antibiótica	<i>In vitro</i> : <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Mycobacterium aurum</i>	LAUTERWEIN et al. (1995) INGÓLFSDÓTTIR et al. (1998); GARCIA ROWE et al. (1999); COCCHIETTO et al. (2002); TURK et al. (2003); YILMAZ et al. (2004);
Antifúngica	Fungos de plantas: <i>P. infestans</i>	HALAMA et al. (2004)
Antiparasitária	<i>Trypanosoma cruzi</i>	CARVALHO et al. (2005)
	Leishmaniose cutânea	FOURNET et al. (1997)
Antiviral	Vírus Epstein-Barr	CAMPANELLA et al. (2002) SCIRPA et al. (1999); YAMAMOTO et al. (1995).
Analgésica e antipirética	<i>In vivo</i> : edema em ratos	OKUYAMA et al. (1995)
Antiinflamatória	<i>In vivo</i> : edema de pata em ratos	VIJAYAKUMAR et al. (2000)
Modulador imunológico	Macrófagos peritoniais de camundongos <i>in vitro</i>	SANTOS et al. (2004)

1.1.1. MECANISMOS DE AÇÃO DO ÁCIDO ÚSNICO

Embora as pesquisas utilizando o ácido úsnico revelem uma gama de diferentes atividades, frente a inúmeros modelos biológicos, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, o mecanismo de ação molecular deste fármaco ainda não está plenamente esclarecido. Em suas revisões, Müller (2001), Cocchietto e Ingólfssdóttir (2002) referem-se, na maioria das vezes, a atividades biológicas e ressaltam também a necessidade de uma maior compreensão dos eventos moleculares mediados por este princípio ativo.

Quanto aos mecanismos da ação molecular, os efeitos antimitóticos do AU podem ser atribuídos à redução das concentrações de RNA em hepatócitos de rato, numa relação dose-dependente (CARDARELLI et al., 1997). Esse relato é compatível com os achados de Yamamoto (1995) quanto à inibição da atividade do vírus Epstein-Barr, assim como os de Al-Bekaire (1991) e Campanella (2002) sobre a interferência do AU na síntese de RNA.

Em concordância com esta tese, foi patenteado pela Universidade da Califórnia um método de inibição da função de moléculas de RNA ou células contendo RNA pelo uso de substâncias contendo AU ou seus sais (JAMES et al., 2003). Este método se propõe a inibir o desenvolvimento de fungos, bactérias e, principalmente, vírus, atuando contra retrovírus (HIV), pólio RNA e diversos tipos de hepatite entre outros.

Um outro aspecto importante quanto aos mecanismos de ação do AU, refere-se aos seus efeitos frente ao metabolismo energético. Söderberg (1953) observou que a administração intravenosa de usneato de sódio em gatos, numa concentração

de 10mg/kg provocava um aumento da taxa metabólica com sintomas como hiperventilação, aumento do consumo de oxigênio e da temperatura do corpo.

Nessa mesma perspectiva, Abo-Khatwa (1996), expondo mitocôndrias de fígado de rato a 1 μ M de AU, apontou para uma ação desacopladora da fosforilação oxidativa e aumento da atividade da enzima ATPase. Sugeriu que a atividade antimicrobiana do AU seja uma decorrência das alterações no metabolismo energético das células. Quanto às atividades antiinflamatória, analgésica e antipirética poderiam estar relacionadas à inibição da síntese de prostaglandina, como efeito, também, do desacoplamento da fosforilação oxidativa (VIJAYAKUMAR et al., 2000).

Por volta de 2002, nos EUA, surgiu um fato novo relacionado à ingestão de fitoterápicos contendo AU, os quais prometiam um emagrecimento rápido devido à queima de gordura decorrente de um aumento na taxa metabólica. Esse medicamento era o LipoKinetix® (GRADY et al., 2003) e, após a ingestão dos comprimidos contendo 300mg de ácido úsnico puro, três vezes ao dia, durante três semanas, sete pacientes apresentaram quadros graves de insuficiência hepática aguda. Entre estes, uma paciente que abriu o quadro patológico apresentando coma, submeteu-se ao transplante de fígado como única alternativa de sobrevivência. Em paralelo, um outro paciente foi a óbito (FAVREAU et al. 2002; NEFF et al. 2004; DURAZO et al. 2004; HAN et al. 2004; CORRECHÉ et al., 2004; LAZEROW et al., 2005). Essa situação criou uma demanda para investigações acerca dos efeitos do AU em células hepáticas e vários grupos de pesquisa debruçaram-se sobre esse tema.

Estudando o efeito do AU sobre a viabilidade de uma cultura primária de hepatócitos de camundongos, Han e colaboradores (2004) demonstraram que a

exposição das células a AU 5 μ M por 8 horas induzia necrose em 50% das células. O tratamento dos hepatócitos com AU na mesma dose, durante 2 horas, reduziu em 40% os níveis de ATP, resultado compatível com um estresse na respiração mitocondrial e no metabolismo energético das células. Assim, os achados de Abo-Khatwa (1996) e Pramyothin (2004) acerca da ação desacopladora da fosforilação oxidativa e conseqüente inibição da função mitocondrial foram confirmados. Essa alteração metabólica se reflete em um aumento nas espécies reativas de oxigênio, caracterizando o estresse oxidativo envolvido na indução de necrose e apoptose em culturas de células hepáticas (HAN et al., 2004).

Por outro lado, existe referência a efeitos antioxidantes da administração *in vivo* de AU em ratos portadores de úlcera gástrica induzida por indometacina, com redução de danos oxidativos e infiltrações inflamatórias por neutrófilos (ODABASOGLU et al., 2006).

1.1.2. ATIVIDADE ANTICANCERÍGENA DO ÁCIDO ÚSNICO

A atividade anticancerígena do ácido úsnico *in vitro* foi descrita pela primeira vez por Kupchan & Kopperman (1975) frente a células de carcinoma de pulmão de Lewis. Suas atividades mutagênica (SHIBAMOTO & WEI, 1984), anti-tumoral e citotóxica têm sido estudadas frente a modelos *in vivo* (RIBEIRO-COSTA et al., 2004; SANTOS et al., 2005), além de células normais e de linhagens oriundas de tumores malignos humanos (BUCAR et al., 2004; MAYER et al., 2005; BÉZIVIN et al., 2003; PERRY et al., 1999; CARDARELLI et al., 1997; TAKAI et al., 1979; ÖGMUNDSDÓTTIR et al., 1998). A ação citotóxica e anti-proliferativa *in vitro* tem

sido observada contra: T-47-D (câncer de mama), Panc-1 (pâncreas), PC-3 (adenocarcinoma de próstata) por Kristmundsdóttir (2005); PC-3 (próstata), MDA-MB-231(mama), KB (laringe) por Pereira (1994); T-47D e ZR-75-1 (ambas de carcinoma mamário), K-562 (leucemia) por Ögmundsdóttir (1998), MCF7 (mama), DU145 e U251 por Bézivin (2004), e HEP-2 (carcinoma epidermóide de laringe), NCI-H292 (carcinoma de pulmão) por Rolim-Santos (2005).

Tais resultados, ao serem analisados em conjunto, são sugestivos do seu potencial uso como agente quimioterápico contra o câncer. Entretanto, ainda há muito que esclarecer quanto aos mecanismos da sua ação anticancerígena.

A maioria das substâncias bioativas exerce sua atividade anticancerígena pelo bloqueio da progressão do ciclo celular ou disparando o mecanismo de morte celular por apoptose (SON et al., 2003). Investigações quanto à toxicidade do ácido úsnico e a indução de apoptose (CORRECHÉ et al., 2004; BÉZIVIN et al., 2004) em linhagens de células tumorais e hepatócitos, apontam para a necessidade de estudos mais aprofundados sobre as relações desse princípio ativo com a ativação do gene p53, considerando seu papel chave na indução da apoptose e nos processos de cancerização. Esses dois objetivos poderão ser viabilizados pelo uso de linhagens celulares oriundas de tumores humanos nulos e positivos para o gene p53.

1.2. CÂNCER

Segundo Weinberg (1996), o termo câncer refere-se a mais de cem formas de doenças. Quase todo tecido do corpo pode apresentar malignidade e alguns podem apresentar diferentes tipos. No entanto, os processos básicos de cancerização parecem ser similares.

Os trilhões de células saudáveis do corpo vivem em um complexo sistema de condomínio, regulando mutuamente o nível de proliferação, de forma a manter o tamanho e a arquitetura apropriados aos tecidos corporais (WEINBERG, 1996). Nesta comunidade, com exceção das células brancas do sangue, que patrulham o corpo em busca de microorganismos e tecidos danificados, cada célula ocupa um lugar e tem uma função apropriada, permanecendo no tecido do qual faz parte (RUOSLAHTI, 1996). As células cancerosas, por sua vez, proliferam desobedecendo aos controles normais, sendo assim neoplásicas, e são capazes de invadir e colonizar os tecidos circundantes, sendo, portanto, malignas (ALBERTS et al., 2004).

Após a década de 1980, os cientistas passaram a aprofundar-se nas bases moleculares que governam o desenvolvimento de um câncer. Nos últimos anos foram identificados mais de cem genes cujas alterações se repetem em cânceres humanos (ALBERTS et al., 2004).

Oliff e colaboradores (1996), analisando os alvos moleculares da terapia do câncer, identificaram três classes de genes envolvidos nos processos de cancerização. A primeira classe, em que uma mutação em genes relacionados com o ciclo celular cause um aumento da função levando ao desenvolvimento de um tumor, é conhecida como **proto-oncogenes** e seus mutantes hiperativos

denominados oncogenes. Um oncogene atua como um gene dominante e a mutação em apenas um alelo é suficiente para que ele se manifeste. Estes genes estimulam a progressão das células através das etapas do ciclo celular, ou seja, as seqüências de eventos através dos quais as células aumentam de volume, duplicam seu DNA e se dividem passando uma cópia completa de seu patrimônio genético para cada uma das duas células-filhas.

Membros da segunda classe, os **genes supressores de tumor**, codificam proteínas que inibem a divisão celular (WEINBERG, 1996), restringindo a proliferação das células. Nestes, as mutações perigosas decorrem da perda de função. No terceiro grupo, estão os genes que governam a **replicação e reparo do DNA**.

Hoje, há um consenso, entre os biólogos moleculares que investigam o câncer, da necessidade de uma mutação genética para que um câncer possa surgir (STEELE et al., 1998; WEINBERG, 1996; OLIFF et al., 1996; ABRAHAM, 2001; ALBERTS et al., 2004). A maioria dos tumores, na verdade, possui mutações em um ou em vários genes das categorias citadas.

1.2.1. ESTÁGIOS NO DESENVOLVIMENTO DE UM TUMOR

Tomando como base um tumor maligno do tecido epitelial, um carcinoma, segundo Weinberg (1996), podem ser identificados cinco estágios no seu desenvolvimento. Inicialmente, ocorre uma mutação em uma célula que a deixa geneticamente propensa a proliferar. Num segundo estágio, a célula alterada e seus descendentes parecem normais, mas elas se reproduzem muito levando a uma condição conhecida como hiperplasia. Após anos, uma em um milhão dessas células, pode sofrer uma nova mutação que leve a uma maior perda de controle do ciclo celular. A partir daí, além da proliferação excessiva, algumas células passam a apresentar alterações na forma e na orientação espacial no tecido, características da displasia. As células afetadas podem tornar-se, a partir de novas mutações, cada vez mais anormais em crescimento e aparência, compondo uma massa tumoral denominada câncer *in situ*, quando as células que o constituem ainda não ultrapassaram as fronteiras entre os tecidos (PECORINO, 2005).

O tumor pode permanecer indefinidamente contido, ou adquirir mutações genéticas adicionais que o levem a invadir os tecidos subjacentes, e disseminar células através de vasos sanguíneos e linfáticos. Nesta condição, o tumor tornou-se maligno e, como um câncer invasivo, está pronto para migrar estabelecendo novos tumores em outros tecidos do corpo, as metástases, que podem ser letais por provocar falência de órgãos vitais nos quais se instalem. Portanto, o desenvolvimento de um tumor é um processo complexo, com várias etapas que envolvem várias mutações genéticas, que causam diferentes alterações morfológicas próprias das fases evolutivas da doença como exemplificado na Figura 2.

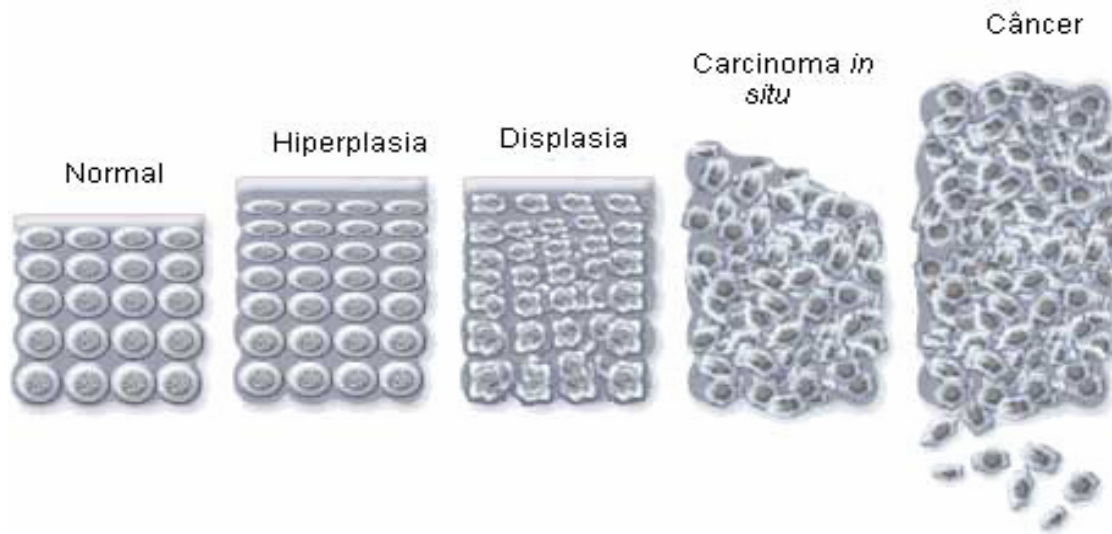


Figura 2. Tipos e aspectos morfológicos de crescimento celular anormal
(PETERSON, 2005).

Essas mutações são decorrentes de danos em genes que regulam diretamente as etapas do ciclo celular (SHERR, 1996).

1.2.2. CANCERIZAÇÃO E CICLO CELULAR

O ciclo celular tem como função duplicar fielmente o DNA nos cromossomos e, com precisão, segregar as cópias dentro de duas células-filhas geneticamente idênticas (ALBERTS et al., 2004). Essas células reproduzem-se por meio de uma seqüência ordenada de eventos controlados por proteínas regulatórias que constituem o **sistema de controle do ciclo celular**. Este sistema bioquímico de controle responde a sinais tanto internos quanto externos à célula e tem um papel

central na regulação do número e da diferenciação das células nos tecidos corporais.

Segundo Peterson (2005), o ciclo celular das células somáticas (Figura 3) é constituído de duas fases principais:

- Mitose (divisão)
- Interfase (crescimento e diferenciação)

Mitose é o processo pelo qual cada célula produz um par de células-filhas geneticamente idênticas. Interfase é o período em que as células crescem e exercem suas atividades metabólicas normais. Também é nesta fase que as células se preparam para a divisão. A interfase é constituída por três subfases:

- **G₁**
- **S**
- **G₂**

Segundo Alberts (2004), o processo de duplicação do DNA é característico da **fase S** (S de síntese), e a segregação e divisão da **fase M** (M de mitose). A fase **M** caracteriza-se conjuntamente pelos processos de divisão nuclear (mitose) e de divisão celular (citocinese). A mitose inicia-se com a condensação dos cromossomos, pré-requisito para a sua segregação e vai até a reorganização do núcleo quando a célula está pronta para a divisão citoplasmática, a citocinese. Este percurso é caracterizado por cinco etapas, a saber: prófase, pró-metáfase, metáfase, anáfase e telófase.

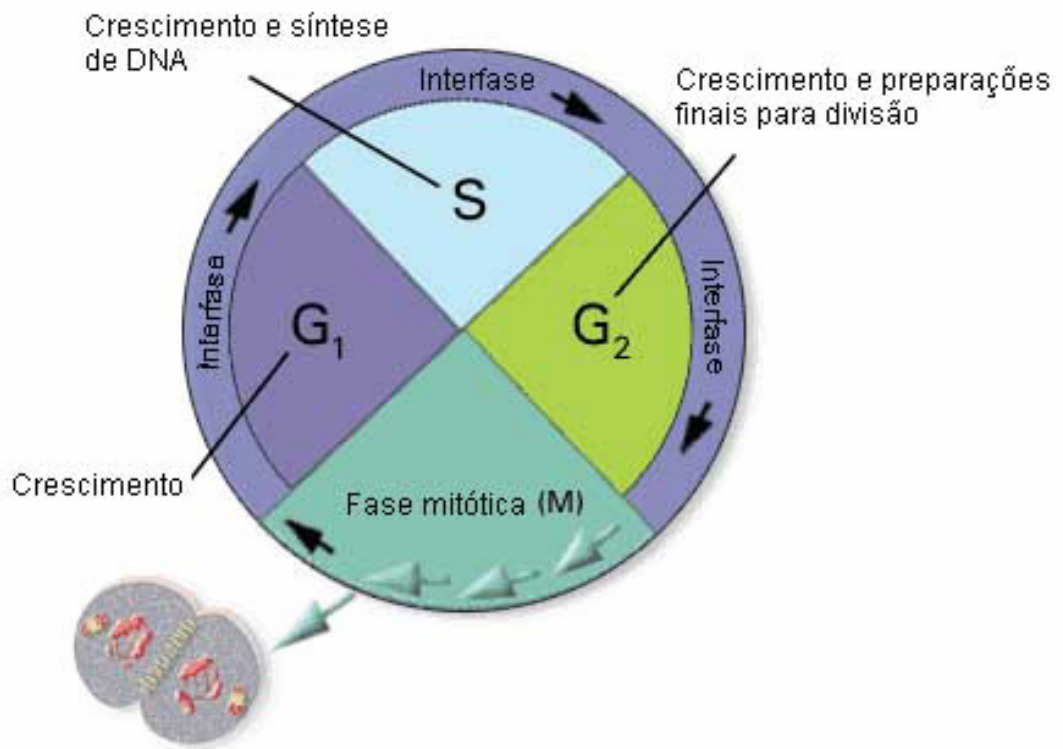


Figura 3. Ciclo celular de células somáticas (PETERSON, 2005).

A fase **S** ocupa metade do tempo do ciclo em células de mamíferos. No entanto, as células precisam de muito mais tempo para crescer e duplicar suas proteínas e organelas do que aquele que necessita para duplicar o DNA e dividir-se. Este tempo extra que as células necessitam constitui as **fases de intervalos** que são - uma **fase G₁** entre a fase M e a fase S e uma fase **G₂** entre a fase S e a fase M. Desta forma, o ciclo celular nas células eucarióticas é constituído das seguintes fases sequenciais: **G₁, S, G₂ e M**. As fases **G₁, S, G₂**, conjuntamente, constituem a **interfase** (Figura 3). Muitas células nos organismos adultos não estão em processo de divisão celular, elas estão quiescentes, ou seja, passam por um período de inatividade chamado **G₀** (PECORINO, 2005).

As duas fases de intervalo fornecem tempo para a célula monitorar, se as condições internas e externas são favoráveis à entrada na fase S ou M do ciclo

celular. A fase G_1 pode ter duração variada dependendo, por exemplo, dos sinais extracelulares oriundos de outras células. Segundo Sherr (1996), os processos de cancerização têm como alvo principal os reguladores da saída da célula da fase G_1 . Durante esta fase, as células respondem a sinais extracelulares que a impulsionam no sentido de outra divisão, ou promovem uma parada na seqüência de eventos do ciclo caracterizado por um estado de repouso próprio da fase G_0 (*arrest*). Diferentemente das fases S , G_2 e M , a saída da fase G_1 depende da estimulação por mitógenos (fatores de crescimento), e pode ser bloqueada por citocinas antiproliferativas. Existem vários pontos de checagem (*checkpoints*) das condições de replicação do DNA, da separação dos cromossomos e sua fixação no fuso mitótico (KASTAN & BARTEK, 2004) (Figura 4).

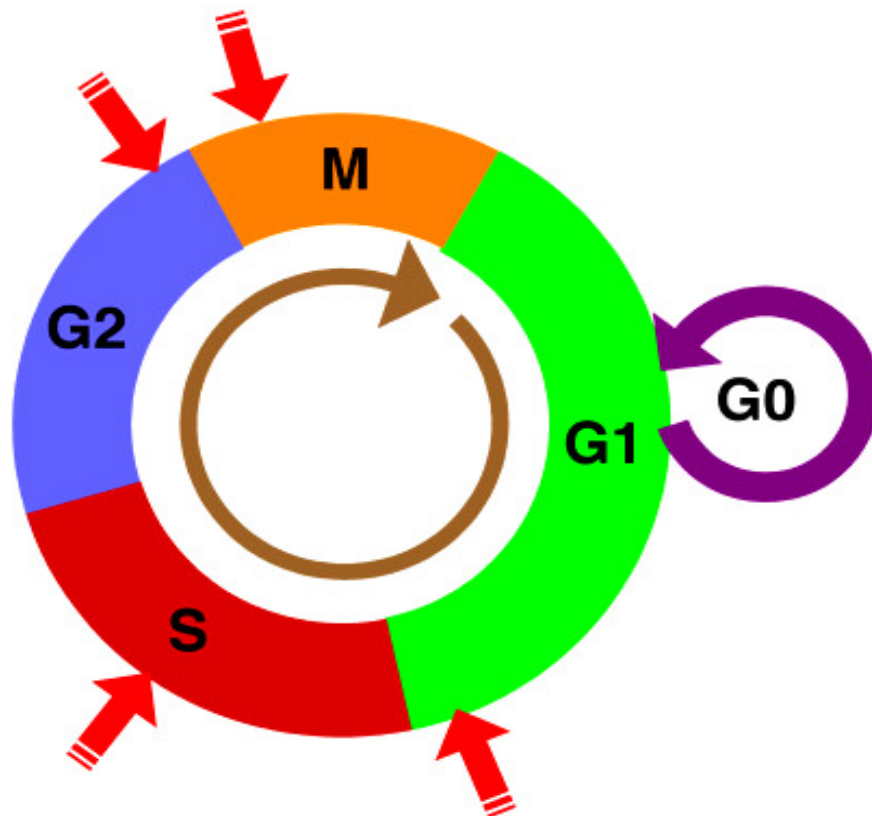


Figura 4. Pontos de checagem (*checkpoint*) do ciclo celular (SULLIVAN, 2006).

Estes pontos de checagem, representados na Figura 4, fazem parte de vias de sinalização bioquímica (principalmente fosforilação), cuja função é detectar danos ou anormalidades, assim como coordenar a progressão no ciclo celular.

A decisão de dividir ocorre quando a célula passa pelo **ponto de restrição ou de checagem** (*checkpoint*) **em G₁** após o qual a célula se torna refratária a sinais regulatórios de crescimento de origem extracelular permanecendo, entretanto, sensível aos sinais intracelulares oriundos dos outros pontos de checagem (ABRAHAM, 2001).

Os componentes dos pontos de checagem são proteínas que atuam como sensores de danos do DNA, transdutores e efetores de sinais. Alterações na função destes pontos de checagem podem permitir que danos ocorridos não sejam devidamente detectados levando à perpetuação de mutações perigosas, podendo resultar em carcinogênese (PECORINO, 2005).

1.2.3. AS SEIS CARACTERÍSTICAS BÁSICAS DO CÂNCER

Após análises acuradas, Hanahan e Weinberg (2000) definiram seis características presentes na maioria, senão em todas as formas de câncer, decorrentes de mutações nas diversas vias de sinalização (Figura 5), a saber:

- Auto-suficiência em sinais de crescimento – as células cancerosas não dependem da sinalização de fatores de crescimento normal;
- Evasão dos sinais inibitórios de crescimento – as células cancerosas não respondem aos sinais inibitórios de crescimento;
- Evasão da apoptose – as células cancerosas não respondem aos sinais de apoptose;

- Replicação ilimitada - As células normais têm controle sobre o número de duplicações permitidas, após as quais se tornam senescentes. Este mecanismo de controle é o encurtamento dos telômeros (porções terminais dos cromossomos), que ocorre a cada duplicação do DNA. As células cancerosas mantêm o comprimento dos telômeros intactos;
- Angiogênese – as células cancerosas induzem o crescimento de novos vasos sanguíneos necessários à sobrevivência e expansão do tumor;
- Invasão dos tecidos e metástases – mutações podem alterar a atividade de enzimas envolvidas na adesão célula-célula e célula-matriz extracelular resultando na invasão de outros tecidos.



Figura 5. As características principais de células cancerosas (HANAHAN & WEINBERG, 2000).

1.3. *p53*, UM GENE SUPRESSOR DE TUMOR

O *p53* pertence à categoria dos genes supressores de tumor. Está localizado no cromossomo 17 p13, contém 11 exons, que codificam uma fosfoproteína de 53kD (PECORINO, 2005) e atua regulando o ciclo celular. O gene *p53* foi originalmente descoberto em 1979 por David Lane da Universidade de Dundee, na Escócia, Arnold Levine da Universidade de Princeton, em Nova Jersey e William Old do Centro Sloan-Kettering de Estudos de Câncer, em Nova Iorque. Em face da proteína *p53* ter um papel central nos mecanismos supressores de tumores das células, o gene *p53* vem sendo intitulado de “guardião do genoma” (PECORINO, 2005). A habilidade de *p53* funcionar como um fator de transcrição é considerada como sua principal propriedade fisiológica (VOUSDEN, 2005). Ele modula a resposta celular a diferentes tipos de estresses, incluindo a ação de oncogenes (LANE, 2005), como representado na Figura 6.

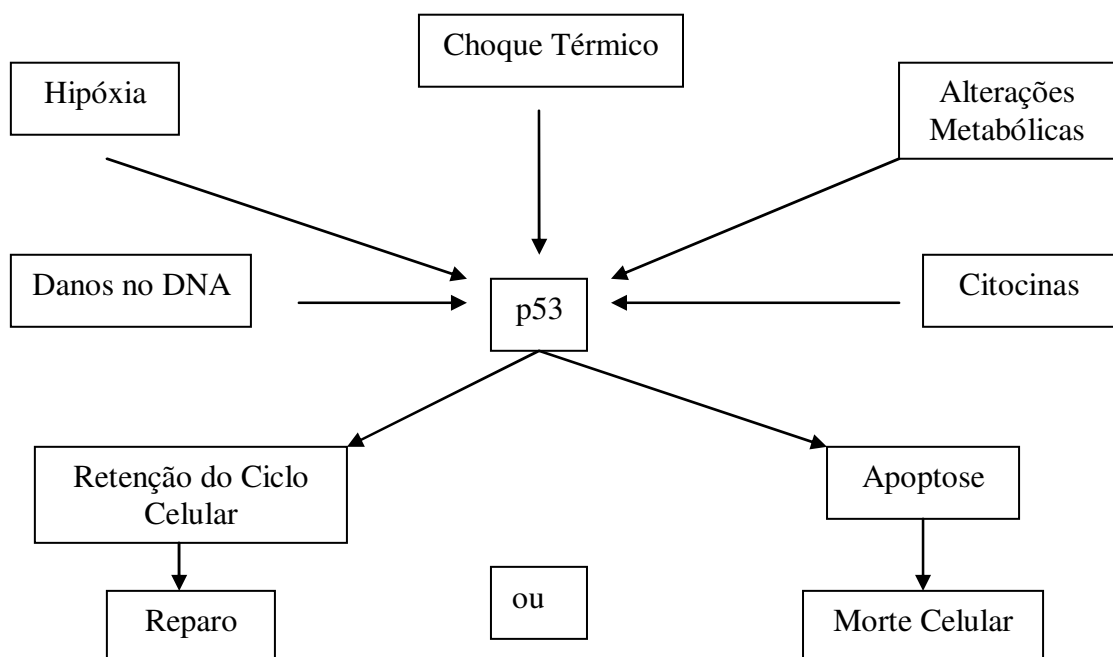


Figura 6. Relação entre *p53* e eventos relacionados ao ciclo celular e injúrias teciduais (STEELE et al., 1998).

Esses estímulos ativam a proteína p53 que desencadeia uma série de eventos, podendo culminar com a retenção do ciclo celular (*arrest*). A retenção ocorre por meio de diferentes mecanismos como a repressão de genes responsáveis pela codificação de proteínas associadas à polimerização e estabilização de microtúbulos (MURPHY et al., 1996), ou a morte celular programada (apoptose) mantendo assim a estabilidade genética do organismo (STEELE et al., 1998).

Estes dois processos celulares e a atividade da via p53 guardam entre si relações muito próximas, na medida em que, tanto as alterações na dinâmica de polimerização dos microtúbulos ativam a proteína p53, quanto o processo de apoptose mediado por essa proteína promove o colapso do citoesqueleto celular, incluindo os microtúbulos do fuso mitótico (JORDAN, 2002). Estes três fatores estão imbricados e, a relação entre eles tem sido alvo de pesquisas tanto no que refere às defesas do organismo contra transformações neoplásicas, quanto ao uso terapêutico de produtos naturais frente a diversos tipos de cânceres, inclusive em estágio avançado (CHANG et al., 2006; ORICCHIO et al., 2006).

Estruturalmente, a proteína p53 contém quatro domínios distintos (Figura 7):

- N-terminal – domínio de transativação e sítio de ligação ao Mdm2, uma ubiquitina ligase;
- Sítio de ligação ao DNA;
- Domínio de oligomerização;
- C-terminal – domínio regulatório.

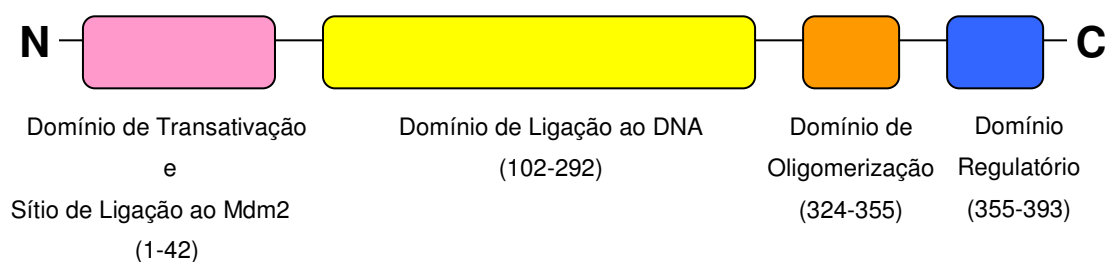


Figura 7. Os quatro domínios distintos que constituem a proteína p53 (PECORINO, 2005).

Segundo Prives e Hall (1999) e Pecorino (2005), a extremidade N-terminal de p53 é ácida e contém o domínio de ativação transcricional (transativação), que permite à proteína p53 recrutar a maquinaria requerida para a transcrição de novos mRNAs, ativando desta forma a expressão dos genes alvo. Esta região também está criticamente envolvida na regulação da estabilidade e da atividade da proteína p53, via interação com proteínas como Mdm2.

Normalmente, os níveis da proteína p53 no núcleo da célula são baixos. A concentração de p53 é regulada pela degradação protéica no proteossoma e não em nível de expressão do gene. A proteína Mdm2, uma ubiquitina-ligase, é sua principal reguladora (LAIN & LANE, 2003).

Ubiquitina-ligases são enzimas que acoplam pequenos peptídeos chamados ubiquitinas às proteínas, marcando-as para proteólise. Mdm2 modifica o domínio C-terminal de p53, marcando-a para degradação pelo proteossoma no citoplasma. Além disso, Mdm2 modifica a atividade de p53 uma vez que se liga e inibe o domínio de transativação na extremidade N-terminal e a transporta para o citoplasma, longe do DNA nuclear. Desta forma, a atividade transcricional da proteína p53 é bloqueada. A ligação de Mdm2 à p53 é parte de um mecanismo de

feed-back negativo. Em outras palavras, p53 estimula a produção de seu modulador negativo Mdm2 que causa a sua própria degradação (CHAN et al. 2006).

A estrutura tridimensional da parte central da proteína p53 permite que ela se ligue de forma específica a determinadas seqüências no DNA – por meio do domínio de ligação ao DNA representado na Figura 8.

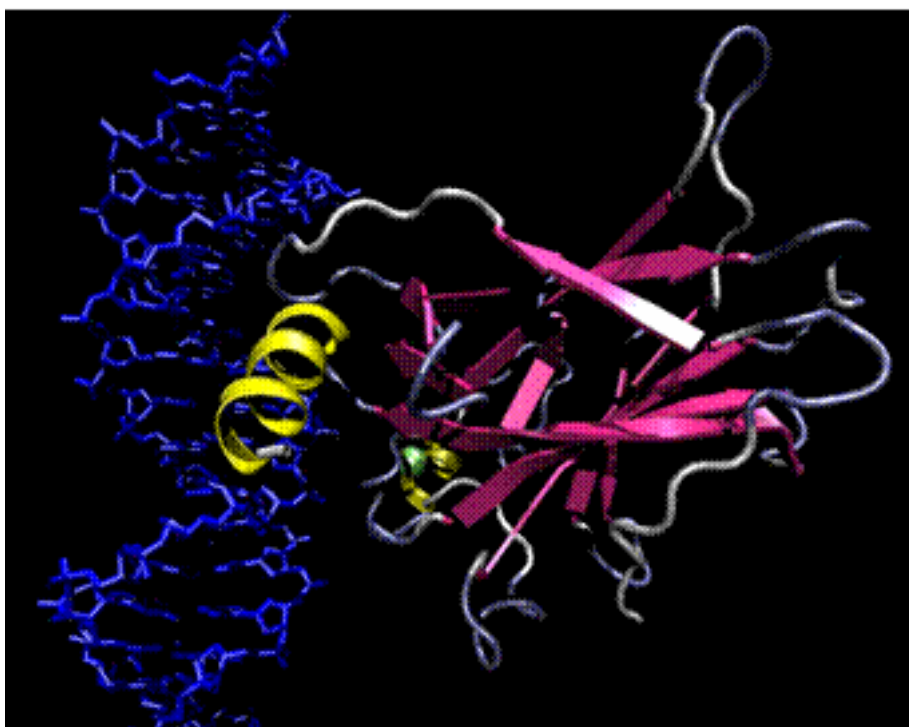


Figura 8. Proteína p53 ligada à molécula de DNA por meio do domínio de ligação (FALLAHI, 2004).

A proteína p53 funcional existe na forma de tetrâmero. O domínio de oligomerização forma tetrâmeros simétricos constituídos de um dímero composto por dois dímeros (Figura 9). Cada dímero é formado por uma folha β antiparalela e duas α -hélices antiparalelas (CHONG et al., 2005). Os dois dímeros são conectados

por contatos entre as duas hélices e a estrutura simétrica final é estabilizada por interações hidrofóbicas e outras interações eletrostáticas (FALLAHI, 2004).

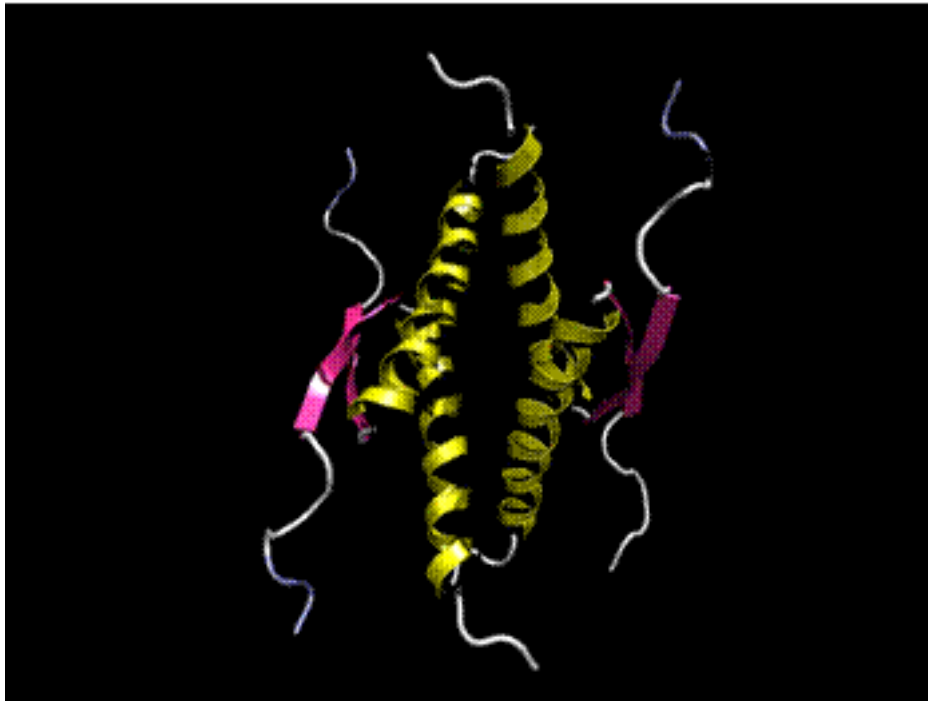


Figura 9. Estrutura do domínio de oligomerização da proteína p53 (FALLAHI, 2004).

O complexo tetramérico unido por meio do domínio de oligomerização atua induzindo genes que estão sob o seu controle (Figura 10).

O mecanismo pelo qual a proteína p53 se torna ativa depende da natureza do sinal de estresse e é efetivado por meio de alterações pós-tradução. O estresse é “percebido” por proteínas celulares como ATM (ataxia telangiectasia mutada) ou ATR (Relacionada com ATM e Rad3), quinases que disparam uma série de eventos resultando na interrupção da ligação p53-Mdm2 e na fosforilação de sítios específicos da região N-terminal de p53, como a Serina15.

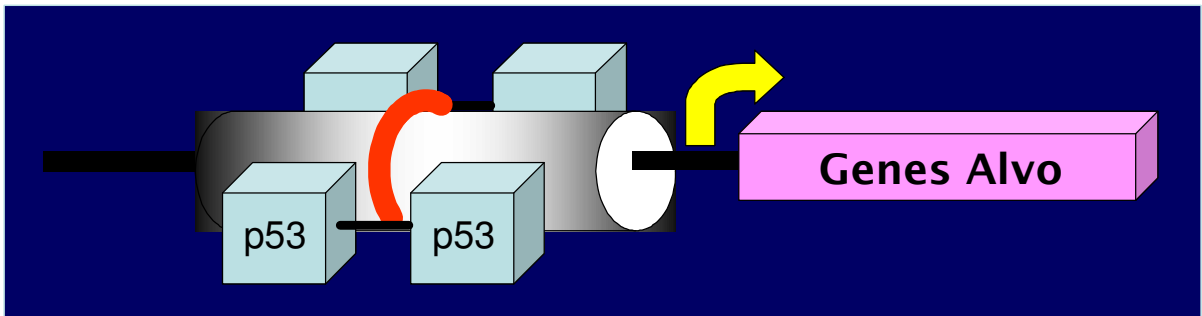


Figura 10. Complexo tetramérico unido por meio do domínio de oligomerização
(HAINAUT & OLIVIER, 2006)

A proteína supressora de tumor p53 na forma ativa pode, então, exercer suas funções como fator de transcrição modulando a expressão de genes tais como p21 (relacionado à retenção do ciclo celular) ou Bax (relacionado à apoptose) (PECORINO, 2005). Além disso, proteínas como a p300 atuam como coativadores interagindo com o domínio N-terminal da proteína p53 e levando a um aumento de sua atividade de ligação específica ao DNA, por meio da acetilação no domínio regulatório do C-terminal (LAMBERT et al., 1998).



Figura 11. Estrutura molecular da proteína p53 (PECORINO, 2005).

Mutações no gene *p53* ocorrem em mais da metade de todos os cânceres humanos (ALBERTS et al., 2004). A maioria das mutações em tumores humanos e animais ocorrem em regiões do gene que codificam o domínio central de ligação ao DNA. Desta forma, tanto resíduos envolvidos na ligação específica de *p53* ao DNA (VOJTESEK et al., 1995) são modificados quanto ocorrem alterações conformacionais do domínio como um todo, levando à síntese da proteína *p53* inativa (PRIVES & HALL, 1999) impedindo, desta forma, a detecção do dano sofrido pela molécula de DNA. Segundo a *International Agency for Research on Cancer* (IARC), até 2005 haviam sido contabilizadas 21.500 mutações envolvendo a via metabólica *p53*. A figura 11 representa a proteína *p53* com todos os seus domínios.

1.3.1 *p53* – UMA VIA DE SINALIZAÇÃO NUM UNIVERSO DE CONEXÕES (BIOREGULATORY NETWORKS)

De forma genérica, vias de sinalização ligadas aos pontos de checagem do ciclo celular são compostas por um conjunto de elementos de sinalização que monitoram a integridade do DNA cromossomal, com o objetivo de manter a estabilidade genética da célula (KASTAN & BARTEK, 2004).

Essas vias metabólicas são compostas por vários genes e proteínas os quais, por ativação ou supressão, têm a função de detectar danos ou anormalidades na estrutura do DNA e coordenar a progressão do ciclo celular com o reparo desta molécula. A ativação dessas vias promove retenção na progressão do ciclo (*arrest*), fornecendo à célula um tempo para a atuação das enzimas de reparo (ABRAHAM, 2001). A não existência de reparo se configura num sinal capaz de desencadear o

processo de morte celular por apoptose, evitando assim que mutações se perpetuem no genoma da célula. Como já citado nesse texto, o acúmulo de mutações nos genes envolvidos com a divisão celular leva aos processos de cancerização (KASTAN & BARTEK, 2004).

A cada dia são identificados novos genes e proteínas envolvidos nessa rede de comunicação e efetivação de respostas. Eles estabelecem inúmeros *links*, de modo que todo o sistema é interligado em forma de rede, interconectado e estabelece múltiplas relações de interdependência (KOHN et al. 2006). Dentro dessa rede, algumas proteínas estabelecem um número maior de conexões. Elas funcionam como “centros de atividade” ou “conectores” (BARABÁSI, 2004). Estes conectores são “nós” com um número extraordinário de *links* e estão presentes em vários sistemas complexos, inclusive o biológico. Segundo David Lane e Arthur Levine (GRECO et al., 2004), a forma mais efetiva de destruir essa rede é atacar as proteínas mais conectadas. A p53 é uma delas e mutações na sua estrutura vão interromper algumas funções básicas na célula. Portanto, como já citado, não é de surpreender que mais de 50% dos cânceres apresentem mutações no p53, o que, por outro lado, faz dele um alvo importante para agentes anticancerígenos (INOUE, et al.. 2006).

A Figura 12 apresenta alguns componentes de vias metabólicas que envolvem o p53, ou seja, um pequeno recorte na grande malha da sinalização celular envolvida na estabilidade genética das células.

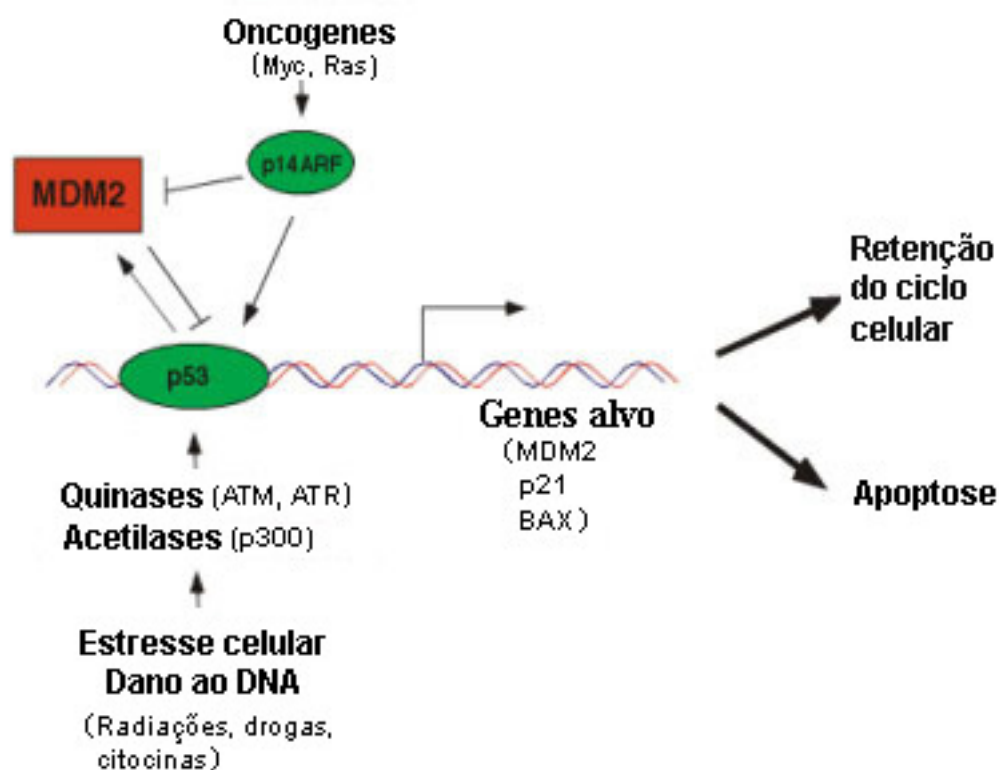


Figura 12: Via metabólica envolvendo o p53 (ROBERTSON et al., 1998, modificado).

Nela, estão representadas vias que atuam frente a diferentes tipos de estresses. Uma destas vias mostra as interações entre os oncogenes (Myc, Ras) e p53 via ARF.

Segundo Weinberg (1985), para que uma célula normal se transforme em célula tumoral são necessárias duas coisas, um gene de imortalização (Myc) e um de transformação (Ras). A ação desses dois oncogenes é mediada pela proteína ARF, produzida por um gene supressor de tumor que foi descoberto em 1997 por Charles Sherr. A proteína ARF regula o tráfego através da membrana em células eucarióticas e sua expressão leva à apoptose (SHERR, 2001). A via ARF-p53 freia os sinais de proliferação gerados pela super expressão de Myc e ativação de Ras (PEARSON et al., 2000), antagonizando o Mdm2, regulador negativo de p53 que, uma vez liberado, é ativado e passa então a se expressar promovendo a transcrição

de genes como o p21 (que leva à retenção do ciclo celular), BAX (que leva à apoptose) e Mdm2 (que controla os níveis de p53 por meio de *feedback* negativo).

Outra via importante está relacionada à transmissão de sinais produzidos por danos na molécula de DNA induzidos por radiações ionizantes e UV, drogas e citocinas, entre outros. Essas atuam no p53 por meio da ativação de quinases (ATM e ATR) mediando a fosforilação de p53 na serina 15, o que impede a sua ligação com Mdm2.

Ao mesmo tempo, promove a interação de p53 com componentes da maquinaria de transcrição, estimulando a ligação do complexo CBP e p(300), acetiltransferases que promovem a acetilação do p53, criando condições que favorecem a atividade transcricional de Mdm2, p21 e Bax (GLOZAK et al., 2005; PEARSON et al. 2000).

Esse é um pequeno exemplo de vias que cruzam o p53. Além dessas existem uma infinidade de conexões com outros genes e proteínas. Segundo Barabási (2004), descobrir os princípios e leis universais que governam essas redes pode revolucionar nossa visão da Biologia e das doenças.

2. JUSTIFICATIVA

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2005), mais de 11 milhões de pessoas são diagnosticadas com câncer todos os anos, vindo a atingir o número de 16 milhões de indivíduos em 2020. O câncer causa 7 milhões de mortes por ano, ou seja, 12,5% das mortes em todo o planeta.

No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2005) o câncer de mama e o de pulmão são os que mais atingem a população. Dentre estes, o de mama atinge o percentual de 16% da mortalidade por neoplasia maligna entre as mulheres. Este tipo de tumor lidera o índice de mortalidade no país. A cada ano, morrem de câncer de mama no Brasil mais de 10.000 mulheres na faixa etária acima dos 35 anos. Este quadro justifica o esforço permanente na busca de novos quimioterápicos capazes de debelar esta doença.

A maioria dos tratamentos usados atualmente para a terapia de tumores malignos são agentes genotóxicos, isto é, que provocam danos no DNA (Lu, 1993). Este fato tem duas conseqüências importantes. Primeiro esses agentes terapêuticos são em geral mais eficientes contra tumores que apresentam p53 normal (LU et al., 1996), uma vez que os danos provocados acionam vias para retenção do ciclo celular (*arrest*) ou apoptose, sob o controle de p53, o que não acontece nos tumores que apresentam p53 inativo. Segundo, as propriedades genotóxicas de tais agentes, devido aos danos causados ao DNA durante o tratamento, podem levar ao desenvolvimento de tumores malignos secundários em fases futuras da vida do paciente (WALLACE et al., 2001). Portanto, é de grande importância encontrar-se agentes terapêuticos não genotóxicos (LAIN & LANE, 2003), e que sejam eficazes mesmo em tumores cuja via p53 se encontra inativa.

Apesar dos relatos da literatura quanto às propriedades citotóxicas e anticancerígenas do ácido úsnico em modelos *in vitro* e *in vivo* (RIBEIRO-COSTA et al., 2004; SANTOS et al., 2005; BUCAR et al., 2004; PERRY et al., 1999; CARDARELLI et al., 1997; TAKAI et al., 1979; OGMUNDSDOTTIR et al., 1998), e de existirem referências sobre a indução de apoptose em várias linhagens de células neoplásicas a partir do tratamento com o ácido úsnico (OGMUNDSDOTTIR et al., 1998; BÉZIVIN et al., 2004; CORRECHÉ et al., 2004), o mecanismo de ação deste fármaco frente a células oriundas de tumores malignos humanos ainda precisa ser esclarecido. Portanto, a análise da interação do ácido úsnico com genes e proteínas que participam das vias metabólicas envolvidas no mecanismo de divisão celular, reparo do DNA ou morte da célula por apoptose, como no caso do p53, parece promissora. Este trabalho justifica-se pela necessidade de investigar se o ácido úsnico atua frente ao complexo gene/proteína p53 e aos microtúbulos do fuso mitótico e, conseqüentemente, se ocorre indução ou fosforilação da proteína p53, uma vez que ainda não existem estudos específicos sobre esta relação.

Este pode ser um caminho promissor no esclarecimento do mecanismo de ação deste fármaco contra células oriundas de tumores humanos, especialmente no que se refere à participação ou não da via metabólica p53, visando uma possível utilização como um quimioterápico que tenha como alvo essa via metabólica.

3. OBJETIVOS

➤ GERAL

Investigar se a atividade anticancerígena do ácido úsnico envolve a ativação da via metabólica p53.

➤ ESPECÍFICOS

1. Avaliar a atividade anticancerígena *in vitro* do ácido úsnico frente a linhagens celulares oriundas de tumores malignos humanos, selvagem, mutante e nula para p53;
2. Identificar se a exposição *in vitro* de células tumorais humanas ao ácido úsnico induz a via metabólica p53;
3. Verificar se o tratamento *in vitro* das células cancerosas com o ácido úsnico induz a atividade transcricional de p53;
4. Investigar se o tratamento de células tumorais com o ácido úsnico promove alterações na formação de microtúbulos.

REFERÊNCIAS

ABO-KHATWA, A.N.; AL-ROBAI, A.A.; AL-JAWHARI, D.A. Lichen acids as uncouplers of oxidative phosphorylation of mouse-liver mitochondria. **Natural Toxins**, New York, v. 4, n. 2, p. 96-102, 1996.

ABRAHAM, R.T. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor, v. 15, p. 2177-2196, 2001.

AL-BEKAIRI, A.M.; QURESHI, S.; CHAUDHRY, M.A.; KRISHNA, D.R.; SHAH, A.H. Mitodepressive, clastogenic and biochemical effects of (+)-usnic acid in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 33, p.217-220, 1991.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia molecular da célula**. Trad. Ana Beatriz Gorini da Veiga et al. – 4^a ed. – Porto Alegre: ARTEMED, 2004. 1463p.

BARABÁSI, A-L. & OLTVAI, Z.N. Network Biology: understanding the cell's functional organization. **Nature Reviews / Genetics**, London, v. 5, p. 101-113, Feb. 2004.

BÉZIVIN, C.; TOMASI, S.; LOHEZIC-LE DEVEHAT, F.; BOUSTIE, J. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. **Phytomedicine**, Jena, v. 10(6-7), p. 499-503, 2003.

BÉZIVIN, C.; TOMASI, S.; ROUAUD, I.; DELCROS, J.G.; BOUSTIE, J. Cytotoxic activity of compounds from the lichen: *Cladonia convolute*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 70, n. 9, p. 874-877, 2004.

BRODO, I.M.; SHARNOFF, S.D; SHARNOFF, S. **Lichens of North América**. Connecticut, Nov 2001. Disponível em: <<http://www.lichen.com/book.html>>. Acessado em 10 de setembro, 2005

BUCAR, F.; SCHNEIDER, I.; ÖGMUNDSÓTTIR, H.; INGÓLFSDÓTTIR, K. Anti-proliferative lichen compounds with inhibitory activity on 12(S)-HETE production in human platelets. **Phytomedicine**, Jena, v. 11, p. 602-606, 2004.

CAMPANELLA, L.; DELFINI, M.; ERCOLE, P.; IACOANGELI, A.; RISULEO, G. Molecular characterization and action of usnic acid: a drug that inhibits proliferation of mouse polyomavirus in vitro and whose main target is RNA transcription. **Biochimie**, Paris, v. 84, p. 329-334, 2002.

CARDARELLI, M; SERINO, G; CAMPANELLA; ERCOLE, P.; DE CICCO NARDONE, F.; ALESIANE, O. ; ROSSIELLO, F. Antimitotic effects of usnic acid on different biological systems. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 53, p.667-672, 1997.

CARVALHO, E.A.B.; ANDRADE, P.P; SILVA, N.H.; PEREIRA, E.C.; FIGUEIREDO, R.C.B.Q. Effect of usnic acid from the lichen *Cladonia substellata* on *Trypanosoma cruzi* in vitro: an ultrastructural study. **Micron**, New York, v. 36, p.155-161, 2005.

CHAN, W.M.; MAK, T.K.; FUNG, T.K.; LAU, A.; SIN, W.Y.; POON, R.Y. Ubiquitination of p53 at multiple sites in the DNA-binding domain. **Molecular Cancer Research**, Stanford, v. 4, n.1 p. 15-25, Jan. 2006.

CHANG, J.T.; CHANG, G.C.; KO, J.L.; LIAO, H.Y.; LIU, H.J.; CHEN, C.C.; SU, J.M.; LEE, H.; SHEU, G.T. Induction of tubulin by docetaxel is associated with p53 status in human non small cell lung cancer lines. **International Journal of Cancer**, New York, v. 118(2), p. 317-25, Jan. 2006.

CHONG, L.T.; SNOW, C.D.; RHEE, Y.M.; PANDE, V.S. Dimerization of the p53 oligomerization domain: identification of a folding nucleus by molecular dynamics stimulations. **Journal and Molecular Biology**, London, v. 345, p. 869-878, 2005.

COCCHIETO, M.; SKERT, N.; NIMIS, P. L.; SAVA, G. A review on usnic acid, an interesting natural compound. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 89, p.137-146, 2002.

CORRECHÉ, E.R.; ENRIZ, R.D.; PIOVANO, M.; GARBARINO, J.; GOMEZ-LECHON, M.J. Cytotoxic and apoptotic effects on hepatocytes of secondary metabolites obtained from lichens. **Atlas: Alternatives to Laboratory Animals**, Nottingham, v. 32, n. 6, p. 605-615, 2004.

DURAZO, F.A.; LASSMAN, C.; HAN, S.H.B.; SAAB, S.; LEE, N.P.; KAWANO, M.; SAGGI, B.; GORDON, S.; FARMER, D.G.; YERSIZ, H.; GOLDSTEIN, L.I.; GHOBRIAL, M. BUSUTTIL, R.W. Fulminant liver failure due to usnic acid for weight loss. **American Journal Gastroenterology**, New York, v. 99, n. 5. p. 950-952, 2004.

FALLAHI, A. Cancer therapy: ligand induced stabilization of p53. 2004. Disponível em: <<http://afallahi.com/myresearch/gipson3.htm>> Acesso em: 18 de outubro de 2005.

FAVREAU, J.T.; RYU, M.L.; BRAUNSTEIN, G.; ORSHANSKY, G.; PARK, S.S.; COODY, G.L.; LOVE, L.A.; FONG, T.L. Severe hepatotoxicity associated with the dietary supplement LipoKinetix. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 136, p. 590-595, 2002.

FOURNET, A.; FERREIRA, M.E.; ARIAS, A.R.; ORTIZ, S.T.; INCHAUSTI, A; YALUFF, G.; QUILHOT, W.; FERNANDEZ, E.; HIDALGO, M.E. Activity of compounds isolated from chilean lichens against experimental Cutaneous Leishmaniasis. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Elmsford, v. 116C, n.1, p. 51-54, 1997.

GARCIA ROWE, J.; GARCIA GIMENEZ, M. D.; SAENZ RODRIGUEZ, M. T. Some lichen products have antimicrobial activity. **Journal of Biosciences**, Bangalore, v. 54, n. 7-8, p.605-609, 1999.

GLOZAK, M.A.; SENGUNTA, N.; ZHANG, X.; SETO, E. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. **Gene**, Amsterdam, v. 19;363:15-23. Dec 2005.

GOWARD, T. In: BRODO, I.M.; SHARNOFF, S.D; SHARNOFF, S. **Lichens of North América**. Connecticut, Nov 2001. Disponível em:

<<http://www.lichen.com/book.html>>. Acessado em 10 de setembro, 2005.

GRADY, D. Seeking to fight fat, she lost her liver. **The New York Times**, New York, 4 Mar. 2003. Health. Disponível em:

<<http://query.nytimes.com/gst/fullpage.html?res=9802E2DD163FF937A35750C0A9659C8B63&sec=health&pagewanted=print>>. Acessado em 13 de janeiro de 2006.

GRECO, A.; MIRANDA, F.; LEVYMAN, M. Conectados. **Super Interessante**, São Paulo, Editora Abril, n. 198, p. 56-59, mar. 2004.

HAINAUT, P.; OLIVIER, M. TP53 genetic variations in human cancer. International Agency for Research on Cancer. Lyon, France. Disponível em:

<<http://www-p53.iarc.fr>>. Acessado em 10 de fevereiro, 2006.

HALAMA, P.; VAN HALUWIN, C. Antifungal activity of lichen extracts and lichenic acids. **BioControl**, Dordrecht, v. 49, p. 95-107, 2004.

HAN, D.; MATSUMARU, K.; RETTORI, D.; KAPLOWITZ, N. Usnic acid-induced necrosis of cultured mouse hepatocytes: inhibition of mitochondrial function and oxidative stress. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 67, p. 439-451, 2004.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**, Cambridge, v. 100, p. 57-70, 2000.

HONDA, N.K.; VILEGAS, W. The chemistry of lichens. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, p. 110-125, 1998.

HUNECK, S. The significance of lichens and their metabolites. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 86, n. 12, p. 559-570, 1999.

INGÓLFSDÓTTIR, K. Usnic acid. **Phytochemistry**, New York, v. 61, p. 729-736, 2002.

INGÓLFSDÓTTIR, K.; CHUNG, G.A.C.; SKÚLASON, V.G.; GISSURARSON, S.R.; VILHELMSDÓTTIR, M. Antimycobacterial activity of lichen metabolites in vitro. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 6, p. 141-144, 1998.

INOUE, M.; TOMIZAWA, K.; MATSUSHITA, M.; LU, Y.F.; YOKOYAMA, T.; YANAI, H.; TAKASHIMA, A.; KUMON, H.; MATSUI, H. p53 protein transduction therapy: successful targeting and inhibition of the growth of bladder cancer cells. **European Urology**, Basel, v.49, n. 1, p. 161-168, 2006.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA. Rio de Janeiro, 1999. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/atlas/docs/txmortalidade_hm_MAMA.pdf>. Acesso em 03 abr 2005.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER – IARC. TP53 Mutation database. Paris, 2006. Disponível em: <<http://www.-p53.iarc.fr>>. Acesso em 06 fev 2006.

JAMES, T.L.; LIND, K.E.; DU, Z.; PETERLIN, M.B.; FUJINAGA, K.; GUY, R.K.; MADRID, P.; MAYER, M.; PETERLIN, B.M.; MADRID, P.B. Method of inhibiting RNA function involves contacting RNA molecules or cells having RNA with a specific compound and its salts, yohimbine, usnic acid, or an acetamide. Patente N^o: WO2003062388-A; WO2003062388-A2; US2003229082-A1; AU2003222197-A1. Universidade da Califórnia, 2003.

JORDAN, M.A. Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin. **Current Medicinal Chemistry – Anticancer Agents**, Hilversum, v. 2, p. 1-17, 2002.

KASTAN, M.B.; BARTEK, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. **Nature**, London, v. 432, p. 316-323, Nov. 2004.

KOHN, K.W.; ALADJEM, M.I.; WEINSTEIN, J.N.; POMMIER, Y. Molecular interaction maps of bioregulatory networks: a general rubric for systems Biology. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v. 17, p. 1-13, Jan. 2006.

KRISTMUNDSDÓTTIR, T.; JÓNSDÓTTIR, E.; ÖGMUNDSDÓTTIR, H. M INGÓLFSDÓTTIR, K. Solubilization of poorly soluble lichen metabolites for biological

testing on cell lines. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v.24, n. 5, p. 539-543, 2005.

KUPCHAN, M.; KOPPERMAN, H.L. Usnic acid: tumor inhibitor isolated from lichens. **Experientia**, Basel, v. 31, Fasc 6, p. 625, 1975.

LAMBERT, P.F.; KASHANCHI, F.; RADONOVICH, M.F.; SHIEKHATTAR, R.; BRADY, J.N. Phosphorylation of p53 serine 15 increases interaction with CBP. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.273, n. 49, p. 33048-33053, Dec. 1998.

LAIN S, LANE D. Improving cancer therapy by non-genotoxic activation of p53. **European Journal of Cancer**, New York, v. 39, p. 1053-1060, 2003.

LANE, D. 25 Years of p53. Dundee, 2004. Disponível em:

<<http://www.biochemsoctrans.org/bst/BS2004/BS2004SP05.pdf>>. Acesso em 29 de setembro de 2005.

LAUTERWEIN, M.; OETHINGER, M.; BELSNER, K.; PETERS, T.; MARRE, R. In vitro activities of the lichen secondary metabolites vulpinic acid, (+)-usnic acid, and (-)-usnic acid against aerobic and anaerobic microorganisms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 39, n.11, p. 2541-2543, 1995.

LAZEROW, S.K.; ABDI, M.S.; LEWIS, J.H. Drug-induced liver diseases 2004. **Current Opinion in Gastroenterology**, Boston, v. 21, p. 283-292, 2005.

LU, X.; BURBIDGE, S.A.; GRIFFIN, S.; SMITH, H. Discordance between accumulated p53 protein levels and its transcriptional activity in response to UV radiation. **Oncogene**, Basingstoke, v. 13, p. 413-418, 1996.

LU, X.; LANE, D. Differential induction of transcriptionally active p53 following UV or Ionizing Radiation: defects in chromosome instability syndromes? **Cell**, Cambridge, v. 75, n. 19, p. 765-778, Nov. 1993.

MAYER, M; O'NEILL, M.A.; MURRAY, K.E.; MAGALHÃES, N.S.S.; CARNEIRO-LEÃO, A.M.A.; THOMPSON, A.M.; APPLEYARD, M.V.C.L. Usnic acid increases p53 levels in MCF7 cancer cells. In: REUNIÃO ANUAL DA SBBQ, 34, 2005, Águas de Lindóia: **XXXIV Reunião Anual-Programas e Resumos**, Adaltech Soluções para Eventos, CD-ROM, 2005.

MÜLLER, K. Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 56, p. 9-16, 2001.

MURPHY, M.E.; ZILFOU, J.; HOFFMAN, W. Elucidation of the p53-dependent programmed cell death pathway. Pennsylvania, 1996. Disponível em: <<http://www.fccc.edu/research/reports/current/murphy.html>> Acessado em 15 de setembro, 2005

NEFF, G.W.; REDDY, R.; DURAZO, F.A.; MEYER, D.; MARRERO, R.; KAPLOWITZ, N. Severe hepatotoxicity associated with the use of weight loss diet supplements

containing ma huang or usnic acid. **Journal of Hepatology**, Oxfordshire, v. 41, p. 1061-1067, 2004.

NIMIS, P.L.; SKERT, N. Lichen chemistry and selective grazing by the coleopteran *Lasioderma serricorne*. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 55, n. 1-2, p. 175-182, Jan. 2006.

ODABASOGLU, F.; CAKIR, A.; SULEYMAN, H.; ASLAN, A.; BAYIR, Y.; HALICI, M.; KAZAZ, C. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 103, n. 1, p. 59-65, Jan. 2006.

ÖGMUNDSDÓTTIR, H.M.; ZOEGA, G.M.; GISSURARSON, S.R.; INGÓLFSDÓTTIR, K. Anti-proliferative effects of lichens-derived inhibitors of 5-lipoxygenase on malignant cell-lines and mitogen-stimulated lymphocytes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 50, n. 1, p. 107-115, 1998.

OKUYAMA, E.; UMEYAMA, K.; YAMAZAKI, M.; KINOSHIATA, Y.; YAMAMOTO, Y. Usnic acid and diffractaic acid as analgesic and antipyretic components of *Usnea diffact*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 61, n. 2, p.113-115, 1995.

OLIFF, A.; GIBBS, J.B.; McCORMICK, F. New molecular targets for cancer therapy. **Scientific American**, New York, p. 110-115, Sep. 1996.

ORICCHIO, E.; SALADINO, C.; IACOVELLI, S.; SODDU, S.; CUNDARI, E. ATM is activated by default in mitosis, localizes at centrosomes and monitors mitotic spindle integrity. **Cell Cycle**, Georgetown, v. 5(1), p. 88-92, Jan. 2006.

PEARSON, M.; CARBONE, R.; SEBASTIANI, C.; CIOCE, M.; FAGIOLI, M.; SAITO, S.; HIGASHIMOTO, Y.; APPELLA, E.; MINUCCI, S.; PANDOLFI, P.P.; PELICCI, P.G. PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. **Nature**, London, v. 406, p. 207-210, Jul. 2000.

PECORINO, L. **Molecular Biology of Cancer- Mechanisms, Targets and Therapeutics**. Hampshire: Oxford University Press, 2005. 243 p.

PEREIRA, E.C.; NASCIMENTO, S.C.; LIMA, R.C.; SILVA, N.H.; OLIVEIRA, A.F.M.; BANDEIRA, E.; BOITARD, M.; BERIEL, H.; VICENTE, C.; LEGAZ, M.E. Analysis of *Usnea Fasciata* crude extracts with antineoplastic ctivity. **Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine**, Tokio, v. 19, n. 1/2, p. 47-52, 1994.

PERRY, N. B.; BENN, M. H.; BRENNAN, N.J.; BURGESS, E.J.; ELLISS, G.; GALLOWAY, D.J.; LORIMER, S.D.; TANGNEY, R.S. Antimicrobial, antiviral and cytotoxic activity of new Zealand lichens. **Lichenologist**, London, v. 31, n. 6, p. 627-636, 1999.

PETERSON, E.A. Normal cell growth and develoment. 2005. Disponível em: <<http://healthlibrary.epnet.com/GetContent.aspx?token=88a4eeeb-f78d-4522-b3c7-3e4ecb98dd7c&chunkid=36702>>. Acessado em 11 de setembro, 2005

PRAMYOTHIN, P.; JANTHASOOT, W.; PONGNIMITPRASERT, N.; PHRUKUDOM, S.; RUANGRUNGSI, N. Hepatotoxic effect of (+) usnic acid from *Usnea siamensis* Wainio in rats, isolated rat hepatocytes and isolated rat liver mitochondria. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 90, p. 381-387, 2004.

PRIVES, C.; HALL, P.A. The p53 pathway. **Journal of Pathology**, Chichester, v. 187, p. 112-126, 1999.

RIBEIRO-COSTA, R.M.; ALVES, A.J.; SANTOS, N.P.; NASCIMENTO, S.C.; GONÇALVES, E.C.; SILVA, N.H.; HONDA, N.K.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. In vitro and in vivo properties of usnic acid encapsulated into PLGA-microspheres. **Journal of Microencapsulation**, Basingstoke, v. 21, n. 4, p. 371-384, 2004.

ROBERTSON, K.D. & JONES, P.A. The human ARF cell cycle regulatory gene promoter is a CpG island which can be silenced by DNA methylation and down-regulated by wild-type p53. **Molecular and Cellular Biology**, Stanford, v.18 n. 11, p. 6457-6473, 1998.

ROLIM-SANTOS, H.M.L. Lipossomas convencionais e sítio-específicos(lectina-conjugada) contendo antineoplásicos. 2005. 120 f. Tese. (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2005.

RUOSLAHTI, E. How cancer spread. **Scientific American**, New York, p. 42-47, Sep. 1996.

SANTOS, L.C.; HONDA, N.K.; CARLOS, I.Z.; VILEGAS, W. Intermediate reactive oxygen and nitrogen from macrophages induced by Brazilian lichens. **Fitoterapia**, Milano, v. 75, n. 5, p. 473-479, 2004.

SANTOS, N.P.; NASCIMENTO, S.C.; SILVA, J. F.; PEREIRA, E.C.G.; SILVA, N.H.; HONDA, N. K.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Usnic acid-loaded nanocapsules: an evaluation of cytotoxicity. **Journal of Drug Delivery And Science and Thecnology**, Paris, v. 15, n. 5, p. 355-361, 2005.

SCIRPA, P.; SCAMBIA, G.; MASCIULLO, V.; BATTAGLIA, F.; FOTI, E.; LOPEZ, R.; VILLA, P.; MALECORE, M.; MANCUSO, S. A zinc sulfate and usnic acid preparation used as post-surgical adjuvant therapy in genital lesions by Human Papillomavirus. **Minerva Gynecologica**, Turin, v. 151, n. 6, p. 255-260, 1999.

SHERR, C.J. Cancer cell cycles. **Science**, Washington, v. 274, p. 1672-1677, 1996.

SHERR, C.J. The INK4A /ARF network in tumor suppression. **Nature Reviews/ Molecular Cell Biology**, London, v.2, p.731-737, 2001.

SHIBAMOTO, T; WEI, C.I. Mutagenicity of lichen constituents. **Environmental Mutagenesis**, New York, v. 6, p. 757-762, 1984.

SON, Y.-O.; KIM, J.; LIM, J.-C.; CHUNG, Y.; CHUNG, G.-H.; LEE, J.-C. Ripe fruits of *Solanum nigrum* L. inhibits cell growth and induces apoptosis in MCF-7 cells. **Food and Chemical Toxicology**, Elmsford, v. 41, p. 1421-1428, 2003.

SÖDERBERG, U. A note on the action of usnic acid on anesthetized cats. **Acta Physiologica Scandinavica**, Stockholm, V. 28, p.202-210, 1953.

SOUSSI, T. p53 mutations in human cancer. Disponível em: <http://p53.free.fr/database/p53_mutation.html>. Acessado em 04 de fevereiro, 2006.

STEELE, R.J.C.; THOMPSON, A.M.; HALL, P.A.; LANE, D.P. The p53 tumor suppressor gene [Review]. **British Journal of Surgery**. Guildford, v. 85, n. 11, p. 1460-1467, 1998.

SULLIVAN, J. Checkpoint. Disponível em: <http://www.cellsalive.com/cell_cycle.htm>. Acessado em 11 de janeiro, 2006.

SUNIL KUMAR, KC.; MÜLLER, K. Lichen metabolites. 2. Antiproliferative and cytotoxic activity of gyrophoric, usnic, and diffractaic acid on human keratinocyte growth. **Journal of Natural Products**, Pittsburgh, v. 62, p. 821-823, 1999a.

SUNIL KUMAR, KC.; MÜLLER, K. Lichen metabolites. 1. Inhibitory action against leukotriene B₄ biosynthesis by a non-redox mechanism. **Journal of Natural Products**, Pittsburgh, v. 62, p. 817-820, 1999b.

TAKAI, M.; UEHARA, Y.; BEISLER, J.A. Usnic Acid derivatives as potential antineoplastic agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 22, n. 11, p.1380-1384, 1979.

TANIGUCHI, C.M.; EMANUELLI, B.; KAHN, R. Critical nodes in signalling pathways: insight into insulin action. **Nature Reviews / Molecular Cell Biology**, London, v.7, p. 85-96, Feb. 2006.

TURK, A.O.; YILMAZ, M.; KIVANC, M.; TURK, H. The antimicrobial activity of extracts of the lichen *Cetraria aculeata* and its protolichesterinic acid constituent. **Zeitschrift Naturforschung**, Tübingen, v. 58, n. 11/12, p. 850-854, 2003.

VARTIA, K.O. (1973) Antibiotics in lichens. In: COCCHIETO, M.; SKERT, N.; NIMIS, P. L.; SAVA, G. A review on usnic acid, an interesting natural compound. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 89, p.137-146, 2002.

VIJAYAKUMAR, C.S.; VISWANATHAN, S.; KANNAPPA, M.; REDDY, M.K.; PARVATHAVARTHINI, A.B.; KUNDU, A.B.; SUKUMAR, E. Anti-inflammatory activity of (+)-usnic acid. **Fitoterapia**, Milano, v. 71, p. 564-566, 2000.

VOJTESEK, B; DOLEZALOVA, H; LAUEROVA, L SVITAKOVA, M; HAVLIS, P; KOVARIK, J; MIDGLEY, C.A.; LANE, D.P.; Conformational changes in p53 analysed using new antibodies to the core DNA binding domain of the protein. **Oncogene**, Basingstoke, v. 10, p.389-393, 1995.

VOUSDEN, K.H. p53 and PUMA. A deadly duo. **Science**, Washington, v. 309, n. 9, p.1685-1686, 2005.

WALLACE, W.H.B.; BLACKLAY, A.; EISER, C.; DAVIES, H.; HAWKINS, M.; LEVITT, G.A.; JENNEY, M.E.M.; Developing strategies for long term follow up of survivors of childhood cancer. **British Medical Journal**, London, v. 323, p.271-274, 2001.

WEINBERG, R.A. The action of oncogenes in the cytoplasm and nucleus. **Science**, Washington v. 230, n. 4727, p.770-776, Nov. 1985

WEINBERG, R.A. How cancer arises. **Scientific American**, New York, p. 32-40, Sep. 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION -WHO. 2005. Disponível em:
<<http://www.who.int/cancer/en/>>. Acesso em 19 de setembro, 2005

YAMAMOTO, Y.; MIURA, Y.; KINOSHITA, Y.; HIGUCHI, M.; YAMADA, Y.; MURAKAMI, A.; OHIGASHI, H.; KOSHIMIZU, K. Screening of tissue cultures and thalli of lichens and some of their active constituents for inhibition of tumor Promoter-Induced Epstein-Barr virus activation. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 43, n. 8, p. 1388-1390, 1995.

YILMAZ, M. TURK, A.O.; TAY, T.; KIVANC, M.; The antimicrobial activity of extracts of the lichen *Cladonia foliacea* and its (-)-usnic acid, atranorin and fumarprotocetraric acid constituents. **Zeitschrift Naturforschung**, Tübingen, v. 59, n. 3/4, p. 249-254, 2004.

CAPÍTULO I

Ácido Úsnico: um composto não genotóxico com propriedades anticancerígenas

Usnic acid: a non-genotoxic compound with anti-cancer properties

Margareth Mayer^{a-c}, Mary A. O'Neill^e, Karen E. Murray^e,
Nereide S. Santos-Magalhães^{b-d}, Ana Maria A. Carneiro-Leão^{a,b},
Alastair M. Thompson^e and Virginia C. L. Appleyard^e

The majority of human tumors bear inactive p53 or cellular factors that down-regulate the expression and activity of the p53 network. Therefore, finding therapies that are effective in such tumors is of great interest. Usnic acid, a normal component of lichens, showed activity against the wild-type p53 breast cancer cell line MCF7 as well as the non-functional p53 breast cancer cell line MDA-MB-231 and the lung cancer cell line H1299 (null for p53). In MCF7 cells treated with usnic acid, although there was an accumulation of p53 and p21 proteins, the transcriptional activity of p53 remained unaffected. We also found that there was no phosphorylation of p53 at Ser15 after treatment of MCF7 cells with usnic acid, suggesting that the oxidative stress and disruption of the normal metabolic processes of cells triggered by usnic acid does not involve DNA damage. The property of usnic acid as a non-genotoxic anti-cancer agent that works in a p53-independent manner makes it a potential

candidate for novel cancer therapy. *Anti-Cancer Drugs* 16:805–809 ©2005 Lippincott Williams & Wilkins.

Anti-Cancer Drugs 2005, 16:805–809

Keywords: genotoxicity, H1299, MCF7, MDA-MB-231, p53 activity, usnic acid

^aDepartamento de Morfologia e Fisiologia Animal, ^bLaboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), ^cPrograma de Doutorado em Biologia, Centro de Ciências Biológicas, ^dDepartamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil and ^eDepartment of Surgery and Molecular Oncology, Ninewells Hospital and Medical School, University of Dundee, Dundee, UK.

Sponsorship: This work was supported by Breast Cancer Research Scotland and the Brazilian Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

Correspondence to V. C. L. Appleyard, Department of Surgery and Molecular Oncology, Ninewells Hospital and Medical School, Dundee DD1 9SY, UK. Tel: +44 1382 496430; fax: +44 1382 496363; e-mail: m.v.c.l.appleyard@dundee.ac.uk

Received 30 May 2005 Accepted 14 June 2005

Introduction

Lichens are a symbiotic association between fungi and photosynthetic partners. Their metabolites, such as the dibenzofuran derivative usnic acid [1], exert a wide variety of biological activities, i.e. anti-bacterial, anti-viral and anti-inflammatory [2–6]. In vitro anti-cancer effects of usnic acid were shown for the first time by Kupchan and Kopperman [7] against Lewis lung carcinoma. Since then, many other researchers reported anti-proliferative [8–10] and mitochondrial depressive effects [11,12] of usnic acid against in vitro malignant cells, suggesting its potential use as a chemotherapeutic agent.

Many current cancer therapies are based on agents that have DNA-damaging effects including alkylating agents and g-irradiation. In response to DNA damage the protein level of p53 accumulates and its transcriptional activity is also increased [13]. Activation of the p53 tumor suppressor protein leads to inhibition of cellular proliferation by inducing cell cycle arrest or apoptosis [14]. Wild-type p53 is known to act as a transcription factor, up-regulating the expression of p21, mdm2 and Bax genes amongst others [15].

Although the cytotoxicity of usnic acid has been extensively reviewed [16–19] and recent studies suggested that usnic acid acts by inhibiting RNA transcrip-

tion[20] or mitochondrial function [21], the involvement of p53 in its mechanism of action is unknown. The objective of this work was therefore to investigate the relationship between the anti-neoplastic activity of usnic acid and p53 activation.

Materials and methods

Unless otherwise stated, reagents were acquired from Sigma-Aldrich (Poole, UK).

Cell lines

The breast cancer cell lines MCF7 (estrogen-dependent, wild-type p53) and MDA-MB-231 (estrogen independent, mutant p53), and the lung cancer cell line H1299 (null for p53) were obtained from ATCC (Manassas, Virginia, USA). Cells were cultured in 5% CO₂ at 37°C using DMEM supplemented with 10% fetal calf serum and 1% penicillin/streptomycin.

Cytotoxicity of usnic acid

Stock solutions of usnic acid (14.5mM) were freshly prepared in DMSO and further diluted with culture medium to obtain the desired concentrations. A concentration range of 1–60 mM of usnic acid was tested. Subconfluent cells were trypsinized and seeded into 96-well tissue culture plates in 100 µl of medium at a density of 1 × 10³ cells/well. After overnight incubation,

the medium was aspirated off the adherent cells and fresh medium with varied drug concentrations was added. After drug exposure for 72 h, cell survival was determined in quadruple wells for each drug concentration using the MTT assay as follows. An aliquot of 50 µl of a solution in phosphate-buffered saline (2 mg/ml) was added to each well. The plates were incubated at 37°C at 5% CO₂ for 4 h. Then the medium was removed from each well and 50 µl DMSO added. The OD540 was determined using a microplate reader (Spectra Max GeminiXS; Molecular Devices, Wokingham, UK) containing an equivalent amount of DMSO to each drug concentration as controls. Each experiment was repeated in triplicate.

p53/p21 Induction and Ser15 phosphorylation studies in MCF7 cells

Cells were seeded into 150-mm plates and grown under standard conditions. Based on the MTT results, subconfluent MCF7 cultures were exposed to 29 mM usnic acid for 24 h. Negative controls were treated with media containing an appropriate amount of DMSO. For phosphorylation studies, a positive control was prepared by treating subconfluent MCF7 cultures with 20 mM mitomycin. After treatment the medium was aspirated, and the cells washed with ice-cold PBS, scraped off and lysed for 15 min on 41°C denaturing urea buffer (6.4M urea, 0.1M DTT, 0.05% Triton X-100, 25mM NaCl and 200mM HEPES, pH 7.6). Lysates were clarified by centrifugation at 13 000 g for 5 min. Protein concentration was determined by the method of Bradford (protein assay kit from Bio-Rad, Munich, Germany) and aliquots stored at – 70°C until required. Equivalent amounts of protein (20 µg) were separated on Novex high-performance pre-cast gels and blotted onto nitrocellulose membranes (Protran, Dassel, Germany) following the specifications for the NuPAGE Bis-Tris System from Invitrogen (Paisley, UK). Proteins were detected with the following antibodies: DO-12 (monoclonal, specific for the core domain of p53; obtained as described by Vojtesek [22]), WAF1 (monoclonal, specific for p21; Oncogene Research Products, Darmstadt, Germany) and FPS15 (polyclonal, specific for phospho-Ser15; Cell Signaling Technology, Hitchin, UK). Secondary antimouse antibody was purchased from Dako (Oxford, UK). Secondary polyclonal anti-rabbit antibodies were acquired from Bio-Rad. The detection of the proteinantibody complex was carried out with enhanced chemiluminescence (ECL Western blotting detection reagents; Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK). Equal loading was confirmed with actin (Strattech Scientific, Luton, UK).

p53 Activation studies

To determine if the transcriptional activity of p53 correlated with its protein level, the b-Gal assay was performed as follows. T22 mouse fibroblast cells bearing the reporter plasmid RGA⁺Fos-LacZ (containing a 36-bp

p53-binding site and its corresponding control plasmid, which lacks the p53-binding site) were trypsinized and seeded into 96-well tissue culture plates in 90 µl of medium at a density of 1 × 10⁴ cells/well. After 48 h incubation, usnic acid at the concentrations of 3.6, 7.25, 14.5 and 29 mM was added. Negative controls were cells treated with media containing DMSO. Positive controls were cells treated with actinomycin D (an anti-neoplastic antibiotic that inhibits cell proliferation by forming a stable complex with DNA and blocking the movement of RNA polymerase, which interferes with DNA-dependent RNA synthesis, leading to an increase in the levels of active p53) at 6 and 60 ng/ml, and the nuclear export inhibitor, non-genotoxic activator of p53 leptomycin B at the concentrations of 2 and 20 nM. After 16 h medium was aspirated off, 50 µl of lysis buffer (Promega, Southampton, UK) added to each well and plates shaken for 1–2 h at room temperature. Then, 150 µl of CPRG reaction mix (0.1M phosphate buffer containing 80 mg/ml CPRG, 0.1M b-mercaptoethanol and 4.5M MgCl₂) was added and plates incubated for 4 h at 37°C. (A color change from yellow to pink indicates p53 activity.) Then, 100 µl from each well was transferred to a new 96-well plate and the OD570 was determined using a microplate reader (Spectra Max GeminiXS).

Results

Cell sensitivity to usnic acid treatment

The dose-responses of the breast cancer cell lines MCF7 (estrogen-positive, wild-type for p53) and MDA-MB-231 (estrogen-negative, non-functional p53), and the lung cancer cell line H1299 (p53 null) to usnic acid were analyzed by determining the relative viability of the treated cells by the MTT assay. The three cell lines were sensitive to usnic acid with IC₅₀ values of 18.9 (MCF7) and 22.3 mM (MDA-MB-231 and H1299) (Fig. 1).

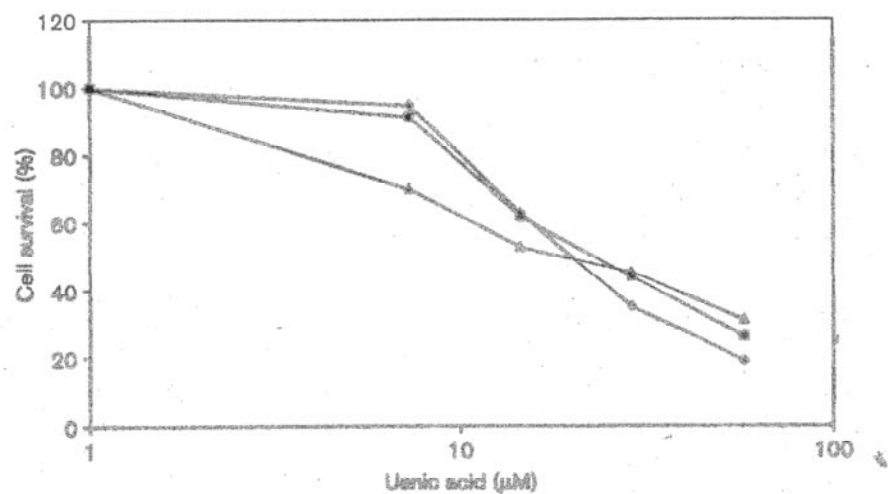
p53 and p21 Protein levels following usnic acid exposure

MCF7 cells were exposed to 29 mM usnic acid for 24 h as described in Materials and methods. The monoclonal antibody DO-12 was used as a probe for p53. This antibody is specific for the core domain of p53 and allows absolute quantitation of denatured p53 protein. p21 levels were detected with the monoclonal antibody WAF1. Figure 2(lanes 1 and 2) shows that MCF7 cells exhibited elevated p53 and p21 protein levels compared with vehicle controls after treatment with 29 mM usnic acid. Actin showed equal loading of proteins.

Ser15 phosphorylation of human p53 following usnic acid treatment

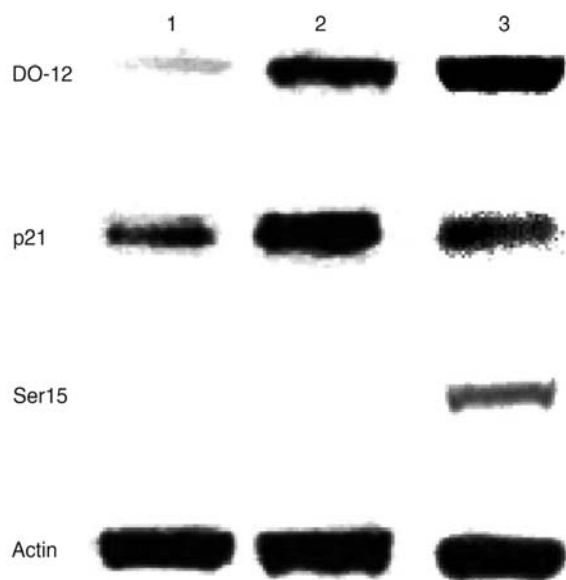
MCF7 cells treated with mitomycin C showed increased levels of Ser15 phosphorylation compared with the cells treated with vehicle control. Cells treated with usnic acid, however, showed no increase in Ser15 phosphorylation (Fig. 2, lanes 1–3).

Fig. 1



In vitro usnic acid dose–response assay. Subconfluent MCF7 (diamonds), MDA-MB-231 (squares) and H1299 (triangles) cells were trypsinized and seeded into 96-well tissue culture plates in 100 ml medium. After overnight incubation, the medium was aspirated off the adherent cells and fresh medium with varied drug concentrations was added. Cells were treated with usnic acid concentrations ranging from 1 to 60 mM for 72 h. Cell survival was determined in quadruple wells for each drug concentration using the MTT assay.

Fig. 2



Effect of usnic acid on the induction of p53/p21 and Ser15 phosphorylation. Subconfluent cultures in 150-mm plates were exposed for 29 mM usnic acid and 20 mM mitomycin for 24 h. After treatment, medium was aspirated off, and cells washed with ice-cold PBS, scraped off and lysed for 15 min on 41C denaturing urea buffer. Equivalent amounts of protein were separated on Novex highperformance pre-cast gels and blotted onto nitrocellulose membranes (Protran). Proteins were detected with DO-12 (specific for the core domain of p53), WAF1 (Ab-1) (for p21) and FPS15 (specific for phospho-Ser15). Equal protein loading was confirmed with actin. Lane 1, vehicle control (24 h); lane 2, 29 mM usnic acid; lane 3, 20 mM mitomycin.

Table 1 β -Gal assay for evaluating the effect of usnic acid on p53 transcriptional activity

Treatment	Fold activity
Usnic acid (μ M)	
3.6	0.89 $\pm$ 0.20
7.25	0.91 $\pm$ 0.25
14.5	0.58 $\pm$ 0.09
29	0.49 $\pm$ 0.05
Actinomycin D (ng/ml)	
6	3.88 $\pm$ 0.05
60	9.25 $\pm$ 1.51
Leptomycin (nM)	
2	2.52 $\pm$ 0.78
20	5.89 $\pm$ 0.32

Transcriptional activity of p53 following usnic acid exposure

Table 1 shows the effects of usnic acid at the concentrations of 3.6, 7.25, 14.5 and 29 mM, and 6 and 60 ng/ml actinomycin D, and 2 and 20 nM leptomycin B on T22 mouse fibroblast cells bearing the reporter plasmid RGDfos-LacZ. Results are expressed as fold activity compared to cells treated with media containing DMSO (negative control). As expected, treatment with actinomycin D and leptomycin B, established activators of p53, resulted in increased activity related to the control. Cells exposed to usnic acid, however, showed no significant change, indicating that despite accumulation of p53 protein, there was no increase in p53 transcriptional activity.

Discussion

Finding therapies that are non-genotoxic and effective in tumors lacking p53 poses a great challenge for researchers.

DNA damage induced by many of the current cancer therapies may result in the development of second malignancies later in life [23], and the majority of human tumors bear inactive p53 or cellular factors that regulate the expression and activity of p53 [24]. Usnic acid is a common component of lichen cells found to provide anti-mitotic and anti-proliferative effects in a variety of biological systems [12,25].

Usnic acid has also showed anti-proliferative activity against normal cell lines, such as skin keratinocytes [9], fibroblasts, peripheral blood lymphocytes [8] and rat hepatocytes [26].

In the present study the toxicity of usnic acid against the breast cancer cell lines MCF7 (estrogen-positive and wild-type for p53) and MDA-MB-231 (estrogen-negative with a non-functional p53), and the lung cancer cell line H1299 (p53 null) was examined. All three cell lines showed sensitivity to usnic acid with IC₅₀ values of about 20 mM (Fig. 1). The involvement of p53 and DNA damage occurrence in the mechanism of action of usnic acid were also investigated in MCF7 cells. DNA damage induced by physical or chemical stress is followed by a rapid increase in the level of the tumor suppressor p53 with activation of its transcriptional function. A network of signaling pathways is activated, which leads to arrest of the cell cycle progression in the late G1 phase [27] or apoptosis [28] in proliferating cells. A key target for transcriptional activation by p53 is the cyclin-dependent kinase inhibitor p21, which suppresses cyclin E and A associated to cdk2 activities [14]. In fact, an increase in p21 expression is commonly accepted as an indication of p53 activation. This study showed that although there was an increase in p53 and p21 expression (Fig. 2), the transcriptional activity of p53 remained unaffected (Table 1). This fact suggests that the accumulation of p21 was not secondary to p53 transactivation. Under ordinary conditions the proteasome controlled degradation of intracellular proteins occurs in an ATP-dependent manner [29]. It has been shown that some anti-cancer agents such as rotenone and MPP⁺ (1-methyl-4-phenylpyridinium) induce the increase of free radicals and reduce proteasomal activity via ATP depletion [30]. It was recently reported that usnic acid directly inhibits mitochondria function, which causes an increase in reactive oxygen species and a drop in cellular ATP levels [21]. It is reasonable to speculate, therefore, that activation of p53 is not involved in the action of usnic acid, and the increase in p53 and p21 levels, as observed in our experiments, was the result of the accumulation of inactive proteins due to proteasome inhibition.

In mammalian cells, ATM (ataxia telangiectasia mutated) and ATR (ATM and Rad3-related) play crucial roles in early signal transmission after DNA damage. These two phosphoinositide 3-kinase kinases mediate phosphorylation of p53 at Ser15 [31]. It is thought that phosphorylation

at this site reduces mdm2 protein binding (and subsequent ubiquitin-dependent p53 degradation) while promoting interaction of p53 with components of the transcriptional machinery (by stimulating CBP/p300 binding to and acetylation of p53). Moreover, a single mutation of Ser15 to alanine on full-length p53 can alter its apoptotic activity [32]. Our results showed that no phosphorylation of p53 at Ser15 after treatment of MCF7 cells with 29 mM usnic acid was observed (Fig. 2), indicating that DNA damage is not involved in the oxidative stress and disruption of the normal metabolic processes of cells triggered by usnic acid [21].

In conclusion, usnic acid has anti-proliferative activity against the wild-type p53 (MCF7) as well as the nonfunctional p53 (MDA-MB-231) breast cancer cell lines, and the lung cancer cell line H1299, which is null for p53. The properties of usnic acid as a non-genotoxic anticancer agent that works in a p53-independent manner support the need for further studies in order to establish a safe therapeutic range in vivo. Usnic acid thus has potential as either a systemic therapy or as a topical agent for the treatment of tumors.

Acknowledgments

We thank Dr S. Lain and R. Berkson (both from the D. P. Lane group) for suggestions and assistance with p53 activation experiments.

References

- 1 Rashid MA, Majid MA, Quader MA. Complete NMR assignments of (+)-usnic acid. *Fitoterapia* 1999; 70:113–115.
- 2 Lauterwein M, Oethinger M, Belsner K, Peters T, Marre R. In vitro activities of the lichen secondary metabolites vulpinic acid, (+)-usnic acid, and (–)-usnic acid against aerobic and anaerobic microorganisms. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:2541–2543.
- 3 Ingo´ lfsdo´ ttir K, Chung GAC, Sku´ lason VG, Gissurarson SR, Vilhelmsdo´ ttir M. Antimycobacterial activity of lichen metabolites in vitro. *Eur J Pharm Sci* 1998; 6:141–144.
- 4 Halama P, Van Haluwin C. Antifungal activity of lichen extracts and lichenic acids. *BioControl* 2004; 49:95–107.
- 5 Yamamoto Y, Miura Y, Kinoshita Y, Higuchi M, Yamada Y, Murakami A, et al. Screening of tissue cultures and thalli of lichens and some of their active constituents for inhibition of tumor promoter-induced Epstein–Barr virus activation. *Chem Pharm Bull* 1995; 43:1388–1390.
- 6 Vijayakumar CS, Viswanathan S, Reddy MK, Parvathavarthini AB, Kundu AB, Sukumar E. Anti-inflammatory activity of (+)-usnic acid. *Fitoterapia* 2000; 71:564–566.
- 7 Kupchan M, Kopperman HL. Usnic acid: tumor inhibitor isolated from lichens. *Experientia* 1975; 31:625.
- 8 O´ gmundsdó ttir HM, Zoe´ ga GM, Gissurarson SR, Ingo´ lfsdo´ ttir K. Antiproliferative effects of lichens-derived inhibitors of 5-lipoxygenase on malignant cell-lines and mitogen-stimulated lymphocytes. *J Pharm Pharmacol* 1998; 50:107–115.
- 9 Kumar S, Mu´ ller K. Lichen metabolites 2: antiproliferative and cytotoxic activity of gyrophoric, usnic and diffractaic acid on human keratinocyte growth. *J Nat Prod* 1999; 62:821–823.
- 10 Costa RMR, Alves AJ, Santos NP, Nascimento SC, Pereira EC, Silva NH, et al. In vitro and in vivo properties of usnic acid encapsulated into PLGA microspheres. *J Microencapsul* 2004; 21:371–384.
- 11 Al-Bekairi AM, Qureshi S, Chaudhry MA, Krishna DR, Shah AH. Mitodepressive, clastogenic and biochemical effects of (+)-usnic acid in mice. *J Ethnopharmacol* 1991; 33:217–220.
- 12 Cardarelli M, Serino G, Campanella EP, De Cicco Nardone F, Alesiane O, Rossiello F. Antimitotic effects of usnic acid on different biological systems. *Cell Mol Life Sci* 1997; 53:667–672.

- 13 Lu X, Lane DP. Differential induction of transcriptionally active p53 following UV or ionizing radiation: defects in chromosome instability syndromes. *Cell* 1993; 75:765–778.
- 14 Prives C, Hall P A. The p53 pathway. *J Pathol* 1999; 187:112–126.
- 15 Bourdon JC, Deguin-Chambon, Lelong JC. Further characterization of the p53 responsive element—identification of new candidate genes for transactivation by p53. *Oncogene* 1997; 14:85–94.
- 16 Müller K. Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. *Appl Microbiol Biotechnol* 2001; 56:9–16.
- 17 Ingo´ lfsdo´ ttir K. Usnic acid. *Phytochemistry* 2002; 61:729–736.
- 18 Cocchietto M, Skert N, Nimis PL, Sava G. A review on usnic acid, an interesting natural compound. *Naturwissenschaften* 2002; 89:137–146.
- 19 Santos NP, Nascimento SC, Silva JF, Pereira ECG, Honda NK, et al. Usnic acid-loaded nanocapsules: and evaluation of cytotoxicity. *J Drug Del Sci Technol* 2005; in press.
- 20 Campanella L, Delfini M, Ercole P, Iacoangeli A, Risuleo G. Molecular characterization and action of usnic acid: a drug that inhibits proliferation of mouse polyomavirus in vitro and whose main target is RNA transcription. *Biochimie* 2002; 84:329–334.
- 21 Han D, Matsumaru K, Rettori D, Kaplowitz N. Usnic acid-induced necrosis of cultured mouse hepatocytes: inhibition of mitochondrial function and oxidative stress. *Biochem Pharmacol* 2004; 67:439–451.
- 22 Vojtesek B, Dolezalova H, Lauerova L, Svitakova M, Havlis P, Kovarik J, et al. Conformational changes in p53 analyzed using new antibodies to the core DNA binding domain of the protein. *Oncogene* 1995; 10:389–393.
- 23 Wallace WH, Blacklay A, Eiser C, Davies H, Hawkins M, Levitt GA, et al. Developing strategies for long term follow up of survivors of childhood cancer. *Br Med J* 2001; 323:271–274.
- 24 Soussi T, Dehouche K, Be´roud C. p53 website and analysis of p53 gene mutations in human cancer: forging a link between epidemiology and carcinogenesis. *Hum Mutat* 2000; 15:105–113.
- 25 Perry NB, Benn MH, Brennan NJ, Burgess EJ, Elliss G, Galloway DJ, et al. Antimicrobial, antiviral and cytotoxic activity of New Zealand lichens. *Lichenologist* 1999; 31:627–636.
- 26 Pramyothin P, Janthasoot W, Pongnimitprasert N, Phrukdom S, Ruangrunsi N. Hepatotoxic effect of (+) usnic acid from *Usnea siamensis* Wainio in rats, isolated rat hepatocytes and isolated rat liver mitochondria. *J Ethnopharmacol* 2004; 90:381–387.
- 27 Smith ML, Chen IT, Zhan QM, Bae IS, Chen CY, Gilmer TM, et al. Interaction of the p53-regulated protein gadd45 with proliferating cell nuclear antigen. *Science* 1994; 266:1376–1380.
- 28 Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 1993; 74: 957–967.
- 29 Ciechanover A. The ubiquitin–proteasome proteolytic pathway. *Cell* 1994; 79:13–21.
- 30 Gu¨ nter U, Carrard G, Mitchel PP, Medja F, Lombes A, Ruberg M, et al. Dysfunction of mitochondrial complex I and the proteasome: interactions between two biochemical deficits in a cellular model of Parkinson’s disease. *J Neurochem* 2003; 86:1297–1307.
- 31 Abraham RT. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev* 2001; 15:2177–2196.
- 32 Blaydes JR, Luciani MG, Pospisilova S, Mei-Ling H, Vojtesek B, Hupp TR. Stoichiometric phosphorylation of human p53 at Ser315 stimulates p53-dependent transcription. *Br J Cancer* 2001; 276: 4699–4708.

CAPÍTULO II

**O ácido úsnico afeta os microtúbulos em
células cancerosas humanas?**

Does usnic acid affect microtubules in human cancer cells?

Mary A. O'Neill^a, Margareth Mayer^{b,c,d}, Karen E. Murray^a, Hercília M. L. Rolim-Santos^{c,d}, Nereide S. Santos-Magalhães^{c,d,e}, Alastair M. Thompson^a and Virginia C.L. Appleyard^{*a}

^aDepartment of Surgery and Molecular Oncology, Ninewells Hospital and Medical School, University of Dundee, Dundee, Scotland, UK; ^bDepartamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil; ^cLaboratório de Imunopatologia Keizo Asami LIKA; ^dPrograma de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Centro de Ciências Biológicas and ^eDepartamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil;

Correspondence to Dr. V. C. L. Appleyard, Department of Surgery and Molecular Oncology, Ninewells Hospital and Medical School, Dundee, DD1 9SY, UK.

Tel +441382496430; fax +441382496363

E-mail: m.v.c.l.appleyard@dundee.ac.uk

Short title: Does usnic acid affect microtubules?

This work was supported by Breast Cancer Research Scotland and the Brazilian Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

Abstract

Usnic acid, a lichen metabolite, is known to exert antimitotic and antiproliferative activities against normal and malignant human cells. Many chemotherapy agents exert their activities by blocking cell cycle progression and unleashing cell death through apoptosis. Microtubules, proteins involved in the segregation of chromosomes during mitosis, serve as targets due to their key role in cellular division. The aim of this work was to investigate whether the antineoplastic activity of usnic acid affects the formation and/or stabilization of microtubules by visualizing microtubules and determining mitotic indices after treatment. For the visualization of microtubules, the breast cancer cell line MCF7 and the lung cancer cell line H1299 were seeded in glass chamber slides, cultivated in DMEM for 24 h and treated with 29 μ M usnic acid, 1 μ M vincristine (which prevents the formation of microtubules) or 1 μ M taxol (which stabilizes microtubules) for 4 or 24 h. Cells were fixed with methanol and microtubules observed with the antibody anti- α -tubulin. Treatment of MCF7 and H1299 cells with usnic acid did not result in any increase in the mitotic index. The results suggest that the antitumour activity of usnic acid is not related to alterations in the formation and/or stabilization of microtubules.

Keywords: Usnic acid, microtubules, breast cancer, lung cancer.

Introduction

Lichens are symbiotic organisms made up from members of three kingdoms. The dominant partner, a fungus (Fungi), cultivate partners like algae (Protista) and/or cyanobacteria (Monera) that manufacture food by photosynthesis [1]. Lichens synthesize over eight hundred types of metabolites [2]. Due to their therapeutic properties, many Cultures have utilised these compounds in traditional medicine for centuries [3]. Depsides, depsidones, dibenzofuranes, xanthenes, anthraquinones and usnic acids are amongst the more extensively studied lichen metabolites [4]. Usnic acid (2,6-diacetyl-7,9-dihydroxy-8,9b-dimethyl-dibenzofuran-1,3[2H,9bH]-dione; $C_{18}H_{16}O_7$) (Figure 1), is one of the most abundant secondary lichen metabolites and can be found in nature in two enantiomeric forms (+) and (-) [5].

Usnic acid was initially used in the treatment of pulmonary tuberculosis [6], and there are data regarding its biological activities as an antibiotic [3], antimitotic [7], analgesic and antipyretic [8], antiinflammatory [9], antiviral [10-11], antifungal [12], against the parasite *Trypanosoma cruzi* [13] and as an immunologic modulator [14]. *In vitro* anticancer effects of usnic acid were shown for the first time by Kupchan & Kopperman [15] against Lewis lung carcinoma in mice. Since then, many other researchers reported antiproliferative [16-17], mitochondrial depressive [18] and antimitotic effects [7]. In addition, its mutagenic, cytotoxic and antitumour activities have been determined against normal and malignant human cells “in vitro” [19-22] and “in vivo” [20, 23 and 24].

Although the cytotoxicity of usnic acid have been extensively reviewed [2, 3 and 25] there is no data regarding the effects of usnic acid on microtubules. These structural proteins are found within cells and are one of the components of the

cytoskeleton. They have diameter of ~ 24 nm and varying in length from several micrometers to possibly millimetres in axons of nerve cells. Microtubules are required for many cell functions, including cell division (mitosis), cell shape maintenance, intracellular transport, extracellular secretion, cell signalling, and cell motility [26]. Microtubules are highly dynamic, with rapid changes occurring in their growth and length, particularly during cell division [27].

In previous studies performed in our laboratory, H1299 lung cancer cells were exposed to 29 μ M usnic acid for up to 48 h [20]. It was observed that the growth of the cells was slower when compared to the untreated cultures. Moreover, although the cells did not lose adherence to the flask, they became deformed and elongated (Figure 2) suggesting possible involvement of microtubules in the toxicity of the drug.

The aim of this work was to establish whether the antitumour effects of usnic acid could be related to the formation and/or stabilisation of microtubules.

Materials and methods

Unless otherwise stated reagents were acquired from Sigma-Aldrich, UK.

Cell lines

The breast cancer cell lines MCF7 (oestrogen-dependent, wild type p53) and the lung cancer cell line H1299 (null for p53) were obtained from American Tissue Culture Collection (Manassas, Virginia, USA). Cells were cultured in 5% CO₂ at 37° C using Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% FCS and 1% penicillin/streptomycin.

Effect of usnic acid on microtubule morphology

To study the effect of the usnic acid on the formation and stabilization of microtubules, cells were seeded in glass chamber slides from Lab-Tek (USA) at a density of 10^3 cells per chamber. After 24 h incubation at 37° C, 5% CO₂, medium was aspirated off the adherent cells. Then, fresh medium containing 29 μ M usnic acid, a concentration higher than the IC₅₀ for both cell lines [20], was added and cells exposed to the drug for 4 or 24 h. Positive controls were prepared by treating cells with 1 μ M vincristine or 1 μ M taxol for 4 h. At this concentration, vincristine and taxol are known to exert their activity depolymerizing or stabilizing microtubules respectively [28]. Stock solutions of usnic acid (14.5 mM in DMSO) taxol and vincristine (10 mM in DMSO) were freshly prepared and further diluted with culture medium. Negative controls were had fresh medium added. Microtubule stabilising buffer (MTSB: 80 mM PIPES, 1 mM MgCl₂, 4 mM EGTA) was prepared immediately before use.

Microtubule visualization

After treatment, cells were fixed in – 20° C methanol for 1-3 min and permeabilized in warm MTSB containing 0.5% TritonX-100 for 1 min. To minimize non-specific reactions, cells were blocked with PBS containing 0.1 % TritonX-100 for 40 min. The slides were incubated with anti- α -tubulin at a dilution of 1/2000 in blocking solution for 1 h at 37°C. Then they were incubated with FITC-conjugated donkey anti-mouse (Jackson Immuno Research Laboratories, Germany) at a 1/80 dilution for 45 min. Cells were washed, drained, mounted and sealed. Microtubules were visualized with a Nikon E600 fluorescence microscope equipped with a Nikon coolpix 4500 digital camera.

Mitotic index

To evaluate if usnic acid behaves as a typical spindle poison, MCF7 and H1299 cells were seeded into 150 mm plates and grown under standard conditions. Sub-confluent cultures were treated with 29 μ M usnic acid or 10 μ M vincristine (positive control) for 4 and 8 h. Negative controls had fresh medium added. After treatment, cells were trypsinised, washed in PBS and resuspended in 0.075 M KCl at 4° C for 15 min. Cells were harvested by centrifugation at 1000 rpm for 10 min, fixed with freshly prepared Carnoy's fixative (MeOH:Acetic acid at 3:1) and stored o/n at 4° C. The following day, small amounts of preparation (app. 500 μ l) were dropped onto microscope slides and heated for 2 sec. Slides were stained with 5% Giemsa prepared in Gurrs buffer (pH 6.8 tablets from BDH, Leicestershire – UK). Cells were observed with a Zeiss Axiovert 25 microscope using a 40X objective. The mitotic index was reported as the percentage of mitotic cells per total number of cells.

Results

Effect of usnic acid on microtubule morphology

Figure 3 shows the results of the treatment of MCF7 cells (Panel 1) and H1299 cells (Panel 2) with usnic acid (1B and 2B), taxol (1C and 2C) and vincristine (1D and 2D). Cells treated with usnic acid (1B and 2B), were morphologically similar to the cells with no treatment (1A and 2A) even after 24 h exposure to usnic acid.

Mitotic index

Table 1 shows the mitotic indices for MCF7 and H1299 untreated cells and cells treated with usnic acid or vincristine. Whereas treatment with vincristine resulted in accumulation of M phase cells, untreated cells and cells treated with usnic acid showed similar mitotic indices.

Discussion

Although reports in the literature confirm the anticancer activity of usnic acid [16-22], its mechanism of action has not yet been completely understood. This compound has been shown to work as a phosphorylation chain uncoupling agent in rat hepatocyte mitochondria at concentrations in the range of 1 μ M [29], as well as leading to oxidative stress and disruption of normal metabolic process in cells [30]. Recent studies also suggested that usnic acid acts by inhibiting RNA transcription [10]. According to Mayer *et al.* [20], usnic acid showed antiproliferative activity against MCF7 breast cancer cells (oestrogen positive, wild type for p53) and the lung cancer cell line H1299 (p53 null), with IC₅₀ of 18.9 and 22.3 μ M respectively. The authors found that the antitumour activity of usnic acid did not involve DNA damage or p53 activation. These non-genotoxic and p53-independent features make usnic acid a potential candidate for either systemic or topical therapy for the treatment of tumours.

In the present work, after 4 h exposure the effects of vincristine and taxol were observed in both MCF7 (Panel 1) and H1299 (Panel 2) cells. Panels 1C and 2C show asters and bundles characteristic of stabilised microtubules as a consequence of taxol treatment. Panels 1D and 2D show microtubule depolymerization resulting from the treatment with vincristine. Cells treated with usnic acid (Panels 1B and 2B) however, did not show any differences when compared to the untreated cells (Panels 1A and 2A) after 24 h exposure to the drug.

The majority of chemotherapy agents exert their activities by blocking cell cycle progression and unleashing cell death through apoptosis [31]. During mitosis, the DNA of a cell is replicated and the newly replicated chromosomes divided into the

two forming cells along spindle fibres constructed with microtubules. The crucial role that microtubules play in cell division makes them a very suitable target for the development of therapeutic drugs against rapidly dividing cells such as cancer cells [32]. The efficacy of microtubule targeting agents (MTAs) has been validated by their successful use for the treatment of a wide variety of human cancers [33]. The MTAs bind to tubulin in a variety of ways [34-35] in microtubules and prevent cancer cell proliferation by interfering with the microtubule formation required for cell division. [36].

Although the antiproliferative activities of MTAs have been thought to result from their actions on microtubule formation and stability, there is evidence that at low concentrations the antimitotic and anticancer effects of microtubule targeting agents may be largely due to their suppression of microtubule dynamics without affecting microtubule mass [37]. Indeed, the cytoplasmic motor protein dynein, a protein involved in the movement of chromosomes and positioning the mitotic spindles for cell division, is an early target for destruction during apoptosis [38]. The concentration of usnic acid used in our experiments was above the IC_{50} established previously for both cell lines [20]. However, no changes were observed in the morphology of microtubules in MCF7 or H1299 even when cells were exposed to usnic acid for considerably longer periods (24 h) than to vincristine or taxol (4 h).

The Mitotic Index (MI), as the name suggests, is a count of the number of mitotic cells visible and expressed as a fraction of the total. For asynchronously growing cultures such as those used in these experiments, the mitotic index reflects the fraction of time that cells spend in mitosis versus the rest of the cell cycle. Increased mitotic index results from a lengthening of mitosis, usually an arrest [39]. This approach revealed that vincristine, as a well established spindle poison,

triggered a mitotic arrest state with about 50% mitotic index after 8 h treatment. Usnic acid, however, did not appear to arrest the cell cycle at M phase (Table 1).

Collectively, our results indicate that the disruption of normal metabolic process in cells triggered by the action of usnic acid does not primarily involve depolymerization or stabilization of microtubules in breast or lung cancer cells.

Acknowledgments

We thank Dr. Julie Woods (Photobiology Unit, Department of Dermatology, Ninewells Hospital & Medical School) for the assistance with the microtubule visualization and analysis.

References

- 1 DePriest PT. Early molecular investigations of lichen-forming symbionts: 1986-2001*. *Annu Rev Microbiol* 2004; **48**:273-30.
- 2 Müller K. Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. *Appl Microbiol Biotechnol* 2001; **56**:9-16.
- 3 Cocchiello M, Skert N, Nimis PL and Sava G A review on usnic acid, an interesting natural compound *Naturwissenschaften* 2002; **89**(4):137-146.
- 4 Honda NK, Vilegas W. The chemistry of lichens. *Química Nova* 1998; **21**:110-125.
- 5 Huneck S, Akinniyi JA, Cameron AF, Connolly JD, Mulholland AG. The absolute configurations of (+)-usnic and (+)- isousnic acid. X-Ray analyses of the (-)- α -phenylethylamine derivative of (+) usnic acid and of (-) pseudoplacodiolic acid, a new dibenzofuran, from the lichen *Rhizoplaca chrysoleuca*. *Tetrahedron Letters* 1981; **22**:351-352.

- 6 Plichet A. Usnic acid from lichens in therapy of tuberculosis *Press Med* 1955; **63**(17):350.
- 7 Cardarelli M, Serino G, Campanella L, Ercole P, De Cicco Nardone F, Alesiano O, Rossiello F. Antimitotic effects of usnic acid on different biological systems *Cel Mol Life Sci* 1997; **53**:667-672.
- 8 Okuyama E, Umeyama K, Yamazaki M, Kinoshiata Y, Yamamoto Y. Usnic acid and diffractaic acid as analgesic and antipyretic components of *Usnea diffract.* *Planta Medica* 1995; **61**(2):113-115.
- 9 Vijayakumar CS, Viswanathan S., Reddy M.K., Parvathavarthini AB, Kundu AB, Sukumar E. Anti-inflammatory activity of (+)-usnic acid. *Fitoterapia* 2000; **71**: 564 -566.
- 10 Campanella L, Delfini M, Ercole P, Iacoangeli A and Risuleo G. Molecular characterization and action of usnic acid: a drug that inhibits proliferation of mouse polyomavirus in vitro and whose main target is RNA transcription. *Biochimie* 2002; **84**:329-334.
- 11 Scirpa P, Scambia G, Masciullo V, Battaglia F, Foti E, Lopez R, Villa P, Malecore M and Mancuso S. A zinc sulphate and usnic acid preparation used as post-surgical adjuvant therapy in genital lesions by human Papillomavirus *Minerva Ginecol.* 1999; **51**(6):255-260.
- 12 Halama P, Van Haluwin C. Antifungal activity of lichen extracts and lichenic acids *Biocontrol* 2004;**49**:95-107.
- 13 Carvalho EAB, Andrade PP, Silva NH, Pereira EC and Figueiredo RCBQ. Effect of usnic acid from the lichen *Cladonia substellata* on *Trypanosoma cruzi* in vitro: an ultrastructural study. *Micron* 2005; **36**:155-161.

- 14 Santos LC, Honda NK, Carlos IZ and Vilegas W. Intermediate reactive oxygen and nitrogen from macrophages induced by Brazilian lichens. *Fitoterapia* 2004; **75**(5):473-479.
- 15 Kupchan M, Kopperman HL Usnic Acid: Tumor Inhibitor Isolated from Lichens. *Experientia* 1975; **31**: 625.
- 16 Ögmundsdóttir H.M., Zoëga G.M., Gissurarson S.R., Ingólfssdóttir K. (1998) Anti-proliferative effects of lichens-derived inhibitors of 5-lipoxygenase on malignant cell-lines and mitogen-stimulated lymphocytes. *J Pharm Pharmacol* 1998; **50** (1): 107-115.
- 17 Kumar S and Müller K Lichen metabolites 2: antiproliferative and cytotoxic activity of gyrophoric, usnic and diffractaic acid on human keratinocyte growth. *J Nat Proc* 1999; **62**: 821-823.
- 18 Al-Bekairi AM, Qureshi S, Chaudhry MA, Krishna DR and Shah AH. Mitodepressive, clastogenic and biochemical effects of (+)-usnic acid in mice. *J Ethnopharmacol* 1991; **33**: 217-220.
- 19 Bucar F, Schneider I, Ögmundsdóttir H, Ingólfssdóttir K. Anti-proliferative lichen compounds with inhibitory activity on 12(S)-HETE production in human platelets *Phytomedicine* 2004; **11**:602-606.
- 20 Mayer M, O'Neill MA, Murray KE, Santos-Magalhães NS, Carneiro-Leão AMA, Thompson AM and Appleyard VCL. Usnic acid: a non-genotoxic compound with anti-cancer properties *Anticancer Drugs* 2005; **16**(8):805-809.
- 21 Perry NB, Benn MH, Brennan NJ, Burgess EJ, Eliss G, Galloway DJ, Lorimer SD and Tangney RS. Antimicrobial, antiviral and cytotoxic activity of New Zealand lichens *Lichenologist* 1999; **31**(6):627-636.

- 22 Takai M, Uehara Y and Beisler JA. Usnic acid derivatives as potential antineoplastic agents *J Med Chem* 1979; **62**:821-823.
- 23 Santos NP, Nascimento SC, Silva JF, Pereira ECG, Silva NH, Honda NK and Santos-Magalhães NS. Usnic acid-loaded nanocapsules: an evaluation of cytotoxicity. *J Drug Deliv Scien Technol* 2005; **15**(5):355-361.
- 24 Santos NP, Nascimento SC, Pereira EC, Silva NH, Santos-Magalhães NS. Nanoencapsulation of usnic acid: improvement on the antitumour activity and reduction of hepatotoxicity. *Eur J Pharm Biopharm* 2006; *in press*. (EJPB MS 1935)
- 25 Ingólfssdóttir K. Usnic acid. *Phytochemistry* 2002; **61**: 729-736.
- 26 Yasuda S, Noguchi T, Gohda M, Arai T, Tsutsui N, Nakauama Y, Matsuda T and Nonogi H. Local delivery of low-dose docetaxel, a novel microtubule polymerizing agent, reduces neointimal hyperplasia in a balloon-injured rabbit iliac artery model *Cadiovas Res* 2002;**53**:481-486.
- 27 Rusan NM, Fagerstrom CJ, Yvon AM and Wadsworth P. Cell cycle-dependent changes in microtubule dynamics in living cells expressing green fluorescent protein-alpha tubulin *Mol Biol Cell* 2001; **12**(4):971-980.
- 28 Checci PM, Nettles JH, Zhou J, Snyder JP and Joshi HC. Microtubule-interacting drugs for cancer treatment. *Trends Pharmacol Sci* 2003; **24**(7):361-365.
- 29 Abo-Khatwa AN, Al-Robai AA, and Al-Jawhari DA. Lichen acids as uncouplers of oxidative phosphorylation of mouse-liver mitochondria *Natural Toxins* 1996; **4**(2):96-102.

- 30 Han D, Matsumaru K, Rettori D and Kaplowitz N. Usnic acid-induced necrosis of cultured mouse hepatocytes: inhibition of mitochondrial function and oxidative stress. *Biochem Pharmacol* 2004; **67**: 439-451.
- 31 Son YO, Kim J, Lim JC, Chung Y, Chung GH and Lee JC. Ripe fruits of *Solanum nigrum* L. inhibit cell growth and induces apoptosis in MCF7 cells. *Food Chem Toxicol* 2003; **41**:1421-1428.
- 32 Jordan, M.A., Wilson, L. Microtubules as a target for anticancer drugs *Nature Reviews Cancer* 2004; **4**(4):253-65.
- 33 Rosolen A, Pillon M, Garaventa A, Burnelli R, d'Amore ES, Giuliano M, Comis M, Cesaro S, Tettoni K, Moleti ML, Tamaro P, Visitin G and Zanesco L. Anaplastic large cell lymphoma treated with a leukaemia-like therapy:report of the Italian Association of Pediatric Hematology and Oncology (AIEOP) LNH-92 protocol *Cancer* 2005; **104**(10):2133-2140.
- 34 Hait, W.N., Rubin, E., Goodin, S. Tubulin-targeting agents. *Cancer Chemother Biol Response Modif* 2003; **21**:41-67.
- 35 Dumontet, C., Sikic, B.I. Mechanisms of action of and resistance to antitubulin agents: microtubule dynamics, drug transport, and cell death. *J Clin Oncol* 1999; **17**(3):1061-70.
- 36 Jordan, M.A. (2002) Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2002; **2**(1):1-17.
- 37 Jordan MA, Wendell K, Gardiner S, Derry WB, Copp H and Wilson L. Mitotic block induced in HeLa cells by low concentrations of paclitaxel (Taxol) results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death. *Cancer Res* 1996; **56**(4):816-25.

- 38 Karp G. Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments, Fourth ed., pp. 346-358. John Wiley and Sons, Hoboken, NJ. 2005.
- 39 Golias CH, Charalabopoulos A and Charalabopoulos K. Cell proliferation and cell cycle control: a mini review. *In J Clin Pract* 2004; 58(12):1134-1141.

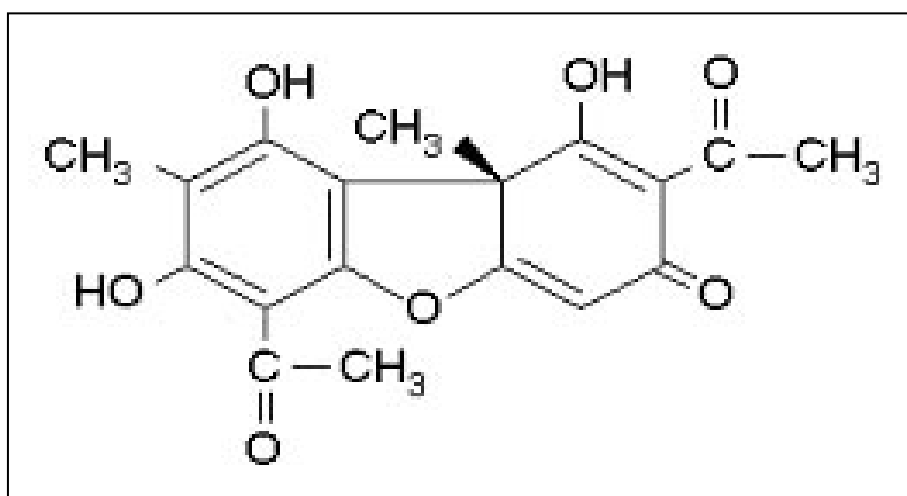
Table 1. Effects of usnic acid on the mitotic indices of MCF7 and H1299 cells.

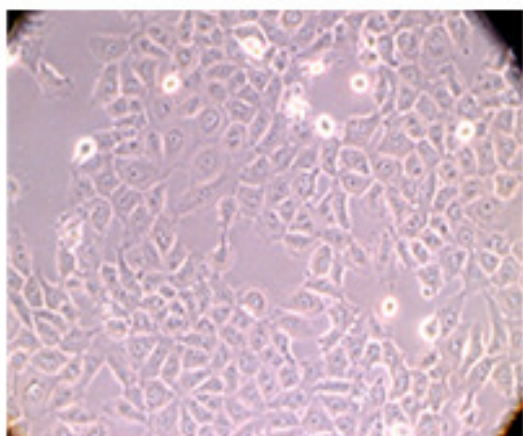
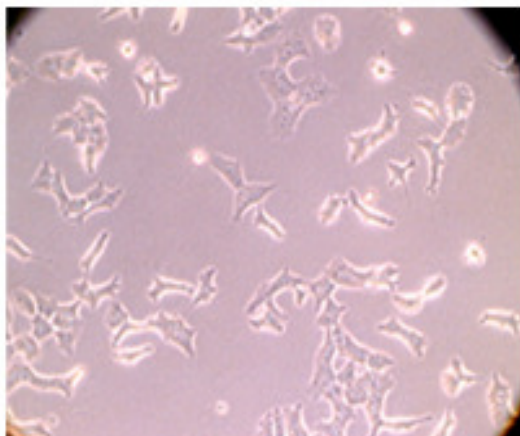
Treatment	MCF7 cells		H1299 cells	
	4 h	8 h	4 h	8 h
Untreated	4.2%	5%	2%	2%
Vincristine	14%	48%	11%	50%
Usonic acid	6%	6%	3.3%	4%

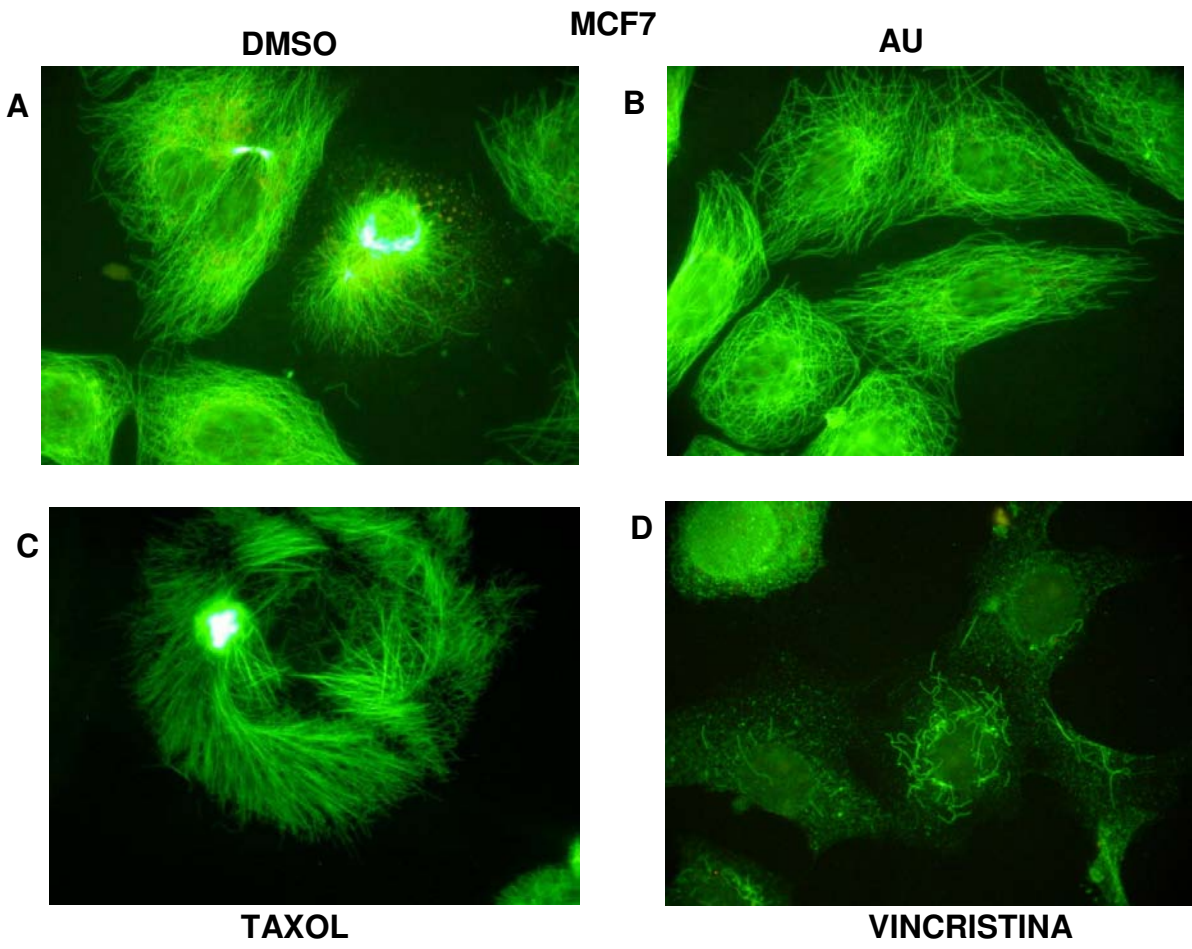
Figure 1. Chemical structure of (+)-usnic acid obtained from *Usnea dasypoga*.

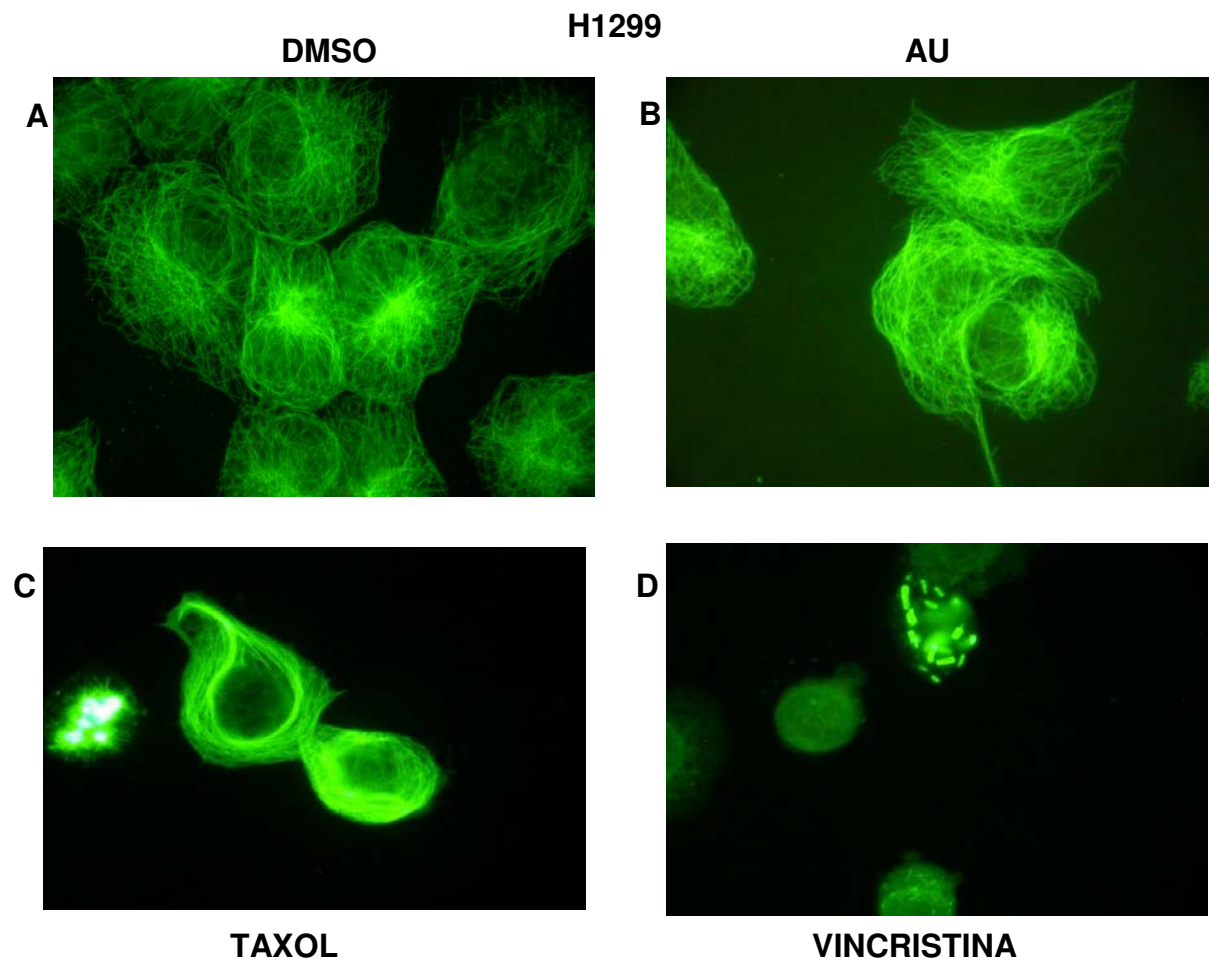
Figure 2. Effect of usnic acid on the morphology of H1299 cells. Treatment of cells with 29 μ M usnic acid for 48 h resulted in slower growth. Cells appeared to be distressed and elongated (**B**) compared to untreated cells (**A**).

Figure 3. Effect of usnic acid on formation and stabilization of microtubules in MCF7 (**Panel 1**) and H1299 (**Panel 2**) cells. Cell cultures in glass chamber slides from Lab-Tek (USA) were exposed to 29 μ M usnic acid for 4 h (not shown) and 24 h. Positive controls were prepared by treating cells with 1 μ M vincristine and 1 μ M taxol for 4 h. After treatment, cells were fixed in -20° C methanol and stained with anti- β -tubulin antibody. MCF7 cells (**1C**) and H1299 cells (**2C**) treated with taxol showed stabilized microtubules with characteristic asters and bundles whereas MCF7 cells (**1D**) and H1299 cells (**2D**) treated with vincristine showed microtubule depolymerization. However, cells treated with usnic acid MCF7 cells (**1B**) and H1299 cells (**2B**) were similar to untreated cells (**1A and 1B**) even after 24 h exposure to the drug.



A**B**





4. CONCLUSÕES

1. O ácido úsnico apresenta atividade antiproliferativa contra as seguintes linhagens de câncer humano:
 - MCF7 (câncer de mama, dependente de estrogênio, p53 normal);
 - MDA-MB-231 (câncer de mama, independente de estrogênio, p53 mutante);
 - H1299 (câncer de pulmão, nula para p53).

2. A ação antiproliferativa do ácido úsnico não envolve a despolimerização ou estabilização dos microtúbulos nas células cancerígenas humanas testadas, mesmo após 24h de exposição.

3. O ácido úsnico é um agente antitumoral não genotóxico que atua de forma independente da via p53 sendo, portanto, um candidato em potencial para novas terapias do câncer.

5. PERSPECTIVAS

CURTO PRAZO

- O ácido úsnico pode ser usado como quimioterápico de uso tópico contra o câncer de colo de útero induzido por papilomavírus (HPV), na medida em que o mecanismo de cancerização desse oncovírus é a inativação da proteína p53 por ubiquitinação e o AU atua de forma independente de p53 (Figura 13).

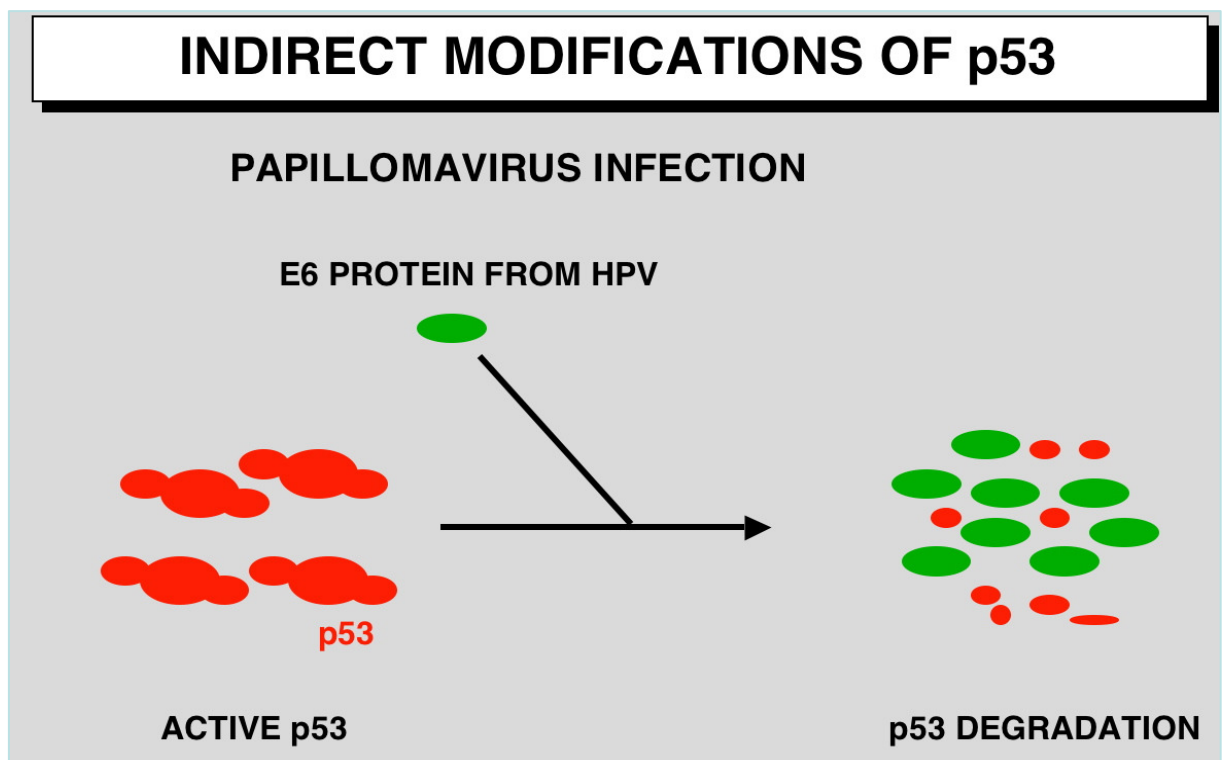


Figura 13. Inativação do p53 pelo papilomavírus (SOUSSI, 2005).

LONGO PRAZO

- Estudo da toxicidade para encontrar a dose terapêutica sistêmica segura e uso tópico em embolizações de tumores malignos vascularizados.

As propriedades do AU relatadas neste estudo sugerem o seu uso como um fármaco que responde a duas demandas importantes no panorama mundial do tratamento do câncer na atualidade, a saber: não sendo genotóxico, evita o risco de produzir malignidades secundárias mais tarde na vida dos pacientes, principalmente considerando o tratamento de cânceres na idade pediátrica e, pode atuar em células malignas que apresentam mutações na via p53, o que ocorre em mais de 50% de todos os tipos de tumores malignos humanos.

ANEXOS

USNIC ACID INCREASES p53 LEVELS IN MCF7 CANCER CELLS

Mayer, M.^{1,2,3}; O'Neill, M.A.⁵; Murray, K.E.⁵; Magalhães, N. S. S.^{2,3,4}; Carneiro-Leão, A.M.A.^{1,2}; Thompson, A.M.⁵; Appleyard, M.V.C.L.⁵

¹Dep. Morfologia e Fisiologia Animal, UFRPE, Recife, PE, Brasil; ²Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami LIKA, UFPE, Recife, PE, Brasil; ³Programa de Doutorado em Biologia, Centro de Ciências Biológicas, UFPE, Recife, PE, Brasil; ⁴Dep. Bioquímica, UFPE, Recife, PE, Brasil; ⁵Dep. of Surgery and Molecular Oncology, Ninewells Hospital and Medical School, University of Dundee, Dundee, Scotland, UK

The lichen derivative usnic acid exerts a wide variety of biological activities. Although the cytotoxic effects of usnic acid have been extensively reviewed, recent studies suggest that usnic acid may act by inhibiting RNA transcription or mitochondrial function. However, the involvement of p53 is still unknown. The objective of this work was to investigate the relationship between the antineoplastic activity of usnic acid and p53 levels. The breast cancer cell lines MCF7 (oestrogen-dependent, wild type p53) and MDA-MB-231 (oestrogen-independent, mutant p53), as well as the lung cancer cell line H1299 (null for p53) were exposed continuously for 72 h to usnic acid (0.29 to 290 µM) for MTT assays. Cell survival was determined in quadruple wells for each drug concentration. All cell lines tested were sensitive to usnic acid with IC₅₀ of around 25 µM. To determine p53 and p21 protein levels following usnic acid exposure, cancer cells were exposed to 29 µM usnic acid for 24 h and 48 h and the monoclonal antibodies DO-12 (specific for the core domain of p53) and WAF1 (for p21) were used as probes in western blot assays. Elevated p53 and p21 protein levels were detected after 24 h of exposure in MCF7 cell line when compared with vehicle controls. These levels increased after 48 h exposure. Although an increase in p21 levels is usually associated with p53 activation, studies are being carried out to confirm that. **Supported by Breast Cancer Research Scotland and CAPES**

Is the antitumour activity of usnic acid related to microtubules?

Mary A. O'Neill¹, Margareth Mayer^{2,3,4}, Karen E. Murray¹, Hercília M. L. Rolim-Santos³, Nereide S. Santos-Magalhães^{3,4,5}, Alastair M. Thompson¹ and Virginia C.L. Appleyard¹

¹Department of Surgery and Molecular Oncology, Ninewells Hospital and Medical School, University of Dundee, Dundee, Scotland, UK; ²Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, UFRPE, ³Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami; ⁴Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-UFPE, ⁵Dep. Bioquímica, UFPE.

The purpose of this work was to investigate whether the antineoplastic activity of usnic acid affects the formation and/or stabilization of microtubules by visualizing microtubules and determining mitotic indices after treatment of human cancer cells. The visualization of microtubules was carried out in breast cancer cell line MCF7 and lung cancer cell line H1299 using fluorescence microscopy. The cells were seeded in glass chamber slides, cultivated in DMEM for 24 h and treated with 29 μ M usnic acid, 1 μ M vincristine (which prevents the formation of microtubules) or 1 μ M taxol (which stabilizes microtubules) for 4 or 24 h. Cells were fixed with methanol and microtubules observed with the antibody anti- α -tubulin. The mitotic index was reported as the percentage of mitotic cells per total number of cells. Although the concentration of usnic acid was above the IC₅₀, no changes were observed in the morphology of microtubules in MCF7 or H1299 even when cells were exposed to usnic acid for considerably longer periods (24 h) than to vincristine or taxol (4 h). The treatment of MCF7 and H1299 cells with usnic acid yielded mitotic indexes of 6% and 4%, respectively, whereas vincristine presented a mitotic index of about 50% after 8h. Therefore, the usnic acid did not arrest the cell cycle at M phase. These results indicate that the disruption of normal metabolic processes in cells triggered by the action of usnic acid does not primarily involve depolymerization or stabilization of microtubules in breast or lung cancer cells. They also suggest that the antitumour activity of usnic acid is not related to alterations in the formation and/or stabilization of microtubules.

Financial support: Breast Cancer Research Scotland, CNPq/MCT.



ANTI-CANCER DRUGS

[Home](#) | [Search](#) | [Current Issue](#) | [Archive](#)

Journal Information

Anti-Cancer Drugs reports both clinical and experimental results related to anti-cancer drugs, and welcomes contributions on anti-cancer drug design, drug delivery, pharmacology, hormonal and biological modalities and chemotherapy evaluation. An internationally refereed journal devoted to the fast publication of innovative investigations on therapeutic agents against cancer, **Anti-Cancer Drugs** aims to stimulate and report research on both toxic and non-toxic anti-cancer agents. Consequently, the scope on the journal will cover both conventional cytotoxic chemotherapy and hormonal or biological response modalities such as interleukins and immunotherapy.



Publication & Editorial Staff Contacts

Publisher

Phil Daly
pdaly@lww.co.uk

Production Editor

Jo Duggan
jduggan@lww.co.uk

Marketing Manager

Anna Norman
anorman@lww.co.uk

LWW Business Offices

250 Waterloo Road
London SE1 8RD, UK
Tel: +44 20 7981-0676
Fax: +44 20 7981-0556

US and Canada Advertising

Linda Martin
Lippincott Williams & Wilkins
530 Walnut Street
Philadelphia, PA 19106
Tel: 215-521-8570
E-mail: lmartin@lww.com

Editor-in-Chief

Mels Sluysen, PhD
The Netherlands Cancer Institute
Plesmanlaan 121
1066 CX Amsterdam
The Netherlands
Phone: +31 35 52 59 943
Fax: +31 20 51 22 029
m.sluysen@planet.nl

International Advertising Representative

The Point of Difference
4 Chase Avenue
London SW20 8LU
Tel: +44 (0)20 8542 3200
Fax: +44 (0)20 8543 3810
pointofdifference@btinternet.com

JOURNAL RESOURCES

[Editorial Board](#)
[Classified Ads](#)
[Special Sales](#)



SUBSCRIPTION SERVICES

[New Subscriptions](#)
[Renewal Information](#)
[Address Changes](#)
[Trial Issue Request](#)



JOURNAL PROFILE

Impact Factor:
2.052
Rank: 69th of
123

Category:
Oncology

 **INDEXING
SOURCES**

Index
Medicus/Med
line
Current
Contents/Life
Sciences
Science
Citation
Index
SCISEARCH
Medical
Documentati
on Service
Resea
rch Alert
Excer
pta
Medica/EMB
ASE
Chemical
Abstracts
CABS
(Current
Awareness
in Biological
Sciences)
Cambr
idge
Scientific
Abstracts
BIOSIS
ADONIS (via
CD-ROM)

**Copyright © 2006, Lippincott
Williams & Wilkins. All rights
reserved.
Published by Lippincott Williams &
Wilkins.**
**Copyright/Disclaimer Notice •
Privacy Policy**
 **Subscribe to [RSS](#) feed**

Author Resources



Author Resources

- [Instructions for Authors](#) (this page)
- [Copyright Transfer Form](#) (PDF)
- [Standard Covering Letter](#) (PDF)
- [Reprint Ordering](#)
- [Permissions Requests](#)

Note: These instructions comply with those formulated by the International Committee of Medical Journal Editors. For further details, authors should consult the following article: International Committee of Medical Journal Editors. "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" *N Engl J Med* 1997;**336**:309–315. The complete document appears at www.icmje.org.

SCOPE

Anti-Cancer Drugs is devoted to the rapid publication of innovative investigations on therapeutic agents against cancer and methods to diminish adverse effects of drugs. The journal publishes peer reviewed articles on anti-cancer drug design, drug delivery, pharmacology and chemotherapy evaluation.

POINTS TO CONSIDER WHEN SUBMITTING YOUR PAPER TO ONE OF OUR JOURNALS

We have prepared a standard covering letter (available from the journal website) to accompany your submission. Whether you use this letter or your own wording, please think carefully about the following points and make the appropriate declarations.

Redundant or duplicate publication

We ask you to confirm that your paper has not been published in its current form or a substantially similar form (in print or electronically, including on a web site), that it has not been accepted for publication elsewhere, and that it is not under consideration by another publication. The International Committee of Medical Journal Editors has provided details of what is and what is not duplicate or redundant publication (<http://www.icmje.org>). If you are in doubt (particularly in the case of material that you have posted on a web site), we ask you to proceed with your submission but to include a copy of the relevant previously published work or work under consideration by other journals. In your covering letter to the editors, draw attention to any published work that concerns the same patients or subjects as the present paper.

Conflicts of interest

We ask authors to state all possible conflicts of interest, including financial and other relationships. If you are sure that there is no conflict of interest, please state this. You might like to look at an editorial in the British Medical Journal on Beyond conflict of interest (<http://bmj.com/cgi/content/short/317/7154/291>). Remember that sources of funding should be acknowledged in your paper.

Permissions to reproduce previously published material

We ask you to send us copies of permission to reproduce material (such as illustrations) from the copyright holder. We cannot send your paper to press without

these permissions!

Patient consent forms

The protection of a patient's right to privacy is essential. We ask you to send copies of patient consent forms on which patients or other subjects of your experiments clearly grant permission for the publication of photographs or other material that might identify them. If the consent form for your research did not specifically include this, please obtain it or remove the identifying material. A sample patient consent form is available from the Journal's website if required.

Ethics committee approval

You must state clearly in your submission in the Methods section that you conducted studies on human participants must with the approval of an appropriate named ethics committee. Please also look at the latest version of the Declaration of Helsinki (<http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>). Similarly, you must confirm that experiments involving animals adhered to ethical standards and must state the care of animal and licensing guidelines under which the study was performed.

Authorship

We ask that all authors sign the submission letter. First, we have (rarely) had problems when someone named as an author was not aware of the submission of a paper and, on occasion, did not support the findings published. We therefore ask all authors to confirm that they have read and approved the paper. Second, we ask all authors to confirm that they have met the criteria for authorship as established by the International Committee of Medical Journal Editors, believe that the paper represents honest work, and are able to verify the validity of the results reported. You might also be interested to read the debate on authorship in general in the British Medical Journal's Authorship collection (<http://bmj.com/cgi/collection/authorship>). Many of the points covered above are discussed in the New England Journal of Medicine's collection of papers entitled 'Editorials on Journal Policy' (<http://authors.nejm.org/Misc/Policies.asp>).

Copyright assignment

Papers are accepted for publication on the understanding that exclusive copyright in the paper is assigned to the Publisher. Authors are asked to sign a copyright assignment form after acceptance of their papers. They may use material from their paper in other words published by them.

Submissions

Authors are strongly encouraged to submit their manuscripts through the web-based tracking system at <http://www.editorialmanager.com/acd>. Signed author forms may be included in the submission as a 'supporting document' or mailed to the journal office. The site contains instructions and advice on how to use the system. Authors should NOT in addition then post a hard copy submission to the editorial office, unless you are supplying artwork, letters or files that cannot be submitted electronically, or have been instructed to do so by the editorial office. Include the following where appropriate: subject consent forms; transfer of copyright form; permission to reproduce previously published material; checklist. For those authors who have no option but to submit by mail please send one copy of the article, plus an electronic version on disk or CD-ROM to the following address: Dr Mels Sluysen, Editor-in-Chief, **Anti-Cancer Drugs**, The Netherlands Cancer Institute, Plesmanlaan 121, 1066 AC Amsterdam, The Netherlands. Tel: (+31) 35 52 59 943; Fax: (+31) 20 51 22 029; E-mail: m.sluyser@planet.nl.

Double spacing should be used throughout the manuscript, which should include the following sections, each starting on a separate page: title page, abstract and

keywords, text, acknowledgements, references, individual tables and captions. Margins should be not less than 3 cm. Pages should be numbered consecutively, beginning with the title page, and the page number should be placed in the top right hand corner of each page. Abbreviations should be defined on their first appearance in the text; those not accepted by international bodies should be avoided. Authors are invited to list up to four potential reviewers, including their full addresses, telephone and fax numbers, and e-mail addresses.

PRESENTATION OF PAPERS

Title Page

The title page should carry the full title of the paper and a short title to be used as a 'running head' (and which should be so identified). The first name, middle initial and last name of each author should appear. If the work is to be attributed to a department or institution, its full name should be included. Any disclaimers should appear on the title page, as should the name and address of the author responsible for correspondence concerning the manuscript and the name and address of the author to whom requests for reprints should be made. Finally, the title page should include the sources of any support for the work in the form of grants, equipment, drugs, or any combination of these.

Abstracts

The second page should carry a structured abstract of no more than 250 words. The abstract should state the Objective(s) of the study or investigation, basic Methods (selection of study subjects or laboratory animals; observational and analytical methods), main Results (giving specific data and their statistical significance, if possible), and the principal Conclusions. It should emphasise new and important aspects of the study or observations.

Key Words

The abstract should be followed by a list of 3–10 keywords or short phrases which will assist the cross-indexing of the article and which may be published. When possible, the terms used should be from the Medical Subject Headings list of the *Index Medicus* (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.html>).

Text

Full papers of an experimental or observational nature may be divided into sections headed Introduction, Methods (including ethical and statistical information), Results and Discussion (including a conclusion), although reviews may require a different format.

Acknowledgements

Acknowledgements should be made only to those who have made a substantial contribution to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from people acknowledged by name in case readers infer their endorsement of data and conclusions.

References

References should be numbered consecutively in the order in which they first appear in the text. They should be assigned Arabic numerals, which should be given in brackets, e.g. [17]. References should include the names of all authors when six or fewer; when seven or more, list only the first six names and add et al. References should also include full title and source information. Journal names should be abbreviated as in the *Index Medicus* (http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/terms_cond.html).

Articles in journals

Standard journal article:

Hayakawa S, Kimura T, Saeki K, et al. Apoptosis-inducing activity of high molecular weight fractions of tea extracts. *Biosci Biotechnol Biochem* 2001; **65**: 459–62.

More than six authors:

Kopf AW, Gross DF, Rodgers GS, Rigel DS, Hellman LJ, Levenstein M, et al. Prognostic index for malignant melanoma. *Cancer* 1987; **59**: 1236–1241

Supplements:

Gianni AM, Berinstein NL, Evans PAS, López-Guillermo A, Solano C. Stem-cell transplantation in non-Hodgkin's lymphoma: improving outcome. *Anticancer Drugs* 2002; **13** (suppl): S35-42.

Books*Book:*

DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA. *Cancer: principles & practice of oncology*, 7th edn. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

Chapter in a book:

Restifo NP, Wunderlich JR. Cancer Immunology. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds. *Cancer: principles & practice of oncology*, 7th edn. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005: 139-161.

Personal communications and unpublished work should not feature in the reference list but should appear in parentheses in the text. Unpublished work accepted for publication but not yet released should be included in the reference list with the words 'in press' in parentheses beside the name of the journal concerned. References must be verified by the author(s) against the original documents.

Tables

Each table should be typed on a separate sheet in double spacing. Tables should not be submitted as photographs. Each table should be assigned an Arabic numeral, e.g. (Table 3) and a brief title. Vertical rules should not be used. Place explanatory matter in footnotes, not in the heading. Explain in footnotes all non-standard abbreviations that are used in each table. Identify statistical measures of variations, such as standard deviation and standard error of the mean.

Be sure that each table is cited in the text. If you use data from another published or unpublished source, obtain permission and acknowledge the source fully.

Illustrations

References to figures and tables should be made in order of appearance in the text and should be in Arabic numerals in parentheses, e.g. (Fig. 2). Most file formats are accepted, but TIFF and EPS files, with fonts embedded, are preferred. If scanned, line art should be at a resolution of 800 dpi, and halftones and colour at 300 dpi. All colour values should be CMYK. If hard copies are submitted they should have a label pasted to the back bearing the figure number, the title of the paper, the author's name and a mark indicating the top of the figure. Illustrations should be presented to a width of 82 mm or, when the illustration demands it, to a width of 166 mm. Photomicrographs must have internal scale markers. If photographs of people are used, their identities must be obscured or the picture must be accompanied by written consent to use the photograph. If a figure has been published before, the original source must be acknowledged and written permission from the copyright holder for both print and electronic formats should be submitted with the material. Permission is required regardless of authorship or publisher, except for documents in

the public domain. Figures may be reduced, cropped or deleted at the discretion of the editor. Colour illustrations are acceptable but authors will be expected to cover the extra reproduction costs (for current charges, contact the publisher).

Legends for illustrations

Captions should be typed in double spacing, beginning on a separate sheet of paper. Each one should have an Arabic numeral corresponding to the illustration to which it refers. Internal scales should be explained and staining methods for photomicrographs should be identified.

Units of measurement

Measurements of length, height, weight, and volume should be reported in metric units (metre, kilogram, or litre) or their decimal multiples. Temperatures should be given in degrees Celsius. Blood pressures should be given in millimetres of mercury.

All haematologic and clinical chemistry measurements should be reported in the metric system in terms of the International System of Units (SI). Editors may request that alternative or non-SI units be added by the authors before publication.

Abbreviations and symbols

Use only standard abbreviations. Avoid abbreviations in the title and abstract. The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement.

Offprints

Offprints may be purchased using the appropriate form that will be made available with proofs. Orders should be sent when the proofs are returned; orders received after this time cannot be fulfilled.

Copyright ©2005, Lippincott Williams & Wilkins. All rights reserved.

Published by Lippincott Williams & Wilkins.

[Copyright/Disclaimer Notice](#) • [Privacy Policy](#)