

KÍVIA APARECIDA PONTES DE OLIVEIRA

**HOMEOSTASE DE Ca^{2+} E FUNÇÃO MITOCONDRIAL NA
MORTE DE CÉLULAS DE CÂNCER DE PRÓSTATA
INDUZIDA POR ESTATINAS**

CAMPINAS

Unicamp

2008

KÍVIA APARECIDA PONTES DE OLIVEIRA

**HOMEOSTASE DE Ca^{2+} E FUNÇÃO MITOCONDRIAL NA
MORTE DE CÉLULAS DE CÂNCER DE PRÓSTATA
INDUZIDA POR ESTATINAS**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas, para a obtenção do título de
Mestre em Fisiopatologia Médica, área de concentração
em Biologia Estrutural, Celular e do Desenvolvimento.

ORIENTADOR: PROF. DR. ANÍBAL EUGÊNIO VERCESI

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. ROGER FRIGÉRIO CASTILHO

CAMPINAS

Unicamp

2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

OL4h

Oliveira, Kívia Aparecida Pontes de
Homeostase de Ca^{2+} e função mitocondrial na morte de células de
câncer de próstata induzida por estatinas / Kívia Aparecida Pontes de
Oliveira. Campinas, SP : [s.n.], 2008.

Orientadores : Aníbal Eugênio Vercesi, Roger Frigério Castilho
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Próstata - Cancer. 2. Próstata - Doenças. 3. Poro de
Transição de Permeabilidade Mitocondrial. 4. Morte celular. I.
Vercesi, Aníbal Eugênio. II. Castilho, Roger Frigério. III.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
IV. Título.

**Título em inglês : Calcium homeostasis and mitochondrial function during
death of prostate cancer cells exposed to statins**

Keywords: • Prostate neoplasm
• Prostate Disease
• Mitochondrial permeability transition pore
• Cell death

Titulação: Mestre em Fisiopatologia Médica

Área de concentração: Biologia Estrutural, Celular e do Desenvolvimento

Banca examinadora:

Prof. Dr. Aníbal Eugênio Vercesi

Prof. Dr. Roger Chammas

Prof. Dr. Hernández Faustino de Carvalho

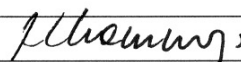
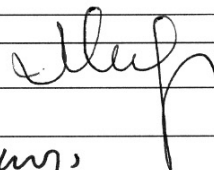
Data da defesa: 27 - 02 - 2008

Banca examinadora de Dissertação de Mestrado

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Aníbal Eugênio Vercesi



Membros:
Professor (a) Doutor (a) Hernandes Faustino de Carvalho
Professor (a) Doutor (a) Roger Chammas



Curso de pós-graduação Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 27/02/2008

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Bioenergética, Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental (NMCE), Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), sob a orientação do Professor Dr. Aníbal Eugênio Vercesi, com bolsa da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - processo n° 05/57334-1), na vigência dos auxílios concedidos pela FAPESP (processos n° 03/08514-1 e 06/59786-0) e pelo Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – processo n° 479102/2006-6).

DEDICO

*Aos meus pais, Anísio e Nicéia,
pelo amor incondicional,
confiança e apoio constantes.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, professor eterno, que me ensina a cada dia a ser uma pessoa melhor.

Ao meu orientador Professor Aníbal Eugênio Vercesi, pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa, pela confiança em meu trabalho, pelo apoio e pela oportunidade de aprender com seu exemplo. Obrigada por me ensinar que a dedicação e a organização são essenciais para a realização de um bom trabalho!

Ao Professor Roger Frigério Castilho pelas valiosas discussões científicas e por todo aprendizado que contribuiu muito para o meu crescimento científico.

Aos professores membros da banca e pré-banca Roger Chammas, Hernandes Faustino de Carvalho, Carmen Veríssima Ferreira, Lício Augusto Velloso e Giovanna Rosa Degasperi pelas revisões e sugestões.

Ao Professor Jiri Borecký pelas dicas de redação científica, pela disponibilidade e generosidade no dia-a-dia e pelas valiosas discussões científicas.

Aos amigos do Laboratório de Bioenergética pela ajuda mútua e pela convivência enriquecedora.

A meus pais, que apesar da distância e da saudade sempre me deram amor e apoio incondicionais para que eu desenvolvesse o meu potencial e escolhesse o meu caminho.

Aos meus demais familiares e amigos que estão a meu lado nos momentos tristes e felizes.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de bolsa para o desenvolvimento desse projeto de mestrado.

Por fim, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram e compartilharam esse período.

*“Ainda que eu conheça todos os mistérios e toda a
ciência, se eu não tiver amor, nada serei”.*

São Paulo

	PÁG.
RESUMO	<i>xiv</i>
ABSTRACT	<i>xvi</i>
1- INTRODUÇÃO	18
1.1- Câncer de próstata	19
1.2- Estatinas	20
1.3- Estatinas e câncer	24
1.4- Mitocôndria e morte celular	26
1.5- Homeostase de Ca²⁺ e morte celular	31
2- OBJETIVOS	34
2.1- Objetivo geral	35
2.2- Objetivos específicos	35
3- MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1- Reagentes	37
3.2- Cultivo de células	37
3.3- Análise da viabilidade e da proliferação de células em cultura	37
3.4- Avaliação de mecanismos relacionados à morte celular	38
3.5- Citometria de fluxo	38
3.5.1- Avaliação de taxas de morte celular.....	38
3.5.2- Medida da concentração de Ca ²⁺ livre no citosol.....	39

3.6- Determinação do potencial de membrana mitocondrial.....	39
3.7- Determinação do consumo de oxigênio.....	40
3.8- Análise Estatística.....	40
4- RESULTADOS.....	41
4.1- Testes Dose-Resposta.....	42
4.1.1- Diminuição da proliferação e da viabilidade de células LNCaP expostas a estatinas.....	42
4.1.2- Diminuição da proliferação e da viabilidade de células PC-3 expostas a estatinas.....	44
4.2- Morte de células PC-3 induzida por sinvastatina.....	45
4.3- O aumento da $[Ca^{2+}]_{cit}$ no processo de apoptose de células PC-3 é sensível a mevalonato.....	48
4.4- A apoptose de células de câncer de próstata não é dependente da proteína p53.....	50
4.5- A necrose de células PC-3 é dependente de calcineurina e de TPM	51
4.6- O aumento da $[Ca^{2+}]_{cit}$ em células PC-3 durante o processo de necrose não é sensível aos inibidores de TPM e de calcineurina.....	52
4.7- A sinvastatina causa disfunção mitocondrial em células PC-3 sensível aos inibidores de TPM e calcineurina.....	54
5- DISCUSSÃO.....	58
6- CONCLUSÕES.....	67
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	adenosina difosfato
ATP	adenosina trifosfato
AV	anexina V
BAPTA	ácido tetracético 1,2-bis(2-aminofenoxi) etano N, N, N', N'
BA	boncrecato
Ca²⁺	íon cálcio
CAT	carboxiatractilosídio
[Ca²⁺]_{cit}	concentração de cálcio citossólico
CR	controle respiratório
CsA	ciclosporina A
DNA	ácido desoxirribonucléico
DU145	linhagem celular de câncer de próstata
$\Delta\Psi_m$	potencial de membrana mitocondrial
EDTA	ácido etilenodiaminotetraacético
EGTA	ácido etileno glicol-bis (β -aminoetil éter) - N,N,N',N' - tetraacético
EROs	espécies reativas de oxigênio
FCCP	carbonil cianido p-(trifluometoxi)fenil-hidrazona
GTP	guanosina trifosfato
HEPES	ácido N-(2-hidroxietil)piperazino-N'-(2-etanosulfônico)
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A
H₂O₂	peróxido de hidrogênio

IP	iodeto de propídio
LNCaP	linhagem celular de câncer de próstata
Ma	mevalonato
NADH	nicotinamida adenina-dinucleotídeo (estado reduzido)
NADPH	nicotinamida adenina-dinucleotídeo-fosfato (estado reduzido)
NADP⁺	nicotinamida adenina-dinucleotídeo-fosfato (estado oxidado)
O₂	oxigênio
O₂^{•-}	ânion radical superóxido
OH[•]	radical hidroxila reativo
PBS	tampão fosfato-salina
PC-3	linhagem celular de câncer de próstata
PFT	pifitrina- α
P_i	fosfato inorgânico
PTP	poro de transição de permeabilidade mitocondrial
SFB	soro fetal bovino
TPM	transição de permeabilidade mitocondrial

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1- Linhagens celulares de câncer de próstata.....	20
Figura 2- Estruturas químicas das estatinas.....	21
Figura 3- Via de síntese do mevalonato.....	23
Figura 4- TPM induzida por aumento de Ca^{2+} e acúmulo de EROs.....	28
Figura 5- Cascatas de sinalização das vias apoptóticas extrínseca e intrínseca.....	30
Figura 6- Inibição da proliferação e morte de células LNCaP por lovastatina.....	43
Figura 7- Inibição da proliferação e morte de células LNCaP por sinvastatina.....	43
Figura 8- Inibição da proliferação e morte de células PC-3 por lovastatina...	44
Figura 9- Inibição da proliferação e morte de células PC-3 por sinvastatina.....	45
Figura 10- A apoptose de células PC-3 induzida por sinvastatina 10 μM é inibida por mevalonato.....	46
Figura 11- A necrose de células PC-3 induzida por sinvastatina 60 μM é inibida por ciclosporina.....	47
Figura 12- O aumento da concentração de Ca^{2+} citossólico no processo de apoptose de células PC-3 é inibido por mevalonato.....	49
Figura 13- A proteína p53 não é importante para a apoptose causada por sinvastatina em células de câncer de próstata.....	50
Figura 14- Prevenção de necrose por CsA, FK, BA e BAPTA.....	51

Figura 15-	O aumento da concentração de Ca^{2+} citossólico no processo de necrose de PC-3 não é sensível aos inibidores de calcineurina e de TPM.....	53
Figura 16-	A diminuição de $\Delta\Psi_m$ de células PC-3 induzida por sinvastatina é sensível aos inibidores de calcineurina e de TPM.....	55
Figura 17-	A diminuição da respiração de células PC-3 induzida por sinvastatina é sensível aos inibidores de calcineurina e de TPM....	56

RESUMO

As estatinas são inibidores da 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA (HMG-CoA) redutase usados no tratamento de hipercolesterolemia. Estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que as estatinas podem ter efeitos anti-cancerígenos. No presente estudo analisamos os mecanismos de toxicidade de sinvastatina e de lovastatina nas linhagens de câncer de próstata LNCaP e PC-3. Curvas dose-resposta do efeito das estatinas (0,1-100 μM) sobre as células LNCaP e PC-3 mostraram efeitos similares e maior sensibilidade das células PC-3 do que das células LNCaP. Tratamentos de células PC-3 com sinvastatina 10 μM durante 48 h induziu morte principalmente por apoptose, a qual foi associada ao aumento de 3 vezes da $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$. Tanto a apoptose quanto o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ foram prevenidos por mevalonato 100 μM presente no meio de cultura. Isso indica que a inibição da HMG-CoA redutase leva à apoptose mediada por Ca^{2+} . Pifitrina- α , inibidor da proteína supressora tumoral p53, não preveniu apoptose em células PC-3 (p53 negativas) nem em células LNCaP (p53 positivas). Isso mostrou que a apoptose de células de câncer de próstata induzida por estatinas é independente de p53. Sinvastatina 60 μM induziu morte de células PC-3 principalmente por necrose, a qual foi associada ao aumento de 3 vezes da $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ e à diminuição da respiração e do potencial de membrana mitocondrial. Tanto a necrose quanto a disfunção mitocondrial foram parcialmente prevenidas pelos compostos ciclosporina A (inibidor da transição de permeabilidade mitocondrial [TPM] e da fosfatase calcineurina), FK506 (inibidor de calcineurina) e boncrecato (inibidor da TPM). O aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ não foi prevenido por ciclosporina A, FK506 ou boncrecato, porém a complexação de Ca^{2+} citossólico com BAPTA protegeu as células PC-3 da necrose, sugerindo que o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ seja um dos primeiros passos no processo de necrose celular, seguido pela ativação da via de calcineurina. Conclui-se que a apoptose induzida por sinvastatina em células PC-3 seja dependente da via do mevalonato enquanto que a necrose seja dependente da via da calcineurina associada à disfunção mitocondrial.

ABSTRACT

Statins are 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA (HMG-CoA) reductase inhibitors used in the treatment of hypercholesterolemia. Both *in vitro* and *in vivo* studies have demonstrated that statins may have anti-cancer effects. In the present study we analyzed the mechanisms of simvastatin and lovastatin toxicity to the human prostate cancer cell lines LNCaP and PC-3. Dose-response curves of statins (0.1-100 μ M) effects upon LNCaP and PC-3 cells showed similar effects and higher sensitivity of PC-3 than LNCaP cells. Treatments of PC-3 cells with 10 μ M simvastatin during 48 h induced death mainly by apoptosis, which was associated with a 3-fold increase in $[Ca^{2+}]_{cyt}$. Both apoptosis and $[Ca^{2+}]_{cyt}$ increase were prevented by 100 μ M mevalonate present in the culture medium. This indicates that the inhibition of HMG-CoA reductase is followed by Ca^{2+} mediated apoptosis. Pifithrin- α , an inhibitor of tumor suppressor p53 protein, did not prevent apoptosis either in PC-3 (p53 negative) or LNCaP (p53 positive) cells. This showed that apoptosis of prostate cancer cells induced by statins is p53 independent. At 60 μ M, simvastatin induced death in PC-3 cells mainly by necrosis, which was associated with a 3-fold increase in PC-3 $[Ca^{2+}]_{cyt}$, and decrease in both respiration and mitochondrial membrane potential. Both necrosis and mitochondrial dysfunction were partially prevented by the compounds cyclosporine A (mitochondrial permeability transition [MPT] and calcineurin inhibitor), FK506 (calcineurin inhibitor), and bongkreikic acid (MPT inhibitor). Increase in $[Ca^{2+}]_{cyt}$ was not prevented by cyclosporine A, FK506 or bongkreikic acid, but chelation of $[Ca^{2+}]_{cyt}$ with BAPTA protected PC-3 cells from necrosis, suggesting rise in $[Ca^{2+}]_{cyt}$ is one of the first steps in the process of cell necrosis and is followed by activation of the calcineurin pathway. We may conclude that simvastatin-induced apoptosis in PC-3 cells is dependent on the mevalonate pathway whereas necrosis is dependent on the calcineurin pathway associated with mitochondrial dysfunction.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Câncer de próstata

O câncer de próstata é o tumor maligno mais prevalente em homens e o quinto mais freqüente no mundo. O número de casos novos diagnosticados em 2002 representa 19% de todos os casos de câncer em países desenvolvidos e 5,3% dos casos de câncer em países em desenvolvimento (Parkin et al., 2005). Quando a doença está localizada somente no órgão de origem, ela pode ser tratada por cirurgia ou radiação. Entretanto, quando ocorrem metástases, a doença é praticamente incurável (Amanatullah et al., 2000). Após o trabalho de Charles Huggins (Denmeade & Isaacs, 2002), a terapia de restrição de andrógeno tornou-se o tratamento mais utilizado para o câncer de próstata em estágio avançado. Infelizmente, esse tratamento não elimina totalmente as células tumorais e depois de um período variável (9-30 meses) ocorre a seleção e a proliferação de células independentes de andrógeno (Laufer et al, 2000). Por isso, drogas que induzem morte das células desse tumor podem ser uma alternativa para o seu controle.

As três linhagens de células humanas de câncer de próstata mais utilizadas para estudos *in vitro* são: LNCaP, PC-3 e DU 145 (Peehl, 2005). Nesse trabalho foram utilizadas células LNCaP e células PC-3 (Fig. 1), que são consideradas linhagens dependente e independente de andrógeno, respectivamente. A linhagem celular LNCaP é proveniente do linfonodo supraventricular esquerdo de um homem caucasiano de 50 anos com diagnóstico de carcinoma de próstata metastático (Murphy, 1980) e a linhagem PC-3 foi obtida do osso de um homem caucasiano de 62 anos com diagnóstico de metástase de carcinoma de próstata em estágio IV (Kaighn et al., 1979).

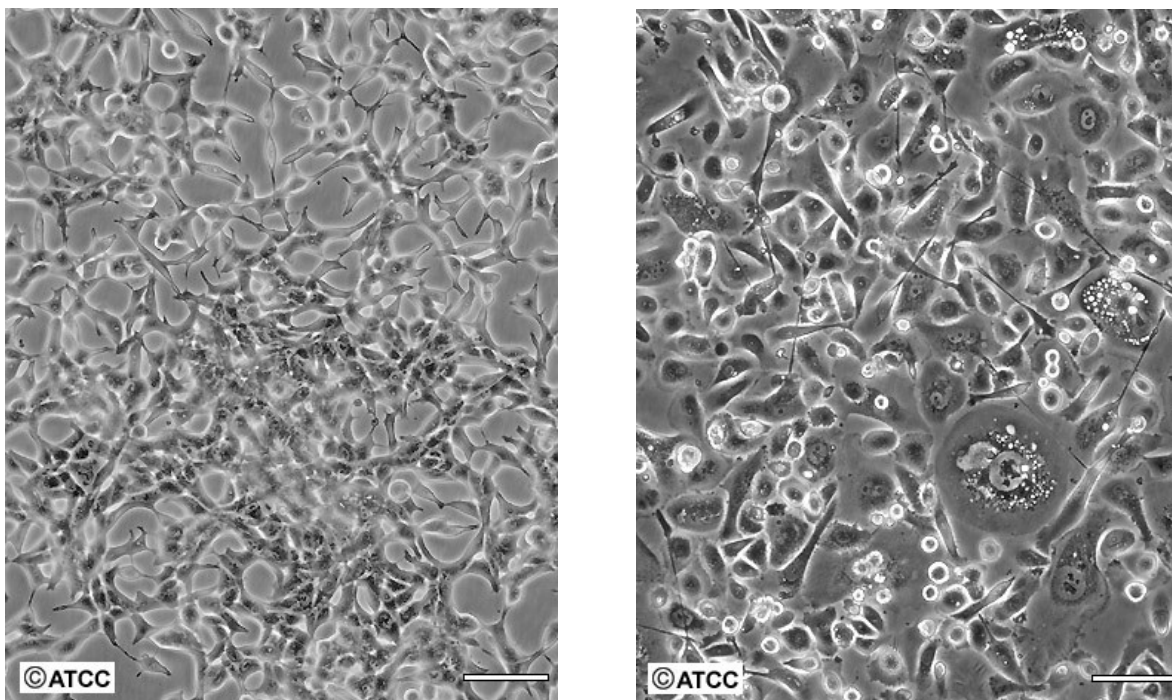


Figura 1- Linhagens celulares de câncer de próstata. Foto de cultura de células LNCaP (esquerda) e foto de cultura de células PC-3 (direita). As fotos foram obtidas do site da ATCC (*American Type Culture Collection*).

1.2- Estatinas

As estatinas são substâncias naturais (derivadas de culturas de fungos) ou sintéticas, capazes de diminuir a concentração de colesterol plasmático através da inibição da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima-A (HMG-CoA) redutase, que catalisa a conversão de HMG-CoA em mevalonato, etapa que limita a síntese *de novo* de colesterol (Endo, 1994). Lovastatina, sinvastatina e pravastatina são estatinas naturais enquanto atorvastatina, rosuvastatina, cerivastatina, pitavastatina e fluvastatina são estatinas sintéticas. Dentre essas estatinas, pravastatina e rosuvastatina são as estatinas menos hidrofóbicas por possuírem um grupo hidroxila e um grupo sulfonamida metano, respectivamente, em suas estruturas (Schachter, 2004). Veja as estruturas químicas das principais estatinas na Fig. 2.

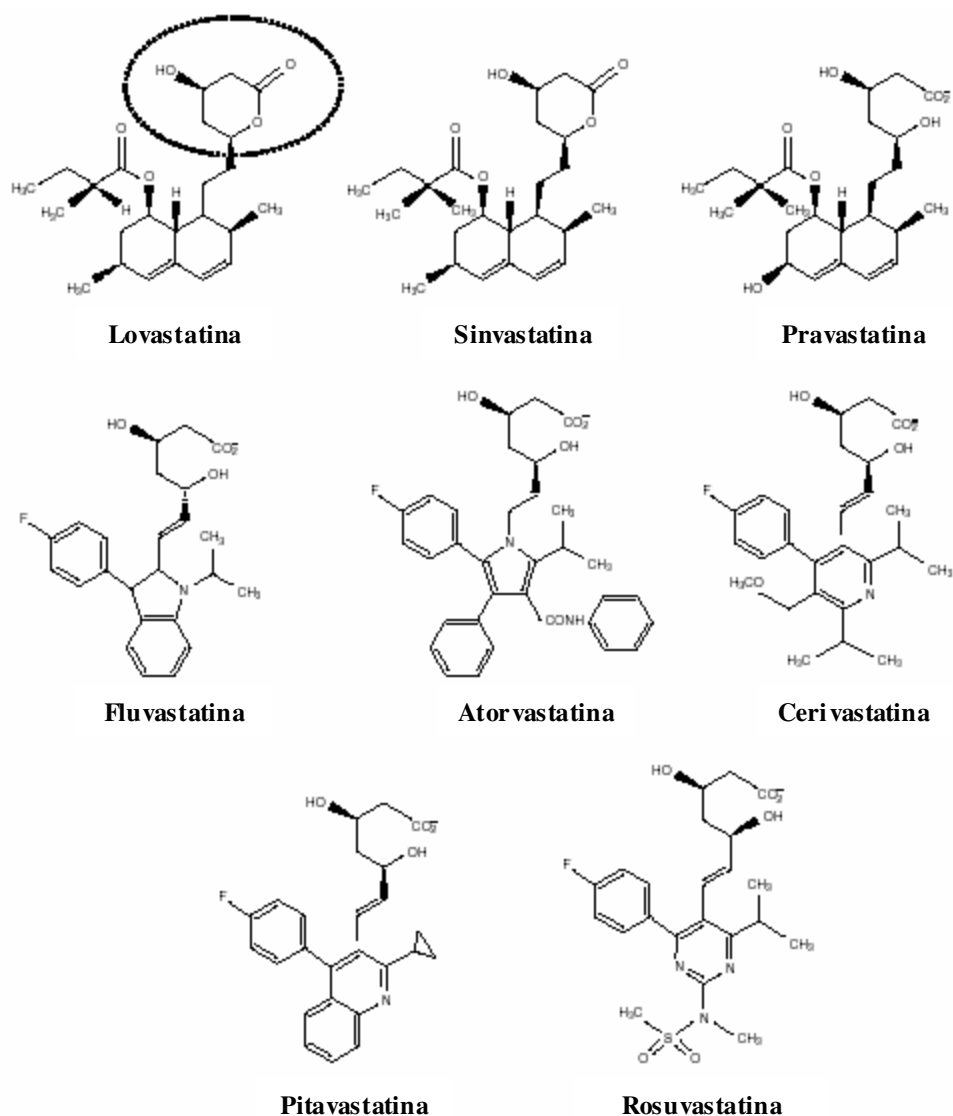


Figura 2- Estruturas químicas das estatinas. As estruturas podem ser divididas em 3 partes: (1) estrutura análoga ao HMG-CoA, substrato da enzima alvo (circulada na estrutura da lovastatina); (2) estrutura hidrofóbica de anel covalentemente ligada ao análogo da HMG-CoA e envolvida na ligação da estatina à enzima alvo; (3) grupos laterais dos anéis que definem as propriedades de solubilidade dessas drogas. (Figura adaptada de Schachter, 2004).

Atualmente, as estatinas são amplamente utilizadas nos tratamentos de hipercolesterolemia. Esses fármacos inibem reversível e competitivamente a enzima HMG-CoA redutase devido a sua alta afinidade pela enzima e a sua similaridade com o substrato HMG-CoA. A diminuição intracelular de colesterol estimula a síntese de receptores de LDL (*low density lipoprotein*), o que determina maior captação das LDL-C (*low-density lipoprotein cholesterol*) em circulação e conseqüente diminuição da concentração de LDL-C do plasma (Hobbs et al, 1992). As estatinas também aumentam a concentração de HDL-C (*high-density lipoprotein cholesterol*) e diminui a concentração de triacilglicerídios (Maron et al., 2000).

Além de diminuir a concentração de colesterol, as estatinas também inibem outros produtos e outras reações da via do mevalonato (Fig. 3), incluindo a produção de isoprenóides como os grupos farnesil e geranilgeranil, que se ligam a várias proteínas (como por exemplo, os membros da superfamília Ras/Rho) através de prenilação durante o processo pós-traducional. A adição desses grupos permite a ancoragem dessas proteínas na membrana celular, etapa necessária para o seu funcionamento normal (Edwards & Ericsson, 1999).

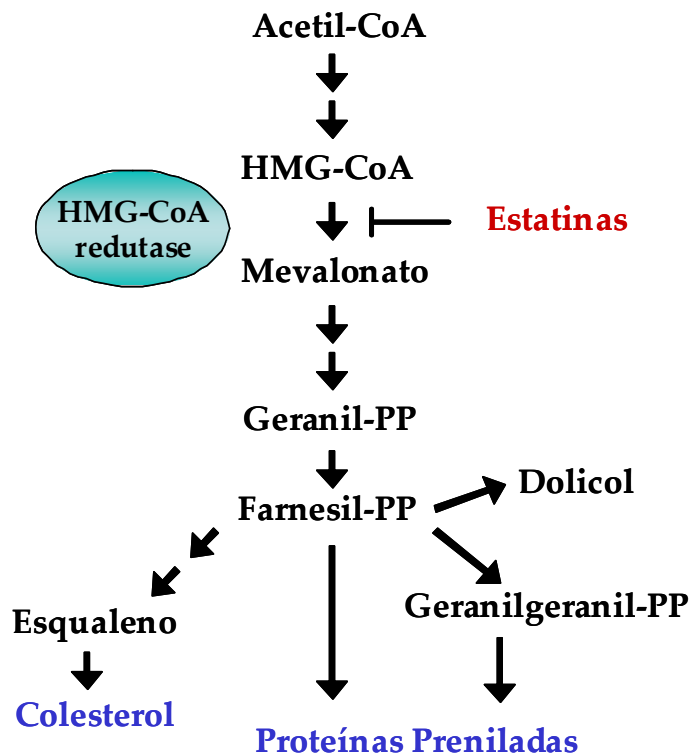


Figura 3- Via de síntese do mevalonato. Estatinas inibem a conversão de HMG-CoA em mevalonato. Sem a presença de precursor mevalonato, não é produzido o geranilpirofosfato (Geranil-PP) e conseqüentemente não há produção de colesterol nem prenilação de proteínas que dependem da formação de farnesilpirofosfato (Farnesil-PP) e/ou de geranilgeranilpirofosfato (Geranilgeranil-PP). Figura adaptada de Schachter, 2004.

Os efeitos da estatina resultantes da diminuição da concentração de colesterol são conhecidos como efeitos hipolipemiantes, enquanto os demais são chamados efeitos pleiotrópicos. A inibição da prenilação de proteínas e a ligação da estatina diretamente à integrina LFA1 (*lymphocyte-function-associated antigen 1*), a qual tem uma função importante na migração de leucócitos e na ativação de células T (Weitz-Schmidt et al., 2001), são exemplos de efeitos pleiotrópicos dependente e independente da inibição da enzima HMG-CoA, respectivamente.

As ações anti-angiogênica, antiinflamatória, antiproliferativa e pró-apoptótica estão relacionados tanto aos efeitos hipolipemiantes quanto aos efeitos pleiotrópicos e devem ser os responsáveis pela ação das estatinas em várias doenças crônicas humanas como neurodegeneração, osteoporose, doenças cardiovasculares e câncer (Demierre et al., 2005).

1.3- Estatinas e câncer

A relação entre as estatinas e o câncer foi observada pela primeira vez em usuários de que apresentavam maior número de mortes não relacionadas com doenças cardiovasculares (Oliver, 1991). Esses dados juntamente com resultados que indicavam aumento da incidência de linfoma e de tumores de fígado, estômago, garganta e tireóide em roedores tratados com estatinas (Newman & Hulley, 1996) levaram a investigação de possíveis efeitos cancerígenos das estatinas.

As investigações indicaram que o aumento de mortalidade não relacionado a doenças cardiovasculares ocorreu por acaso. Além disso, as estatinas passaram a ser associadas à redução do número de câncer colo-retal e de melanoma. A partir de então, os efeitos benéficos contra o câncer passaram a ser analisados nesses monitoramentos, os quais demonstraram que estatinas parecem também diminuir a incidência de câncer de próstata e de mama (para revisão ver Demierre et al., 2005).

Contudo, a polêmica continuou. Diversos estudos clínicos e populacionais apresentaram resultados controversos em relação à ação anticancerígena das estatinas. Alguns estudos comprovaram os efeitos benéficos (Blais et al., 2000, Graaf et al., 2004), mas outros mostraram não existir correlação entre o uso de estatina e a prevenção de câncer (Baigent et al., 2005, Dale et al., 2006). Essa discordância de resultados pode ser devido à heterogeneidade de características dos indivíduos analisados bem como a diferenças farmacocinéticas das estatinas utilizadas no tratamento clínico, principalmente em relação ao uso de estatinas com maior ou menor grau de hidrofobicidade. Revisões sobre esse assunto (Demierre et al., 2005, Hindler, 2006), sugerem que análises rigorosas e

controladas como a realizada para câncer de próstata dentro do *Health Professionals Follow-up Study* (Platz et al., 2006) sejam desenvolvidas.

Estudos *in vitro* têm caracterizado os possíveis efeitos moleculares relacionados à diminuição de incidência de diversos tipos de câncer. Estatinas podem ter efeitos antiproliferativos, anti-angiogênicos, de repressão de metástase e pró-apoptóticos. Abaixo estão listados alguns desses estudos e seus resultados.

A inibição do crescimento de células tumorais parece estar relacionada à inibição da síntese de dolicol, geranilpírofosfato (GPP) e farnesilpírofosfato (FPP) (Soma et al., 1992), os quais são subprodutos da via de síntese do mevalonato. Dolicol exerce efeito estimulatório na síntese de DNA e está ligado a várias proteínas relacionadas a tumores (Wejde, 1998) e GPP e FPP são necessários à isoprenilação de Ras e Rho, as quais são GTPases que regulam a transdução de sinal de vários receptores de membrana que leva à expressão de genes relacionados à proliferação, à diferenciação ou à apoptose (Soma et al., 1992). O efeito antiproliferativo das estatinas também se deve à estabilização de inibidores das quinases do ciclo celular p21 e p27 (Rao et al., 1998) e à desfosforilação de cdk2 associado à ciclina E (Sivaprasad et al, 2006), levando à parada do ciclo celular na fase G₁.

A angiogênese tem um papel importante no crescimento de tumores primários e no desenvolvimento de metástases. O efeito anti-angiogênico causado por estatinas é obtido sob altas doses e ocorre através de inibição da formação de capilares (Vincent et al., 2001) e da diminuição da distribuição de fatores de crescimento endoteliais (Holash et al., 1999). Contudo, baixas doses de estatina exercem efeito contrário através do estímulo da proteína quinase B (Kureishi et al, 2000) e da ativação da óxido-nítrico sintase endotelial (Brouet et al, 2001).

Metástases são prevenidas pela redução de expressão de moléculas endoteliais de adesão de leucócitos E-selectinas (Nübel et al., 2004), redução de expressão de metaloproteinase 9 (Wang et al., 2000b) e da inibição de invasão de células tumorais através da inibição de fatores de crescimento epiteliais. Contudo, nem todos os estudos confirmaram que ocorre redução do número de metástases. Além disso, a lovastatina não

foi capaz de inibir carcinoma de colo e a migração e a invasão de células de glioblastoma (Kusama et al, 2001).

Vários estudos evidenciam a ação pró-apoptótica de estatinas, a qual pode estar relacionada a maior concentração celular de proteínas pró-apoptóticas como Bax e Bim (Agarwal et al., 1999), a menor produção de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 (Dimitroulakos et al, 2000), à ativação de caspases 3,7,8 e 9 (Macelli et al., 1998, Wang et al., 2000a, Cafforio et al., 2005) e à reativação da JNK (Meral et al, 2007), uma proteína quinase que pode agir como supressora tumoral (Bogoyevitch et al, 2004).

1.4- Mitocôndria e morte celular

Durante a segunda metade do século XX, a mitocôndria era considerada uma organela cuja função se restringia à transformação de energia através da fosforilação oxidativa. Contudo, cerca de uma década atrás, ficou claro que a mitocôndria tinha uma segunda função crucial: o controle da morte celular (Kroemer et al., 2007).

Segundo Kroemer et al., 2007, a morte celular pode ser classificada em: apoptose, necrose, autofagia e catástrofe mitótica. A apoptose é um mecanismo pré-determinado geneticamente que pode ocorrer através de várias cascatas de sinalização, as quais podem ser divididas em via extrínseca e via intrínseca. A apoptose pela via extrínseca é caracterizada pela ativação de receptores de membrana localizados na superfície celular enquanto a apoptose pela via intrínseca é resultado de cascatas de eventos intracelulares nas quais a permeabilização mitocondrial tem um papel fundamental. A necrose ocorre em um curto período (2-4 h) após exposição a um insulto e tem sido considerada como um tipo de morte acidental (determinada apenas pelo estímulo recebido), mas vários estudos (Kroemer & Martin, 2005; Saelens et al., 2005; Nakagawa et al., 2005) têm mostrado que ela pode ser parcialmente determinada pela célula, envolver ativa contribuição de enzimas celulares e estar sujeita à regulação. A autofagia é um fenômeno lento e localizado, no qual partes do citoplasma são seqüestradas em vacúolos de membrana dupla e digeridas por hidrolases lisossomais, o que pode levar a morte celular ou constituir

uma defesa da célula contra estresses agudos, principalmente os induzidos por privação de nutrientes. A catástrofe mitótica representa um tipo de morte celular que ocorre durante a mitose e é resultado de uma deficiência de pontos de checagem do ciclo celular (principalmente nos pontos de checagem de danos ao DNA e da formação do fuso) e de danos celulares.

Todos os tipos de morte celular podem ter a participação mitocondrial através da permeabilização de membrana mitocondrial interna e/ou externa. A permeabilização da membrana interna é resultado da transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) enquanto a permeabilização da membrana externa pode ocorrer como consequência da permeabilização da membrana interna ou por ação de proteínas pró-apoptóticas da família de proteínas Bcl-2 (Bax, Bid, Bad) (Cory et al, 2003).

A transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) é caracterizada por permeabilização não-seletiva da membrana interna da mitocôndria promovida pelo estresse oxidativo (acúmulo de EROs – espécies reativas de oxigênio) e pelo acúmulo do íon Ca^{2+} , em um processo estimulado por vários compostos e por várias condições (Kowaltowski et al., 2001, Gunter et al, 2004). A Figura 4 apresenta os eventos que culminam em TPM.

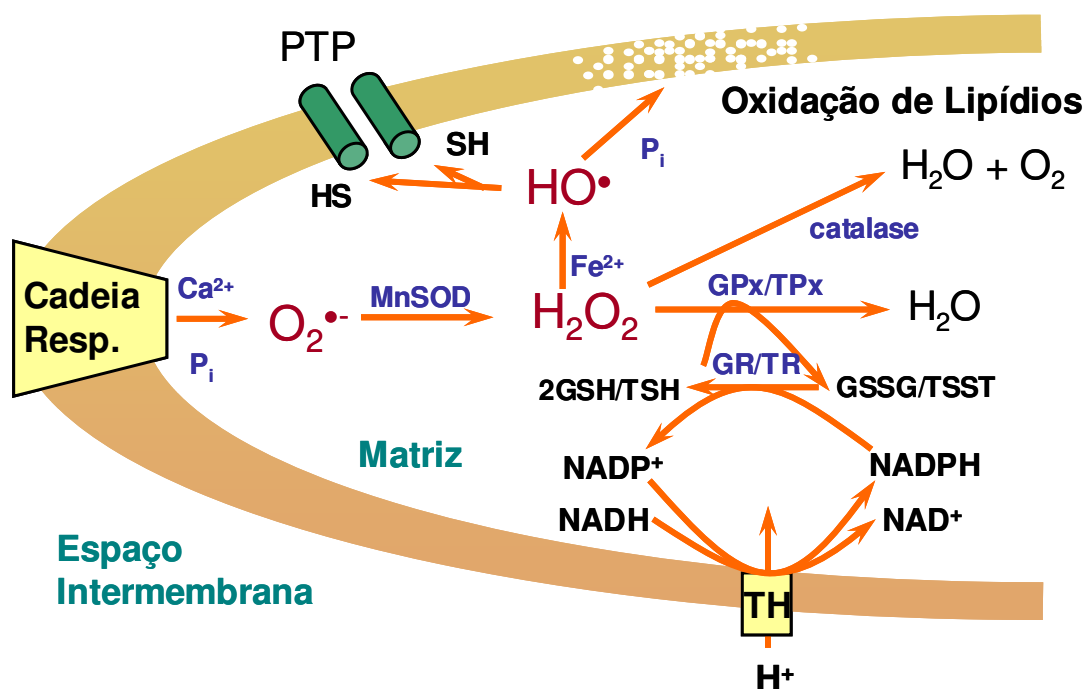


Figura 4- TPM induzida por aumento de Ca^{2+} e acúmulo de EROs. A cadeia respiratória, inserida na membrana mitocondrial interna, gera constantemente pequenas quantidades de radicais superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$). Esses radicais são normalmente removidos pela Mn-superóxido dismutase (MnSOD), a qual promove a geração de H_2O_2 . O H_2O_2 é reduzido à H_2O pelas enzimas glutathiona peroxidase (GPx), tiorredoxina peroxidase (TPx) ou catalase (em mitocôndria de coração). A glutathiona (GSH), oxidada pela GPx e a tiorredoxina (TSH), oxidada pela TPx, são recuperadas pela glutathiona e pela tiorredoxina redutases (GR e TR), as quais utilizam NADPH como doador de elétrons. NADH, que está presente em quantidades reguladas pela respiração, reduz NADP^+ usando NADP transidrogenase (TH). Quando a geração de $\text{O}_2^{\bullet-}$ aumenta na presença de Ca^{2+} e P_i , e/ou quando os mecanismos de remoção de H_2O_2 estão desativados, H_2O_2 acumula-se e na presença de Fe^{2+} , gera o radical hidroxila ($\text{OH}^{\bullet}$) altamente reativo. $\text{OH}^{\bullet}$ oxida grupos tiólicos (-SH) do complexo do poro de transição de permeabilidade (PTP), levando à abertura do poro. $\text{OH}^{\bullet}$ também pode promover permeabilização da membrana interna através da peroxidação lipídica, um processo fortemente estimulado por P_i . Adaptado de Kowaltowski et al., 2001.

Apesar do grande número de investigações científicas, a natureza das alterações de membrana que levam a TPM ainda permanece em debate, mas a TPM claramente envolve proteínas de membrana (He & Lemasters, 2002). Possíveis componentes do PTP são: o translocador de nucleotídeos de adenina, o canal iônico dependente de voltagem, a ciclofilina D, a hexoquinase, a creatina quinase e o receptor benzodiazepínico (Halestrap et al., 2002). A ciclosporina A (CsA) e o boncrecato (BA) são inibidores da abertura do PTP, e conseqüentemente da TPM (Halestrap et al., 1997 e Halestrap et al., 2003) por se ligarem ao translocador de nucleotídeos de adenina e à ciclofilina D, respectivamente. Muitas condições que levam a danos mitocondriais com enfraquecimento da função mitocondrial, como a TPM, causam morte celular por necrose (Crompton, 1999, Kroemer et al, 1998).

A apoptose mediada pela mitocôndria pode ocorrer através da via intrínseca ou da comunicação entre as vias extrínseca e intrínseca promovida pela proteína Bid (Fig. 5). A apoptose é iniciada quando proteínas do espaço intermembrana mitocondrial, como o citocromo c, os fatores indutores de apoptose e as pró-caspases, são liberadas dessa organela e vão para o citossol (Liu et al., 1996, Susin et al, 1999, Zhivotovsky et al., 1999). Essa liberação geralmente envolve somente a membrana mitocondrial externa pela permeabilização causada por proteínas da família Bcl-2, uma situação em que há a vantagem de manter a membrana interna íntegra e portanto, a fosforilação oxidativa se mantém em funcionamento (Crompton, 1999).

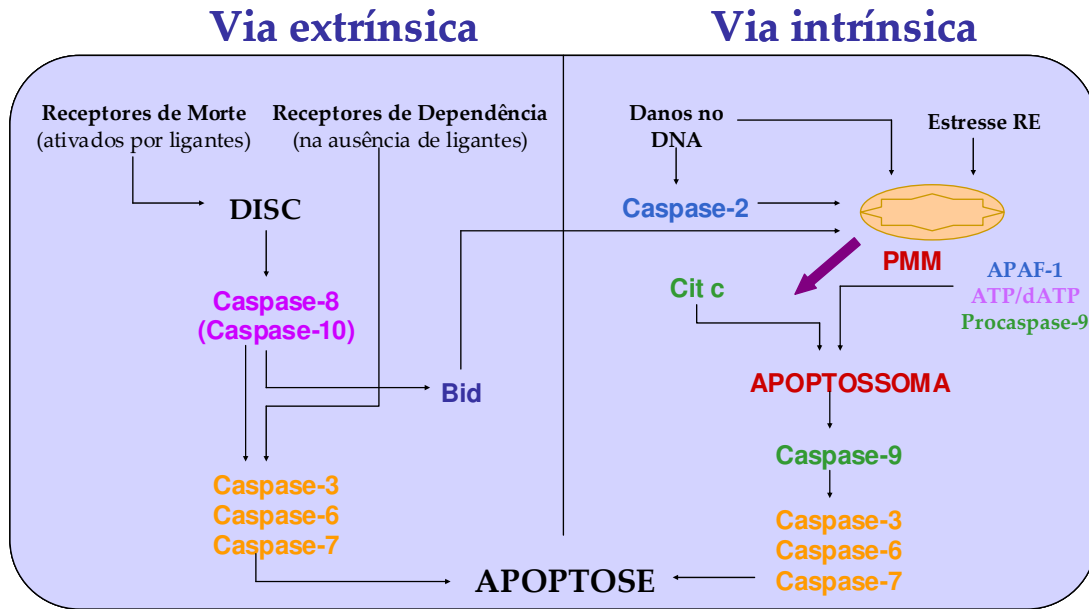


Figura 5- Cascatas de sinalização das vias apoptóticas extrínseca e intrínseca. Via extrínseca: a ativação de receptores de morte celular induzida por ligantes ou a ativação de receptores de dependência leva à formação do complexo de sinalização de morte celular (DISC), que leva à ativação da caspase-8 (e possivelmente da caspase-10), as quais clivam as caspases efetoras 3,6 e 7. A caspase-8 também pode ativar proteoliticamente a proteína Bid, que é capaz de promover a permeabilização da membrana mitocondrial (PMM) e representa a principal ligação entre as vias intrínseca e extrínseca. Via intrínseca: vários sinais intracelulares, incluindo dano de DNA e estresse do retículo endoplasmático, levam à PMM pela ação de diversas proteínas, principalmente as da família da Bcl-2. A PMM leva à perda de fatores pró-apoptóticos do espaço intermembranas. Dentre eles, o citocromo c (Cit c) que induz a reunião do fator apoptótico 1 de ativação de proteases (APAF-1) e ATP/dATP na formação do apoptossoma, o qual promove a maturação da caspase-9 que cliva e ativa as caspases efetoras levando à apoptose. Danos de DNA podem levar à ativação de caspase-2, que vai levar a PMM.

Contudo, a mitocôndria também pode liberar fatores apoptogênicos depois que sua membrana interna for danificada ou permeabilizada por TPM, levando ao inchamento da matriz e à ruptura da membrana externa (Green & Reed, 1998). Essa forma de apoptose ocorre quando as células são danificadas de alguma forma que seja capaz de induzir a TPM, e, por isso, é freqüentemente vista em associação com a morte celular por necrose. Sob essas condições, o fator determinante que leva à apoptose ou à necrose será a capacidade de manter os níveis fisiológicos de ATP intracelular (Leist et al., 1997). Portanto, além de causar necrose, a TPM pode levar à apoptose, uma vez que essas organelas contêm proteínas envolvidas nesse processo como o citocromo c, fatores indutores de apoptose e pró-caspases (Liu et al., 1996, Susin et al., 1999, Zhivotovsky et al., 1999).

1.5- Homeostase de cálcio e morte celular

O Ca^{2+} é considerado o elemento chave nos fenômenos de morte celular por necrose e apoptose, por ser necessário para a indução de TPM (Kowaltowski et al, 2001), por modular fatores de transcrição, quinases e fosfatases e por ativar enzimas envolvidas na degradação protéica e no metabolismo de fosfolipídios (Penzo et al. 2004).

A concentração de Ca^{2+} livre no citossol $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ (da ordem de 10^{-7} M) é mantida cerca de 10.000 vezes abaixo da concentração extracelular (da ordem de 10^{-3} M) (Nicotera & Orrenius, 1998; Marin et al. 1999). Este alto gradiente eletroquímico de Ca^{2+} entre os compartimentos intra e extracelulares possibilita a transdução de sinais bioquímicos ao interior das células (Carmeliet, 2004). A distribuição do Ca^{2+} intracelular é controlada por processos de transporte desse íon através da membrana plasmática e das membranas de organelas subcelulares, como o retículo endo(sarco)plasmático, núcleo e a mitocôndria (Gunter & Gunter 1994). A seguir serão exemplificados dois processos dependentes de cálcio que podem levar à morte celular e que são de grande importância para a compreensão desse estudo.

O aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$, seguido pelo acúmulo de Ca^{2+} mitocondrial, induz estresse oxidativo e TPM (Kowaltowski et al, 2001). O Ca^{2+} pode interagir com lipídios da membrana mitocondrial interna e causar alterações em sua organização

(Vercesi et al., 1997, Grijalba et al., 1999). Grijalba et al mostraram que a ligação de Ca^{2+} à face interna da membrana interna mitocondrial leva à formação de agrupamentos de cardiolipina. Essas mudanças na organização de lipídios leva ao aumento da produção de EROs pela cadeia de transporte de elétrons promovendo a oxidação de grupos tiólicos da membrana interna e levando à TPM. Além disso, íons Ca^{2+} podem modular diretamente o estado aberto ou fechado do PTP, como foi indicado por experimentos que evidenciaram que o Ca^{2+} continuava necessário para esse processo mesmo depois que a oxidação de grupos tiólicos já havia ocorrido (Bernardi et al, 1992, Kowaltowski et al, 1997).

O aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ causa a ativação de diversas proteínas, dentre elas está a fosfatase 2B, conhecida como calcineurina (Shibasaki & McKeon, 1995). A calcineurina é membro da família das fosfatases serina/treonina e é a única fosfatase conhecida que é ativada por Ca^{2+} e calmodulina (Shibasaki et al, 2002). Essa proteína é encontrada em vários tecidos de mamíferos, mas sua concentração é cerca de 10-20 vezes maior no cérebro, e possui múltiplas funções, embora muitas delas ainda sejam parcialmente conhecidas (Shibasaki et al, 2002).

A atuação dessa fosfatase em mecanismos de morte celular ainda não foi totalmente elucidada, mas estudos mostram que ela pode ter efeitos anti ou pró-apoptóticos dependendo do estímulo recebido, do tipo celular e do estado de fosforilação da proteína quinase dependente de mitógeno p38 (MAPK p38) (Iwai-Kanai & Hasegawa, 2004). Além disso, em neurônios foi demonstrado que a calcineurina pode participar da via intrínseca de apoptose (Wang et al., 1999) bem como levar à morte celular por necrose através de um processo ainda pouco conhecido e que pode ter a participação da TPM (Ankarcrona et al., 1996). A participação da calcineurina no mecanismo de indução de apoptose em neurônios se deve a sua interação com proteínas da família Bcl-2. A calcineurina desfosforila Bad, que se transloca do citossol para a mitocôndria e forma heterodímeros com Bcl- X_L , o que permite a formação de heterodímeros BAX/BAK e de poros na membrana externa da mitocôndria, levando à TPM (Wang et al., 1999).

A calcineurina pode ser inibida por CsA e por FK506. Essas drogas se ligam a ciclofilinas e a proteínas ligantes de FK506 (FKBP12), respectivamente, e formam complexos que inativam a calcineurina (Liu et al., 1991). Dentre esses inibidores, o mais específico é o FK506, pois a CsA também inibe TPM através da ligação à ciclofilina D, impedindo sua participação no complexo protéico que gera o PTP.

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo geral

Resultados do nosso grupo demonstraram que mitocôndrias isoladas de hepatócitos de camundongos hipercolesterolêmico *knockout* para o receptor LDL, tratados com lovastatina, apresentaram uma alta susceptibilidade a TPM e oxidação de grupos tiólicos de proteínas de membrana na presença de Ca^{2+} (Velho et al., 2006). Esses dados são indícios de que alterações na homeostase de Ca^{2+} podem levar à disfunção mitocondrial e estarem relacionadas à morte celular induzida por estatinas.

Assim, o objetivo desse trabalho foi analisar o efeito de estatinas sobre células de tumor de próstata, com enfoque na inter-relação da homeostase de Ca^{2+} e da função mitocondrial na morte celular.

2.2- Objetivos específicos

- 2.2.1- Avaliar a ação de estatinas sobre a viabilidade e proliferação das células de câncer de próstata.
- 2.2.2- Identificar o(s) tipo(s) de morte celular induzido(s) por estatinas;
- 2.2.3- Verificar se ocorre alteração da homeostase de Ca^{2+} durante o(s) processo(s) de morte celular através de comparação de concentrações de Ca^{2+} livre no citossol antes e após o tratamento com estatinas.
- 2.2.4- Analisar se ocorre alteração da função mitocondrial durante o(s) processo(s) de morte celular através do monitoramento do potencial elétrico transmembrana mitocondrial e do consumo de O_2 em células PC-3 antes e após os tratamentos com estatinas.
- 2.2.5- Verificar se há participação de TPM e da fosfatase calcineurina no(s) processo(s) de morte celular.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Reagentes

As estatinas (lovastatina e sinvastatina) foram adquiridas da empresa Galena Química e Farmacêutica Ltda (Campinas, SP, Brasil). Todos os demais reagentes utilizados nesse trabalho foram obtidos das empresas Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA), Cutilab (Campinas, SP, Brasil) e Molecular Probes (Eugene, OR, USA).

3.2- Cultivo de células

As células LNCaP e PC-3 foram obtidas da ATCC (*American Type Culture Collection*). Elas foram cultivadas em meio RPMI 1640, suplementado com soro fetal bovino (SFB) 10% e HEPES 10 mM (pH 7,4) em estufa a 37 °C e atmosfera de ar com CO₂ 5% e mantidas em confluência menor que 80%. Durante os experimentos com estatinas, o meio RPMI foi suplementado com SFB 1%.

3.3- Análise da viabilidade e da proliferação de células em cultura

A viabilidade celular foi avaliada previamente ao preparo dos experimentos e somente garrafas com células que apresentaram viabilidade acima de 90% foram utilizadas. A viabilidade e a proliferação celular também foram avaliadas em curvas dose-resposta de estatinas nas células tumorais e durante os demais experimentos realizados. Para isso, as células foram tratadas com solução de tripsina 0,25% e EDTA 0,03% para desprendimento das garrafas e amostras de células foram tratadas com azul de trypan 0,1%, contadas em câmara de Neubauer e visualizadas por microscopia de luz. Foram consideradas inviáveis as células que estavam marcadas com azul de trypan ou que apresentavam morfologia apoptótica (corpos apoptóticos e *shrinkage*).

3.4- Avaliação de mecanismos relacionados à morte celular

Para avaliar os mecanismos relacionados com morte celular, as células tratadas com estatinas também foram tratadas com os seguintes compostos:

- ciclosporina A (CsA), inibidor da TPM e da proteína calcineurina;
- FK506, inibidor da proteína calcineurina;
- boncrecato (BA), inibidor da TPM;
- pifitrina (PFT), inibidor da proteína p53
- mevalonato, produto da reação catalisada pela HMG-CoA redutase.

3.5- Citometria de fluxo

Para os experimentos utilizando a citometria de fluxo, as amostras foram analisadas no citômetro FACSCalibur System equipado com laser de argônio e *software* CellQuest (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). As populações de células foram identificadas através de suas características de reflexão de luz e analisadas pela intensidade do sinal fluorescente da sonda utilizada. Dez mil eventos foram adquiridos para cada amostra.

3.5.1- Avaliação de taxas de morte celular

As porcentagens de morte celular apoptótica e necrótica foram determinadas por citometria de fluxo, utilizando-se os marcadores anexina V-FITC (AV) e iodeto de propídio (IP). As células (10^6 células) foram lavadas com PBS e ressuspensas em tampão de ligação (HEPES 10 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, KCl 5 mM, $MgCl_2$ 1 mM e $CaCl_2$ 1,8 mM) contendo AV 1:500. Depois de 20 minutos de incubação em temperatura ambiente acrescentou-se IP 1:50 e as leituras foram realizadas a seguir. A apoptose e a necrose foram quantificadas como porcentagem de células AV^+/IP^- e IP^+ , respectivamente.

3.5.2- Medida da concentração de Ca^{2+} livre no citossol

Alterações da concentração de Ca^{2+} citossólico foram avaliadas por citometria de fluxo com marcação pela sonda fluorescente Fluo-3AM. As células PC-3 (10^6 células), após a realização dos tratamentos, foram desprendidas dos recipientes utilizando-se solução de tripsina sem adição de EDTA e incubadas em meio RPMI 1640 sem adição de cálcio contendo Fluo3-AM 3 μM , ácido plurônico 1 μM e BSA 30 $\mu\text{g/mL}$ em estufa (5% CO_2) por 45 minutos a 37 °C. A sonda fluorescente não hidrolizada foi removida pela lavagem das células com meio RPMI 1640 antes da aquisição de fluorescência. Foram realizadas calibrações com ionomicina 10 μM e EGTA 10 mM ao final de cada experimento. A concentração de Ca^{2+} citossólico foi calculada considerando K_d igual a 390 nM para o complexo Ca^{2+} -Fluo-3 (Mather & Rottenberg, 2002).

3.6- Determinação do potencial de membrana mitocondrial

O potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) foi estimado em células permeabilizadas por digitonina através de alterações de fluorescência de safranina O, utilizando-se um espectrofluorímetro (Hitachi, modelo F4500, Tokyo, Japão) operando nos comprimentos de onda de excitação e de emissão de 495 e 586 nm, respectivamente. O indicador safranina O se adsorve em membranas de mitocôndrias energizadas, o que causa alteração do seu espectro de fluorescência proporcionais à amplitude do potencial até valores de aproximadamente 170 mV (Akerman & Wiström, 1976).

Após a realização dos tratamentos, as células PC-3 (10^6 células) foram desprendidas dos recipientes, ressuspensas em meio de reação (sacarose 125 mM, KCl 65 mM, Tris-HCl 10mM (pH 7,2), Na_2HPO_4 2,5 mM, EGTA 0,33 mM) contendo a sonda safranina O 5 μM e o substrato respiratório succinato 5 μM , e permeabilizadas com digitonina 20 μM . Durante os experimentos a temperatura foi mantida a 37 °C e as amostras foram mantidas sob constante agitação. O protonóforo FCCP 1 μM foi utilizado para dissipar o $\Delta\Psi_m$ e permitir a comparação das diferenças de amplitude do $\Delta\Psi_m$ entre as células controle e as células tratadas.

3.7- Determinação do consumo de oxigênio

O consumo de oxigênio pelas células foi medido utilizando-se um eletrodo tipo Clark (Hansatech Instruments Limited, Norfolk, UK). As células PC-3 (10^6 células) foram adicionadas ao meio de reação (descrito no item anterior) 0,5 mL em uma câmara de acrílico fechada equipada com agitador magnético. A temperatura foi mantida a 37 °C. Nessa condição experimental, a concentração inicial de oxigênio é de 107,5 nmol (Robinson & Cooper, 1970) As velocidades do consumo de O₂ foram avaliadas após a adição das células, de digitonina 20 µM, de ADP 40 µM, de CAT 4 µM e de FCCP 1 µM.

A fosforilação oxidativa foi analisada pelo cálculo do controle respiratório (CR), razão entre as velocidades de consumo de oxigênio nos estados de respiração III e IV, ou seja, respiração de fosforilação e de repouso, respectivamente.

3.8- Análise Estatística

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM de pelo menos 3 experimentos independentes em duplicata. O “n” se refere ao número de experimentos realizados com preparações biológicas independentes. Comparações entre os grupos foram realizadas utilizando *one-way Analysis of Variance* (ANOVA) com análise pelo pós-teste Tukey. Considerou-se significativo $p < 0,05$.

4- RESULTADOS

4.1- Testes Dose-Resposta

Inicialmente foram realizados testes dose-resposta para avaliar o efeito de duas estatinas (lovastatina e sinvastatina) em duas linhagens celulares de câncer de próstata (PC-3 e LNCaP). DMSO foi utilizado para solubilização dessas estatinas e sua concentração final em meio de cultura foi de 0,1%. Testes foram realizados com células em meio de cultura sem DMSO e com DMSO 0,1 %. Não houve alteração de proliferação ou de viabilidade das células nesses dois tratamentos.

4.1.1- Diminuição da proliferação e da viabilidade de células LNCaP expostas a estatinas

Os efeitos dose-resposta das estatinas lovastatina e sinvastatina 0,1-100 μ M foram avaliados em células LNCaP por até 72 h através do método de exclusão por azul de tripan.

Ambas as estatinas causaram efeitos semelhantes nas condições testadas. As estatinas em concentrações 0,1 e 1 μ M não causaram diminuição significativa de proliferação (Figs. 6A e 7A) ou de viabilidade celular (Figs. 6B e 7B) em relação aos respectivos controles DMSO. As estatinas em concentrações acima de 10 μ M causaram inibição da proliferação e diminuição da viabilidade celular desde o início do tratamento. Após 72 h, lovastatina e sinvastatina 10 μ M causaram diminuição de 15 e 18% de viabilidade das células, respectivamente, enquanto lovastatina e sinvastatina 100 μ M causaram 56 e 61% de diminuição de viabilidade das células, respectivamente.

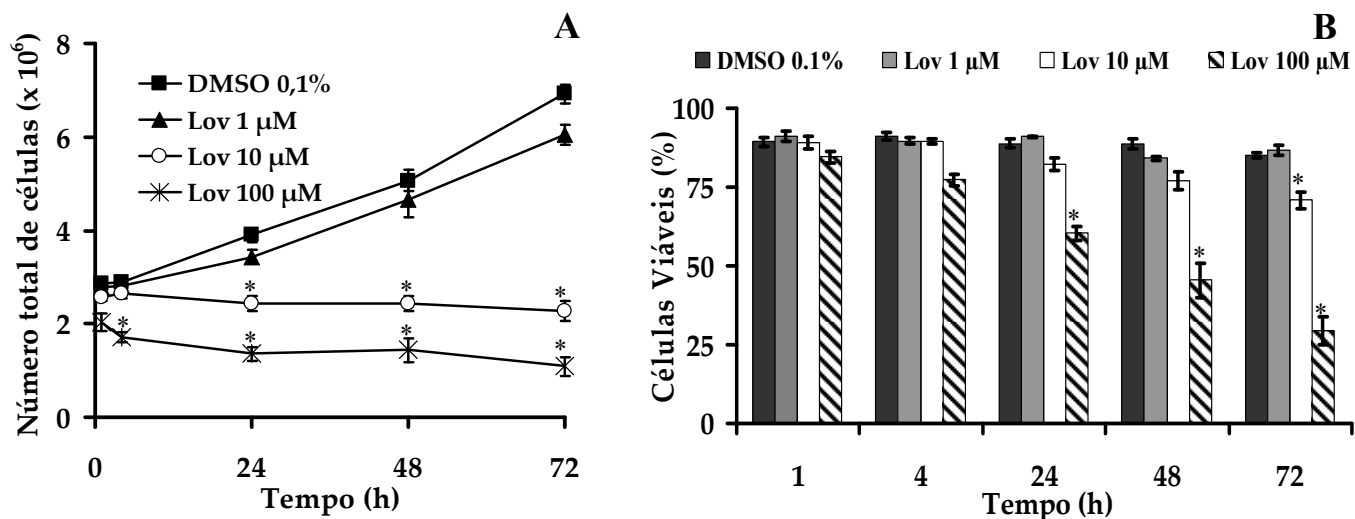


Figura 6- Inibição da proliferação e morte de células LNCaP por lovastatina. (A)

Curvas dose-resposta e (B) viabilidade de células LNCaP tratadas com lovastatina. Os valores representam a média $\pm$ EPM (n = 4). * significativo em relação ao controle DMSO com $p < 0,05$.

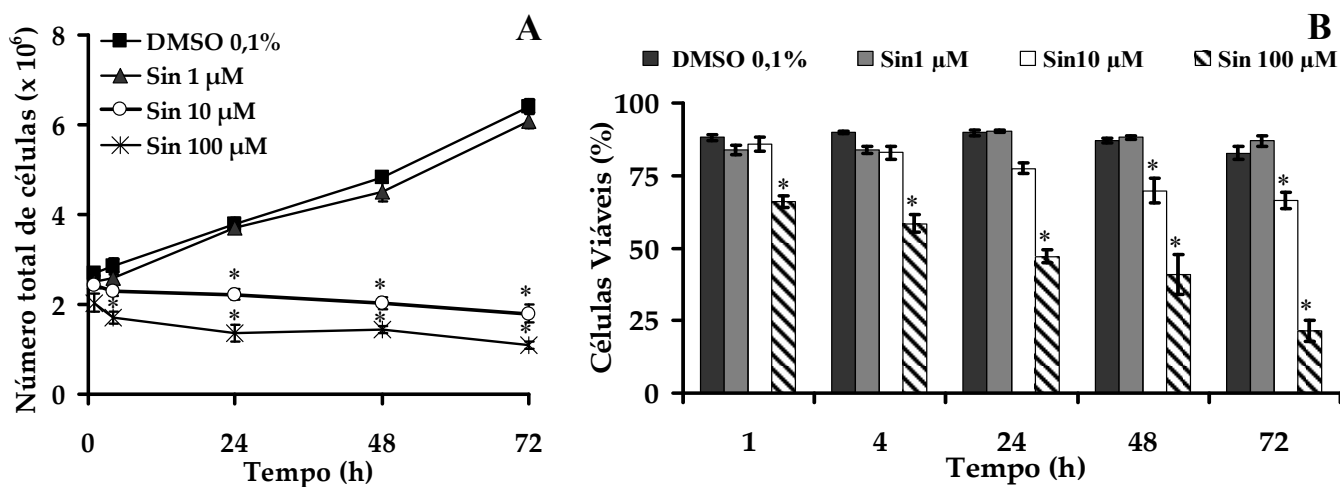


Figura 7- Inibição da proliferação e morte de células LNCaP por sinvastatina. (A)

Curvas dose-resposta e (B) viabilidade de células LNCaP tratadas com sinvastatina. Os valores representam a média $\pm$ EPM (n = 4). * significativo em relação ao controle DMSO com $p < 0,05$.

4.1.2- Diminuição da proliferação e da viabilidade de células PC-3 expostas a estatinas

Os efeitos dose-resposta das estatinas lovastatina e sinvastatina foram avaliados em células PC-3 nas mesmas condições testadas em células LNCaP.

Ambas estatinas na concentração 0,1 μM causaram inibição parcial da proliferação (Figs. 8A e 9A), mas não afetaram a viabilidade celular (Figs. 8B e 9B). As estatinas em concentrações maiores que 1 μM causaram inibição da proliferação e diminuição da viabilidade celular dependentes de dose e de tempo. Após 72 h de tratamento com sinvastatina e lovastatina 10 μM , 93 e 61% das células PC-3 morreram, respectivamente. Houve morte total das células PC-3 após 1 e 48 h em tratamentos com sinvastatina e lovastatina 100 μM .

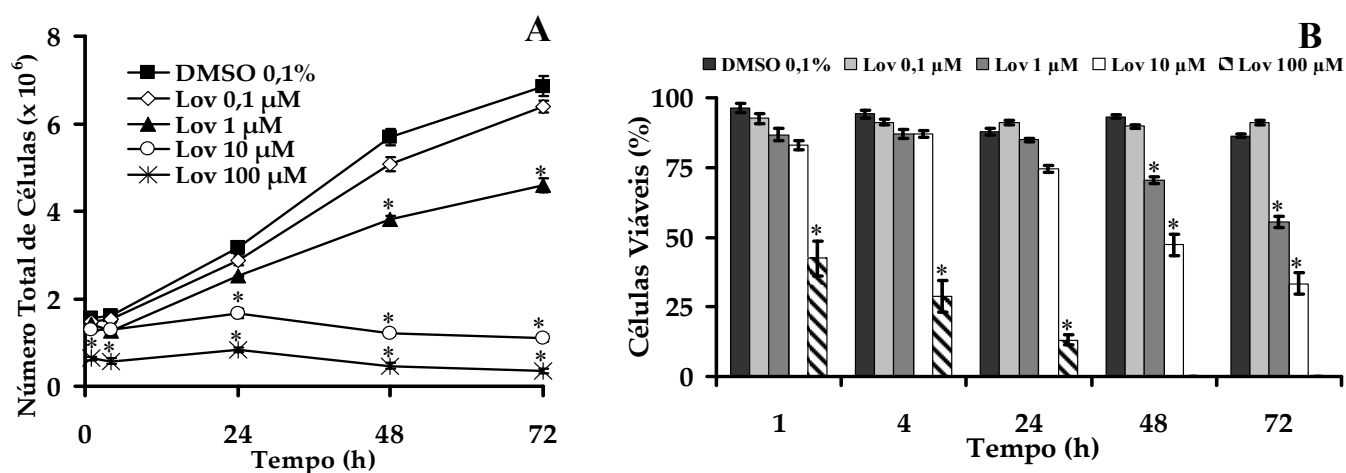


Figura 8- Inibição da proliferação e morte de células PC-3 por lovastatina. (A) Curvas dose-resposta e (B) viabilidade de células PC-3 tratadas com lovastatina. Os valores representam a média $\pm$ EPM ($n = 4$, em duplicata). * significativo em relação ao controle DMSO com $p < 0,05$.

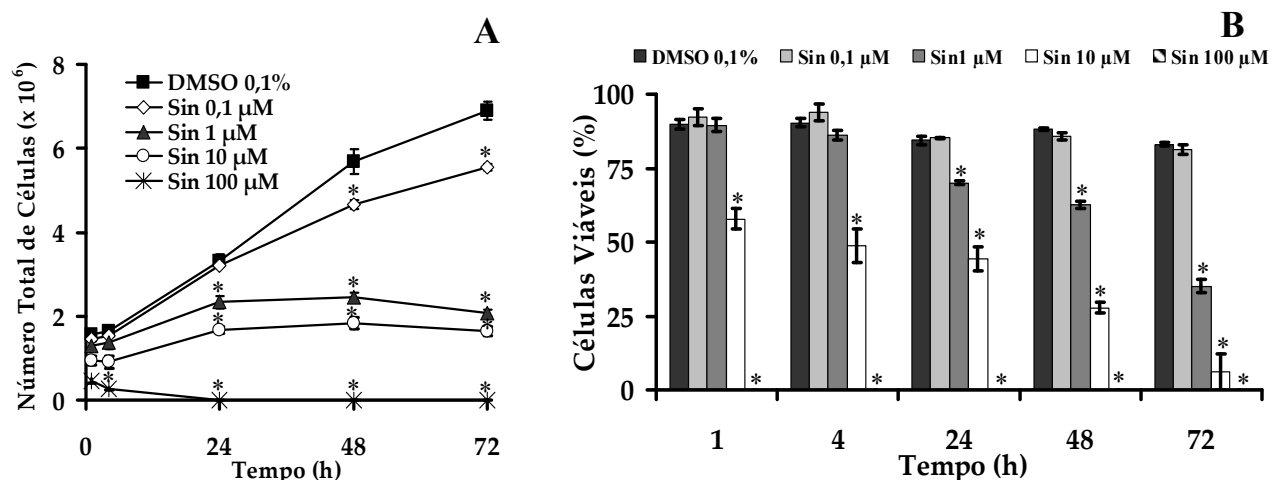


Figura 9- Inibição da proliferação e morte de células PC-3 por sinvastatina. (A) Curvas dose-resposta e (B) viabilidade de células PC-3 tratadas com sinvastatina. Os valores representam a média $\pm$ EPM (n = 4, em duplicata). * significativo em relação ao controle DMSO com $p < 0,05$.

Esses resultados mostraram que a linhagem celular mais sensível às estatinas testadas foi a linhagem PC-3 e que a estatina mais eficaz na indução de morte celular nas linhagens testadas foi a sinvastatina. Por isso essas células e essa estatina foram escolhidas para os experimentos posteriores.

4.2- Morte de células PC-3 induzida por sinvastatina

Para caracterizar o(s) tipo(s) de morte celular induzido(s) por sinvastatina, as células após os tratamentos com essa droga foram marcadas simultaneamente com AV e IP para análise de apoptose e necrose, respectivamente.

Foram realizados testes com sinvastatina 1-100 μ M nos períodos que as porcentagens de morte foram maiores que 40% nos testes dose-resposta pela metodologia de exclusão por azul de tripan. Verificou-se que sinvastatina 1-30 μ M induziu principalmente apoptose após 72 h de tratamento, enquanto a sinvastatina 60-100 μ M

induziu principalmente necrose após 2 h de tratamento. O aumento da porcentagem de necrose e a diminuição de porcentagem de apoptose foram dependentes de tempo e concentração (dados não mostrados). A partir desses resultados, foram escolhidas duas concentrações e dois tempos de tratamento para a análise dos mecanismos envolvidos em morte por apoptose e por necrose, sinvastatina 10 μ M por 72 h (Fig. 10) e sinvastatina 60 μ M por 2 h (Fig. 11), respectivamente.

Para avaliar a importância da inibição da HMG-CoA redutase causada por estatinas e da participação mitocondrial nos processos de morte celular, foram realizados tratamentos simultâneos de estatina e mevalonato (produto da reação catalisada pela HMG-CoA redutase) ou de estatina e CsA (inibidor de TPM) (Figs. 10 e 11).

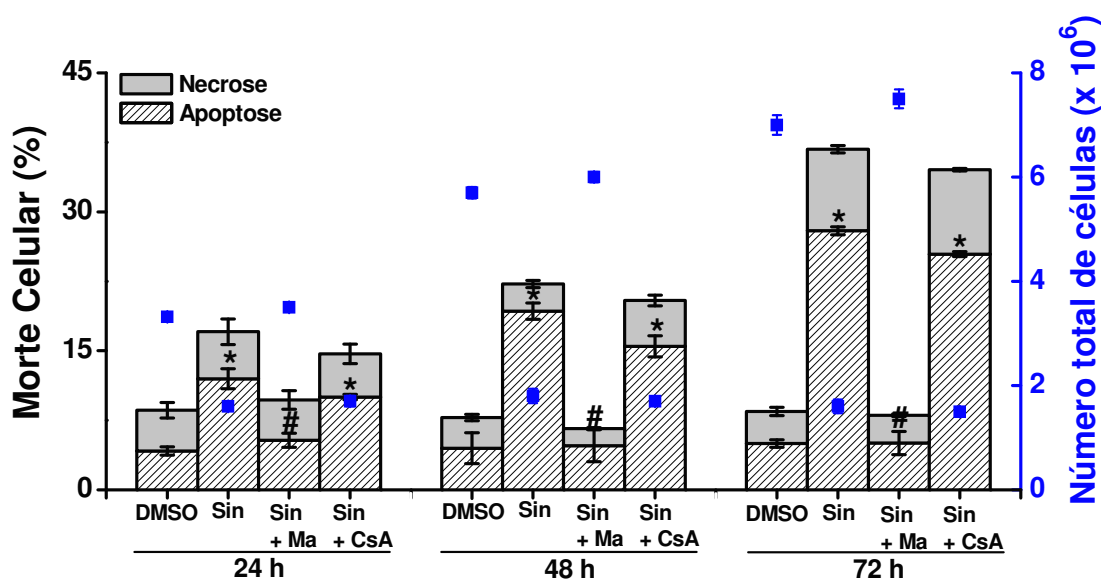


Figura 10- A apoptose de células PC-3 induzida por sinvastatina 10 μ M é inibida por **mevalonato**. Células PC-3 foram tratadas com sinvastatina (Sin, 10 μ M) na presença (ou na ausência) de mevalonato (Ma, 100 μ M) ou ciclosporina A (CsA, 0,5 μ M), como indicado na figura. O número total de células após o tratamento está representado pelo terceiro eixo em azul. Os valores representam a média $\pm$ EPM ($n = 4$, em duplicata). * significativo em relação ao controle DMSO e # significativo em relação ao tratamento com Sin, com $p < 0,05$.

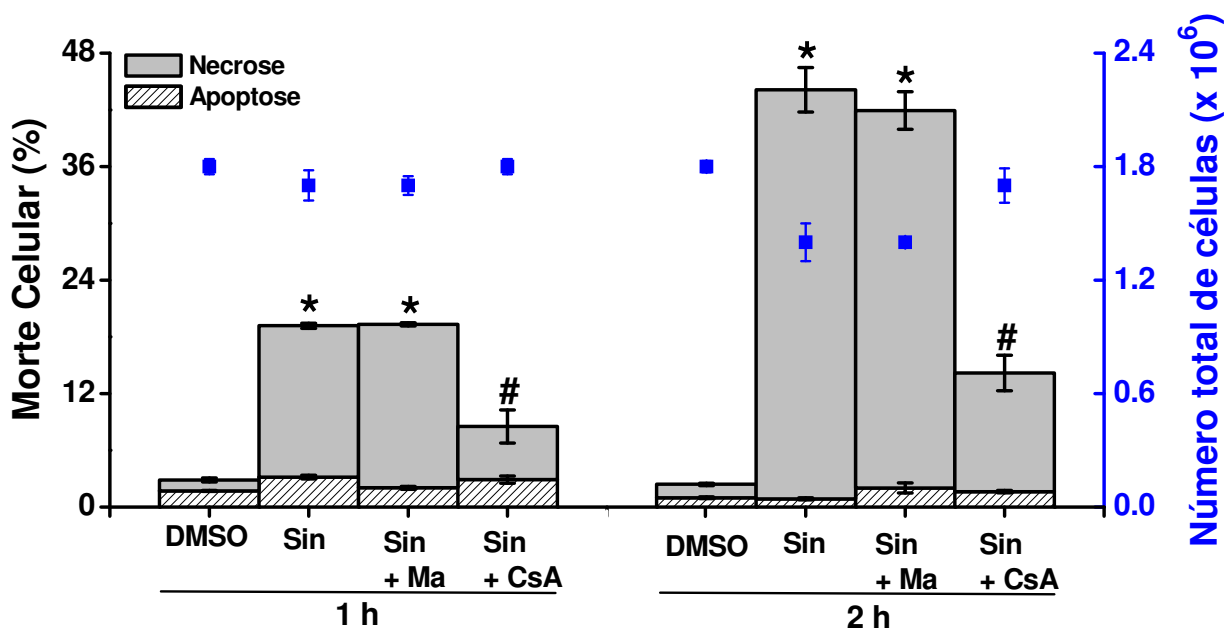


Figura 11- A necrose de células PC-3 induzida por sinvastatina 60 μM é inibida por ciclosporina. Células PC-3 foram tratadas com sinvastatina (Sin, 60 μM) na presença (ou na ausência) de mevalonato (Ma, 100 μM) ou ciclosporina A (CsA, 0,5 μM), como indicado na figura. O número total de células após o tratamento está representado pelo terceiro eixo. Os valores representam a média ± EPM (n = 4, em duplicata). * significativo em relação ao controle DMSO e # significativo em relação ao tratamento com Sin, com p < 0,05.

Os resultados mostraram que a apoptose induzida por sinvastatina 10 μM em tratamentos de até 72 h é dependente da inibição da HMG-CoA redutase, pois 100% de apoptose foi prevenida quando mevalonato estava presente no meio de cultura. Nas mesmas condições de tratamento, a CsA não foi capaz de induzir uma diminuição significativa da porcentagem de apoptose, mostrando que parece não haver participação da TPM nesse tipo de morte celular. O número total de células após cada tratamento mostra que o mevalonato também preveniu a diminuição de proliferação causada por sinvastatina.

Já a necrose induzida por sinvastatina 60 μ M não foi prevenida pela presença de mevalonato, mas foi prevenida significativamente (73%) pela adição de CsA após 2 h de tratamento. Esses resultados mostram que a necrose não é dependente da via de mevalonato, mas tem a participação do TPM e/ou da fosfatase calcineurina, visto que a CsA também pode inibir as ciclofilinas que interagem com essa proteína. O número total de células diminuiu cerca de 15 % após o tratamento de 2 h com sinvastatina e sinvastatina + mevalonato, mostrando que deve haver rompimento de parte das células em necrose.

4.3- O aumento da $[Ca^{2+}]_{cit}$ no processo de apoptose de células PC-3 é sensível a mevalonato

A apoptose de células PC-3 causada por sinvastatina 10 μ M não é dependente de calcineurina ou da indução de TPM como mostram os dados da Figura 10. Contudo, a alteração da homeostase de Ca^{2+} ocorre em diversos processos de sinalização celular que podem levar à apoptose e por isso, avaliamos a concentração desse íon no citossol de células PC-3 tratadas com sinvastatina através de marcação com Fluo3-AM, sonda fluorescente que entra na célula e se liga ao Ca^{2+} citossólico. (Fig. 12).

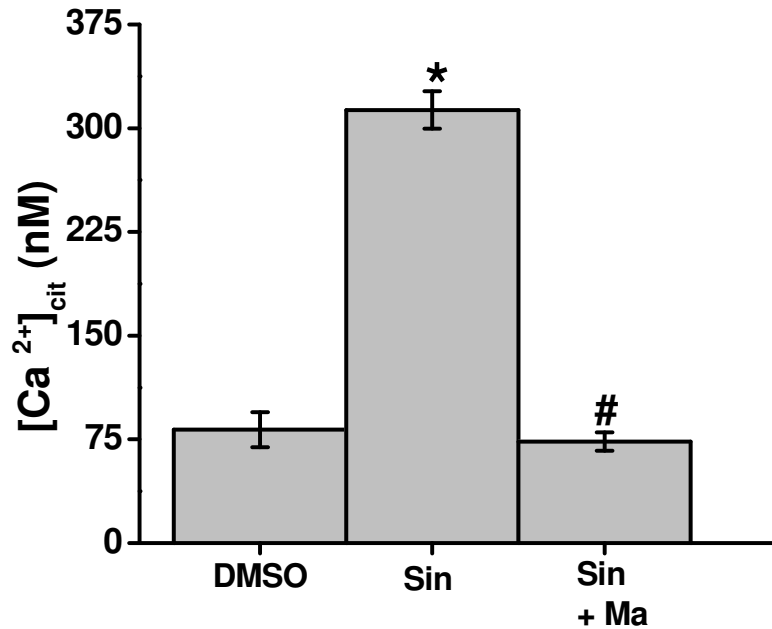


Figura 12- O aumento da concentração de Ca^{2+} citossólico no processo de apoptose de células PC-3 é inibido por mevalonato. As células PC-3 foram tratadas com sinvastatina (Sin, 10 μM) por 48 h na presença (ou na ausência) de mevalonato (Ma, 100 μM), como indicado na figura. Os valores representam a média $\pm$ EPM (n = 4, em duplicata). * significativo em relação ao controle DMSO e # significativo em relação ao tratamento com Sin, com $p < 0,05$.

Após 48 h de tratamento as células PC-3 apresentaram um aumento de 3 vezes da $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$, o qual foi totalmente prevenido por mevalonato, que também previne totalmente o processo de apoptose causado por estatina. Esse resultado mostra que o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ é importante para a apoptose induzida por sinvastatina.

4.4- A apoptose de células de câncer de próstata não é dependente da proteína p53

A proteína supressora tumoral p53 está envolvida em processos de duplicação celular e apoptose com participação mitocondrial (Jiang et al., 2006). Como as estatinas causam a parada do ciclo celular e induzem apoptose, as linhagens PC-3 (p53 negativa) e LNCaP (p53 positiva) foram tratadas com o inibidor de p53, pifitrina, e os resultados foram comparados (Fig. 13).

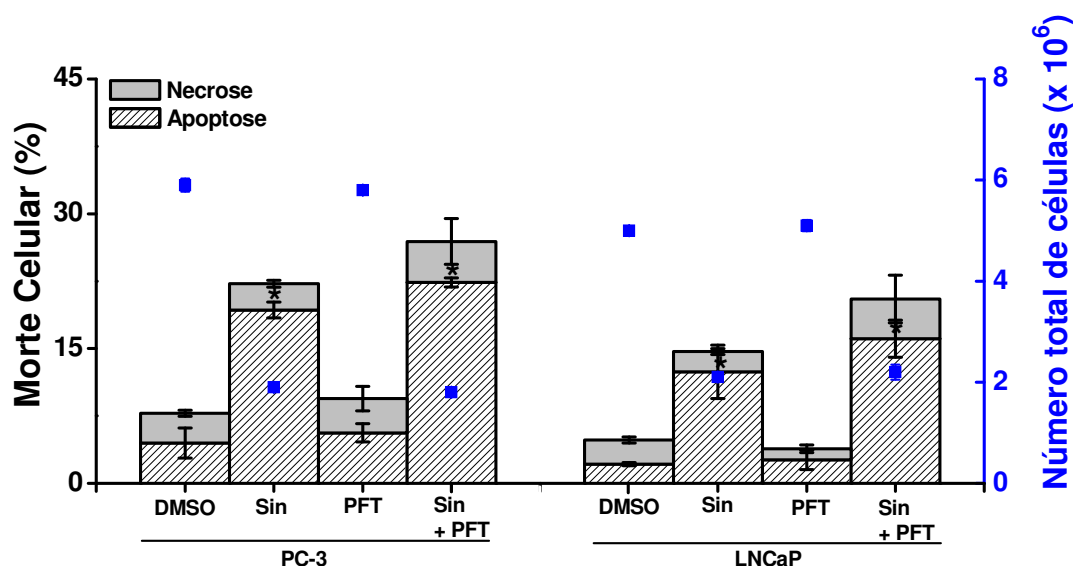


Figura 13- A proteína p53 não é importante para a apoptose causada por sinvastatina em células de câncer de próstata. As células PC-3 e LNCaP foram tratadas por 48 h com sinvastatina (Sin, 10 μ M) na presença (ou na ausência) de pifitrina- α (PFT, 20 μ M), como indicado na figura. O número total de células após o tratamento está representado pelo terceiro eixo em azul. Os valores representam a média $\pm$ EPM (n = 4, em duplicata). * significativo em relação ao controle DMSO com p < 0,05.

A PFT não alterou a viabilidade ou a proliferação das células tratadas com esse composto, bem como não previniu os efeitos antiproliferativo e citotóxico causados pela sinvastatina. Dessa forma, a apoptose causada por sinvastatina nas células de câncer de próstata avaliadas não são dependentes da participação da proteína p53.

4.5- A necrose de células PC-3 é dependente de calcineurina e de TPM

Para entender se a prevenção da necrose causada pela CsA era resultado da inibição da TPM ou da calcineurina, foram utilizados inibidores específicos para TPM e calcineurina, BA e FK506, respectivamente. Também foi avaliado se Ca^{2+} era importante para a indução de necrose através da adição de BAPTA, quelante intracelular desse íon. As células foram tratadas com sinvastatina na presença e na ausência desses compostos, como indicado na Figura 12, e foram marcadas posteriormente com AV e PI.

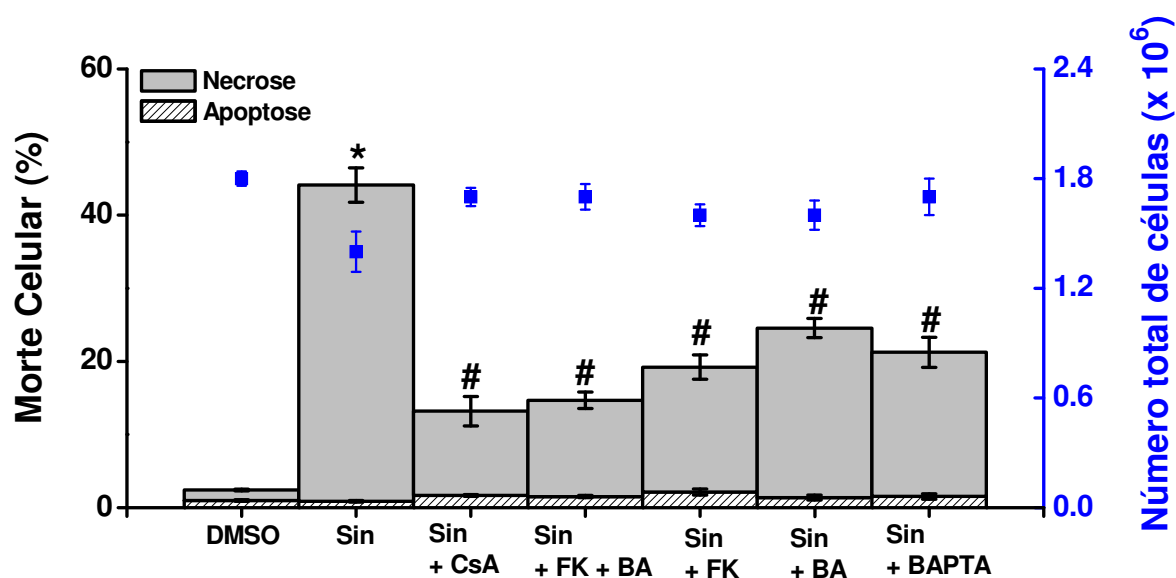


Figura 14- Prevenção de necrose por CsA, FK, BA e BAPTA. As células PC-3 foram tratadas com sinvastatina (Sin, 60 μM) por 2 h na presença (ou na ausência) de ciclosporina A (CsA, 0,5 μM), FK506 (FK, 0,5 μM), boncrecato (BA, 0,5 μM) ou BAPTA (2,5 μM) como indicado na figura. O número total de células após o tratamento está representado pelo terceiro eixo. Os valores representam a média $\pm$ EPM (n = 4, em duplicata). * significativo em relação ao controle DMSO e # significativo em relação ao tratamento com Sin, com $p < 0,05$.

A Figura 14 mostra que tanto FK506 quanto BA protegem parcialmente (60 e 46%, respectivamente) as células PC-3 da indução de necrose por sinvastatina, portanto a necrose é dependente da inibição da calcineurina e da TPM. FK506 e BA adicionados conjuntamente apresentaram efeito protetor aditivo, quantitativamente similar ao efeito causado por ciclosporina A. A prevenção de 54% de necrose observada pelo tratamento com o quelante de Ca^{2+} mostrou que alterações na homeostase de Ca^{2+} devem ser importantes no processo de necrose. O número total de células diminuiu cerca de 15% após o tratamento com sinvastatina, mostrando que deve haver rompimento de parte das células em necrose, o que também é parcialmente prevenido pela ação dos inibidores avaliados.

4.6- O aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ em células PC-3 durante o processo de necrose não é sensível aos inibidores de TPM e de calcineurina

A TPM causada e a ativação de calcineurina são dependentes do aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ (Kowaltowski, 2001, Shibasaki & McKeon, 1995). Para avaliar a participação do Ca^{2+} no processo de necrose, as células após 1 h tratamento com sinvastatina (na presença ou na ausência dos inibidores da TPM e da calcineurina) foram marcadas com a sonda fluorescente Fluo3-AM (Figura 15).

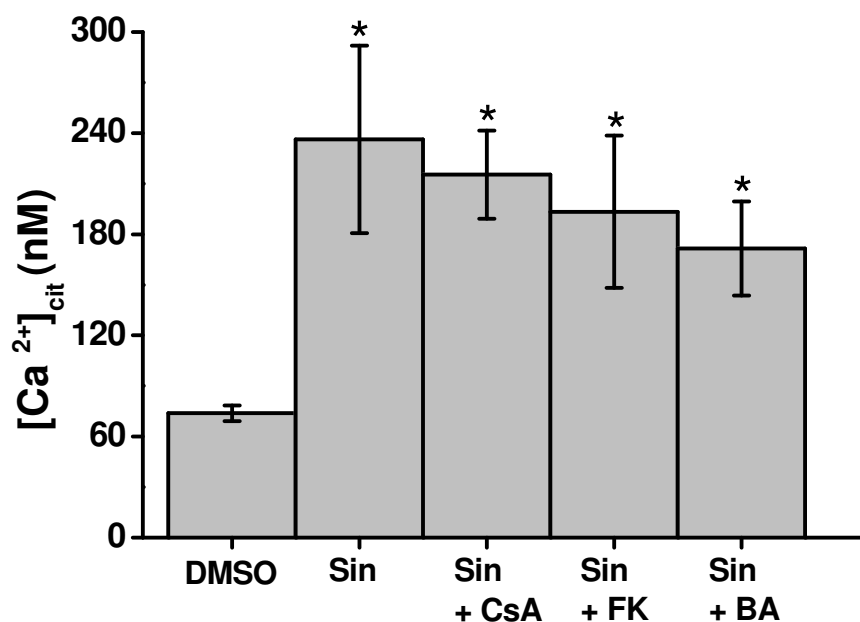


Figura 15- O aumento da concentração de Ca^{2+} citossólico no processo de necrose de células PC-3 não é sensível aos inibidores de calcineurina e de TPM. As células PC-3 foram tratadas com sinvastatina (Sin, 60 μM) por 1 h na presença (ou na ausência) de ciclosporina A (CsA, 0,5 μM), boncrecato (BA, 0,5 μM) ou FK506 (FK, 0,5 μM), como indicado na figura. Os valores representam a média $\pm$ EPM (n = 4, em duplicata). * significativo em relação ao controle DMSO, com $p < 0,05$.

Os resultados mostram que ocorre aumento de aproximadamente 3 vezes da $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ em células tratadas com sinvastatina. Esse aumento não é prevenido pela adição dos inibidores CsA, FK e BA, o que sugere que o aumento do Ca^{2+} precede a ativação da calcineurina e da TPM.

4.7- A sinvastatina causa disfunção mitocondrial em células PC-3 sensível aos inibidores de TPM e calcineurina

Com o objetivo de caracterizar a participação da TPM no processo de necrose, as alterações de $\Delta\Psi_m$ que ocorrem anteriormente ao início da detecção de necrose foram avaliadas. As células PC-3 foram tratadas com sinvastatina na presença ou na ausência de CsA, FK506 e BA. Após 30 minutos de incubação as células foram lavadas e colocadas em meio de reação (veja metodologia) na presença de safranina O, e as alterações de fluorescência foram monitoradas. A permeabilização da membrana plasmática por digitonina permite a entrada de safranina nas células, a qual se adsorve nas membranas de mitocôndrias energizadas, diminuindo a quantidade de fluorescência emitida. O FCCP, protonóforo que leva a eliminação de $\Delta\Psi_m$, causa liberação da safranina O das mitocôndrias e permite estimar as diferenças de $\Delta\Psi_m$ no final dos experimentos. Dessa forma, os resultados mostram que a sinvastatina causou uma diminuição significativa no $\Delta\Psi_m$ em células PC-3 sensível à CsA, FK506 e BA (Fig. 16).

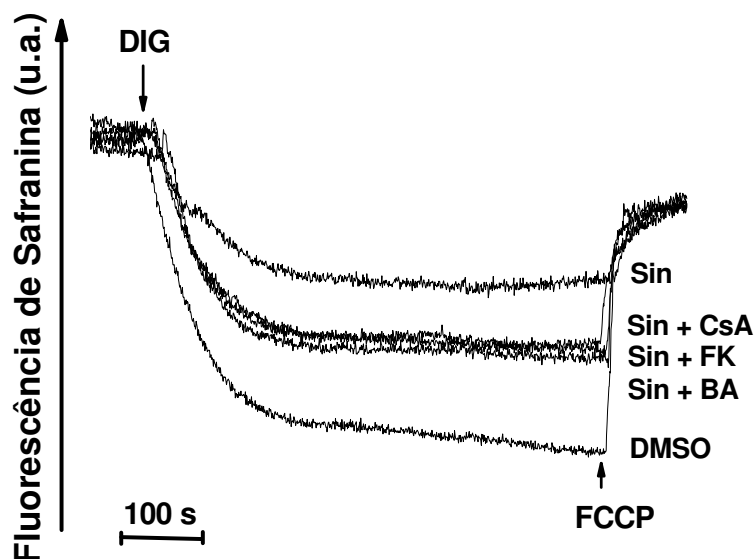


Figura 16- A diminuição do $\Delta\Psi_m$ de células PC-3 induzida por sinvastatina é sensível aos inibidores de calcineurina e de TPM. As células PC-3 foram tratadas com sinvastatina (Sin, 60 μM) por 30 min na presença (ou na ausência) de ciclosporina A (CsA, 0,5 μM), boncrecato (BA, 0,5 μM) ou FK506 (FK, 0,5 μM), como indicado na figura, lavadas e ressuspensas em meio de reação contendo safranina O 5 μM e succinato 5 mM. As setas indicam as adições de digitonina (Dig, 20 μM) e FCCP 1 μM . A figura é representativa de 3 experimentos independentes em duplicata.

A diminuição de $\Delta\Psi_m$ impede a fosforilação oxidativa causando falta de ATP nas células, condição que as leva à necrose. Para analisar a capacidade das mitocôndrias das células PC-3 de realizar a fosforilação oxidativa após o tratamento com sinvastatina na presença ou ausência dos inibidores de TPM e calcineurina, avaliou-se a respiração celular através da medição do consumo de oxigênio (Fig. 17).

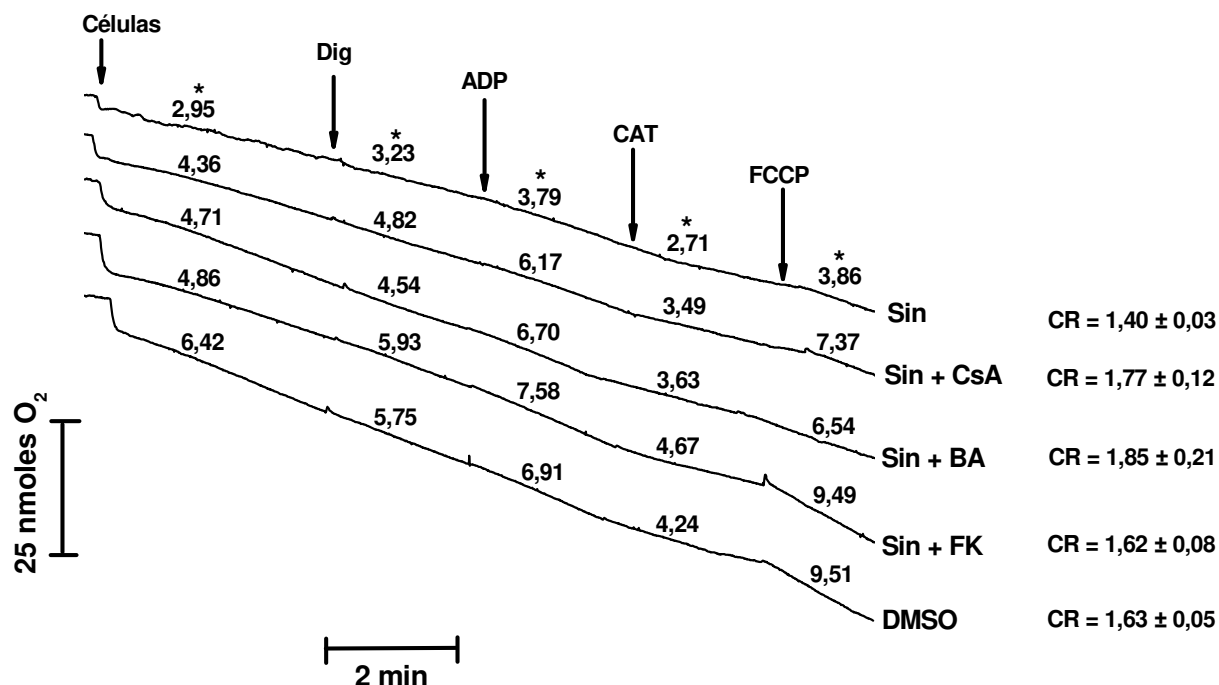


Figura 17- A diminuição da respiração de células PC-3 induzida por sinvastatina é sensível aos inibidores de calcineurina e de TPM. As células PC-3 foram tratadas com sinvastatina (Sin, 60 μ M) por 30 min na presença (ou na ausência) de ciclosporina A (CsA, 0,5 μ M), boncrecato (BA, 0,5 μ M) ou FK506 (FK, 0,5 μ M), como indicado na figura, lavadas e ressuspendidas em meio de reação contendo succinato 5 mM. As setas indicam as adições de células PC-3 (10^6), digitonina (Dig, 20 μ M), ADP 60 μ M, CAT 4 μ M e FCCP 1 μ M. Os valores da velocidade de respiração representam a média $\pm$ EPM (n = 4). CR = controle respiratório.* significativo em relação ao controle DMSO com $p < 0,05$.

A sinvastatina causou diminuição do consumo de oxigênio sensível aos inibidores de calcineurina e TPM. A sensibilidade ao BA e à CsA confirmaram a participação de TPM no processo de necrose. A sensibilidade ao FK506 indica que a ativação da calcineurina deve levar à TPM.

Interessantemente, a fosforilação oxidativa, indicada pelo CR, foi preservada após o tratamento com a estatina e/ou inibidores, o que indica que a respiração remanescente seja resultante da respiração normal das células que permaneceram viáveis.

5- DISCUSSÃO

As células tumorais se diferem das células normais por possuírem alterações genéticas que as permitem escapar dos controles normais de proliferação e de morte celular. Nesse sentido, cada linhagem tumoral possui características que podem ou não ser compartilhadas por outras linhagens. O efeito de estatinas sobre a proliferação e a morte de diferentes células tumorais pode ocorrer por diversos mecanismos, mostrando que esses compostos podem atuar em vários pontos de vias de sinalização. Por isso as estatinas podem ajudar a compreender melhor os mecanismos relacionados às características tumorais. O principal efeito de estatinas em células tumorais, de forma geral, é a deficiência da prenilação de proteínas, causada pela inibição da HMG-CoA redutase. Contudo, as estatinas também podem causar efeitos relacionados à diminuição do conteúdo de colesterol, no caso de tumores que têm maior dependência dessa substância, e efeitos independentes da inibição de HMG-CoA. Aqui serão discutidos os trabalhos que relacionam estatina e câncer de próstata, bem como a contribuição do presente estudo para essa área.

Os testes preliminares realizados com as estatinas lovastatina e sinvastatina causaram diminuição dose-dependente da proliferação e da viabilidade de células LNCaP e PC-3 em porcentagens semelhantes em cada uma dessas linhagens celulares. Essa semelhança pode ser explicada pelas similaridades de estrutura e de propriedades químicas dessas substâncias, como a semelhança do grau de hidrofobicidade (Schachter, 2004).

A inibição da proliferação causada por estatinas nas linhagens celulares LNCaP e PC-3 corrobora o trabalho de Ukomadu & Dutta (2003), que mostrou ocorrer bloqueio da transição da fase G₁ para fase S em linhagens de câncer de próstata tratadas com estatinas. Esse mesmo efeito também já foi observado em linhagens de câncer de mama (Rao et al., em 1998). De maneira geral, a parada do ciclo celular ocorre na fase G₁ e parece estar relacionada com a inibição da síntese de mevalonato que leva à não prenilação das proteínas GTPases Ras e Rho, inviabilizando a transdução de sinais de vários receptores de membrana essenciais à transcrição de genes relacionados à proliferação celular (Soma et al., 1992).

Em câncer de mama e de próstata, alguns trabalhos fizeram uma caracterização mais específica dos efeitos das estatinas que levam à inibição da proliferação (Rao et al., 1999, Sivaprasad et al., 2006). Embora os mecanismos envolvidos não tenham sido completamente desvendados, eles parecem ser diferentes nesses dois tipos de câncer. A parada do ciclo celular em G₁ em linhagens de câncer de mama tratadas com lovastatina deve-se à inibição do proteassoma, que interage diretamente com o anel fechado dessa estatina, resultando no acúmulo dos inibidores de quinase dependente de ciclina (cdk), p21 e p27 (Rao et al., 1999). Enquanto a inibição de proliferação de células PC-3 tratadas com diversas estatinas deve-se à desfosforilação da proteína cdk2 associada à ciclina E, independentemente da ação das proteínas p21 e p27 (Sivaprasad et al., 2006). A inibição observada na linhagem celular LNCaP deve ocorrer pelo mesmo mecanismo observado em células PC-3, segundo os autores do mesmo trabalho.

A diminuição da viabilidade das células LNCaP e PC-3 tratadas com sinvastatina está de acordo com dados da literatura que evidenciam que estatinas causam morte em células de diversos tumores, como leucemia, mesotelioma, astrocitoma, câncer cervical, de cabeça, de pescoço e de mama (Bouterfa et al., 2000; Dimitroulakos et al., 2001; Dimitroulakos et al., 2002; Rubin et al., 1998; Koyuturk et al., 2007).

A maioria dos estudos *in vitro* mostram que as estatinas (1-200 µM) causam morte celular principalmente pelo processo de apoptose (Demierre et al., 2005), a qual pode ocorrer por mecanismos distintos em tipos celulares diferentes (Hindler et al., 2006). Os resultados desse trabalho mostram que sinvastatina 10 µM também causa principalmente apoptose em células LNCaP e PC-3, mas que sinvastatina 60 µM causa morte principalmente por necrose.

Essa indução de necrose e a maior resposta de células PC-3 em relação às células LNCaP aos efeitos antiproliferativos e pró-apoptóticos das estatinas avaliadas, sugerem que as células PC-3 sejam altamente sensíveis às estatinas. Essa característica pode estar relacionada a maior ou menor dependência dessas células do conteúdo de colesterol presente em suas membranas, visto que o colesterol é crucial para a manutenção das estruturas de constituintes de *raft* lipídicas (London & Brown, 2000), os quais serão

discutidos posteriormente. Mas também pode estar relacionada à presença ou ausência de determinadas proteínas relacionadas à regulação de vias celulares afetadas pelas estatinas.

A última hipótese é corroborada por recentes trabalhos que têm demonstrado que a necrose não é uma mera morte celular accidental, exclusivamente dependente do estímulo recebido. A susceptibilidade a esse tipo de morte parece depender parcialmente do tipo celular e envolver uma contribuição ativa de enzimas celulares, que estão sujeitas à regulação (Kroemer et al., 2007). Dessa forma, o estudo dos processos de necrose, o qual têm sido negligenciado, pode ser muito importante para a compreensão dos mecanismos relacionados à indução de morte de células tumorais.

Nesse trabalho caracterizamos a homeostase de Ca^{2+} e a participação mitocondrial na morte de células PC-3 causada por estatinas, nos processo de morte celular por apoptose e por necrose.

Os resultados dos experimentos com células em apoptose (tratamento com sinvastatina 10 μM por até 72 h) mostraram que ocorre aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ durante o processo de morte celular e que esse aumento é prevenido por mevalonato. O aumento desse íon poderia estar relacionado à modulação de fatores de transcrição, de quinases e de fosfatases, à ativação de diversas enzimas necessárias ao processo de apoptose e à indução de TPM (Penzo et al. 2004, Kowaltowski et al., 2001). Embora a TPM não seja um processo normalmente associado à apoptose, há diversos exemplos na literatura que mostram que a apoptose é prevenida por inibidores desse processo como CsA e BA (Zamzami et al., 2005). Por isso, as células PC-3 foram tratadas com sinvastatina e CsA simultaneamente.

A não prevenção de morte por CsA evidenciou que não há participação da TPM no processo de apoptose. Já a prevenção de apoptose e do aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ por mevalonato 100 μM mostrou que a apoptose é dependente do efeito da inibição da HMG-CoA redutase pela sinvastatina. Vários trabalhos relacionam possíveis alterações responsáveis pelos efeitos pró-apoptóticos das estatinas através da inibição da HMG-CoA redutase em diversos tipos celulares, dentre elas estão a não prenilação de diversas proteínas, como as proteínas GTPases Ras e Rho (Soma et al., 1992), a maior concentração

celular de proteínas pró-apoptóticas como Bax e Bim (Agarwal et al., 1999), a menor produção de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 (Dimitroulakos et al, 2000), a ativação de caspases 3,7,8 e 9 (Marcelli et al., 1998, Wang et al., 2000a, Cafforio et al., 2005) e a reativação da JNK (Meral, 2007). Contudo em câncer de próstata a relação entre a deficiência de prenilação de proteínas e a indução de apoptose ainda não foram totalmente caracterizadas.

A proteína supressora tumoral p53 é o principal alvo de alterações genéticas em cânceres humanos e está envolvida em processos de duplicação celular e apoptose com participação mitocondrial (Jiang et al., 2006). Ela ativa vários genes alvos, incluindo os de p21, Bax, Bid e de muitas outras proteínas (Jiang et al., 2006). Embora o mecanismo detalhado ainda não tenha sido descrito, dados revelaram que a p53 pode se translocar para a mitocôndria e interagir diretamente com Bcl-2 ou Bcl-xL e ativar a sinalização pró-apoptótica de Bax (Jiang et al., 2006). Por isso, utilizamos o inibidor de p53, pifitrina, para verificar se a proteína p53 estaria relacionada com a indução de apoptose em células de câncer de próstata tratadas com sinvastatina. A linhagem PC-3 não possui os alelos que expressam a proteína p53 e foi utilizada como controle negativo nesse experimento, enquanto a linhagem LNCaP possui os genes que expressam normalmente essa proteína. Os resultados mostraram que a inibição de p53 não preveniu a indução de apoptose por sinvastatina, evidenciando que nessas células a apoptose não é dependente da via de p53. Esses dados corroboram com os resultados obtidos para células de câncer de mama (Koyuturk et al., 2007).

Em células de câncer de próstata, além da não prenilação de proteínas, os efeitos antiproliferativos e pró-apoptóticos de estatinas podem estar relacionados também à diminuição da síntese de colesterol e a conseqüentes alterações nas vias de sinalização dependentes de *raft* lipídicas, pois os mesmos parecem ser importantes na proliferação e na indução de apoptose em tumores que possuem alto conteúdo de colesterol, como o câncer de próstata e o câncer de boca (Scheel-Toellner et al, 2002, Freeman & Solomon, 2004, Kolanjiappan et al., 2003).

As *raft* lipídicas são microdomínios de baixa densidade da membrana plasmática que são ricos em colesterol e em glicoesfingolipídios, que podem ou não possuir caveolina-1. Quando essa proteína está presente as *raft* lipídicas são denominados cavéolas. As *raft* lipídicas/cavéolas são fundamentais para a ativação da proteína Akt (proteína quinase B), que atua na sobrevivência e na proliferação de células tumorais (Elhyany et al., 2004). Recentemente, Li et al. (2006) mostraram que células A431, linhagem celular de carcinoma epidermóide, quando tratadas com sinvastatina, apresentam diminuição da formação de *raft* lipídicas/cavéola, inativação de Akt e apoptose. Além disso, a restituição de colesterol preveniu a apoptose proporcionalmente à reconstituição de *raft* lipídicas/cavéola e à reativação de Akt. O mesmo trabalho mostrou que as linhagens PC-3 e LNCaP possuem maior quantidade de *raft* lipídicas que as células endoteliais normais de próstata e que a depleção de colesterol de membrana causada por metil- β -ciclodextrina através da quebra de *raft* lipídicas/cavéola, induz apoptose e inibe a proliferação em PC-3 (caveolina +) e em LNCaP (cavolina -), demonstrando que a depleção de colesterol é essencial e mais importante para a sobrevivência celular que a própria presença de caveolina-1. Desse modo, é muito provável que a inibição de síntese de colesterol por sinvastatina e por lovastatina leva à diminuição de *raft* lipídicas nessas linhagens celulares e sejam responsáveis pelos efeitos antiproliferativos e pró-apoptóticos observados.

Além dos efeitos de inibição de proliferação e de indução de apoptose observados nesse trabalho, também é possível que as células tratadas com estatinas durante até 72 horas na presença de SFB 1% (usado para simular a depleção de colesterol plasmático causado pelas estatinas) apresentem morte por autofagia, um processo que constitui uma defesa natural das células contra estresses agudos, dentre eles a privação de nutrientes ou de fatores de crescimento obrigatórios (Baehrecke, 2005, Boya et al., 2005). As metodologias utilizadas nesse trabalho não detectam esse tipo de morte celular, mas a presença de autofagia juntamente com a inibição de proliferação poderiam explicar a grande diminuição do número total de células PC-3 durante o tratamento com sinvastatina 10 μ M por até 72 h.

Vários efeitos das estatinas não estão claramente relacionados com a inibição da HMG-CoA redutase. Os resultados dos experimentos com células PC-3 tratadas com sinvastatina 60 μ M por até 2 h mostraram que a necrose não é dependente da atividade da HMG-CoA redutase, visto que a adição de mevalonato 100 μ M não preveniu a morte celular. O tratamento simultâneo de células PC-3 com sinvastatina e CsA apresentou prevenção significativa de necrose, indicando que esse tipo de morte celular pode ser dependente de TPM e/ou da participação da fosfatase calcineurina, visto que a CsA inibe a ciclofilina D, possível constituinte do PTP (Halestrap et al., 1997) e as ciclofilinas que inibem a calcineurina (Liu et al., 1991). O mesmo tipo de experimento foi realizado na presença de FK506 ou de BA (inibidores específicos da calcineurina e da TPM, respectivamente) e os resultados indicaram que provavelmente a calcineurina e a TPM são importantes no processo de necrose.

A indução de TPM e a ativação de calcineurina dependem de aumento da concentração de Ca^{2+} (Kowaltowski et al., 2001, Shibasaki & McKeon, 1995). A prevenção significativa da morte de células PC-3 tratadas com sinvastatina 60 μ M na presença de BAPTA, quelante de Ca^{2+} , mostrou que esse cátion é importante na indução de necrose, o que foi confirmado pelo resultado que apresentou aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ nessas células durante o tratamento com sinvastatina. A não prevenção do aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ pelos inibidores de TPM e de calcineurina sugerem que esse aumento ocorra anteriormente à indução de TPM e à ativação de calcineurina.

Para caracterizar a participação de TPM e comprovar a participação mitocondrial na indução de necrose por sinvastatina nós avaliamos o $\Delta\Psi_m$ e o consumo de O_2 no início do processo de necrose. A diminuição do $\Delta\Psi_m$ e do consumo de O_2 e a proteção desses efeitos pelos inibidores testados confirmaram a ocorrência de TPM no processo de necrose.

A diminuição do $\Delta\Psi_m$ pode levar à incapacidade de fosforilação oxidativa, que é dependente do acoplamento entre o potencial eletroquímico transmembrana e a fosforilação de ADP (Mitchell, 1961). Embora nos experimentos de respiração o consumo de O_2 tenha diminuído, os valores dos CR mostraram que a capacidade de produção de ATP não foi afetada nos tratamentos com sinvastatina na presença ou na ausência de CsA,

FK e BA. Esse resultado indica que a diminuição do $\Delta\Psi_m$ e do consumo de O_2 no tratamento com sinvastatina seja proporcional ao número de células mortas, o que quantitativamente está de acordo com os experimentos de morte celular mostrando que sinvastatina causa morte de aproximadamente 43% (Fig. 14). Isso pode ser explicado pelo fato da permeabilização da membrana mitocondrial interna resultar rapidamente em inchamento da mitocôndria com conseqüente rompimento da membrana externa, perda de citocromo *c* e colapso da fosforilação oxidativa (Green & Kroemer, 2004). Assim o aumento da respiração causado por CsA, FK506 ou BA indica o aumento do número de células viáveis nessas preparações. Portanto, a respiração e o $\Delta\Psi_m$ residuais não representam uma média de todas as células usadas nos experimentos e sim a respiração e o $\Delta\Psi_m$ normais das células que se mantiveram viáveis.

O BA além de inibir a TPM também inibe o translocador ADP/ATP (Henderson & Lardy, 1970), o que leva ao colapso da respiração. Contudo, o experimento de respiração mostrou que na preparação com BA, após a adição de ADP, as células continuaram realizando a fosforilação oxidativa. Isto pode ser explicado pelo fato de que escolhemos uma baixa concentração de BA para verificar a inibição da TPM. Testes preliminares de viabilidade realizados com células PC-3 tratadas com BA 1 μ M mostraram que essa concentração já causava morte celular, provavelmente pela inibição da síntese de ATP.

A atuação da calcineurina em mecanismos de morte celular ainda não foi totalmente elucidada, mas tem sido melhor caracterizada em células neuronais. Alguns estudos mostraram que em neurônios ela pode participar da via intrínseca de apoptose através de interação com proteínas da família Bcl-2 (Wang et al., 1999) bem como levar à morte celular por necrose, como foi mostrado em cultura de células corticais (Dawson et al., 1993) e de células granulosas cerebelares (Manev et al., 1993). A relação de calcineurina com morte de células tumorais também não é totalmente compreendida. Em células de tumor de Walker, nosso grupo de pesquisa mostrou que a inibição da calcineurina pode tanto aumentar a susceptibilidade quanto proteger essas células de morte por apoptose, dependendo do tipo de estímulo recebido (Campos et al., 2004; Zecchin et al., 2007).

Nesse trabalho o inibidor específico de calcineurina preveniu a necrose, a diminuição do $\Delta\Psi_m$ e do consumo de oxigênio. Similarmente, Ankarcrona et al. (1996) mostraram que CsA e FK506 preveniram o desenvolvimento de necrose e o colapso $\Delta\Psi_m$ observados durante a exposição de neurônios à glutamato. Esses resultados sugerem que nesses casos, a calcineurina deve levar à TPM e, conseqüentemente, à necrose.

No contexto clínico, o trabalho mais importante que mostra os benefícios das estatinas no combate ao câncer de próstata é o estudo populacional realizado por Platz et al. (2006), que evidenciou que esse medicamento leva ao menor risco de desenvolvimento desse câncer em estágios avançados. A grande sensibilidade de PC-3 à sinvastatina, caracterizada por inibição de proliferação na presença desse composto em concentrações $\geq 0,1 \mu\text{M}$ e a diminuição de viabilidade na presença de sinvastatina em concentrações $\geq 1 \mu\text{M}$ corroboraram os resultados do presente trabalho, visto que células PC-3 foram obtidas de um câncer de próstata em estágio IV e é independente de andrógenos.

Em relação às concentrações utilizadas, o trabalho de Thibault et al. (1996) mostrou que lovastatina utilizada em doses de 25 mg/kg não causam efeitos danosos em pacientes e que doses de apenas 4 mg/kg podem alcançar uma concentração de $4 \mu\text{M}$ no soro dos mesmos. Dessa forma, os efeitos antiproliferativos e pró-apoptóticos de sinvastatina observados em células PC-3 poderiam ser conseguidos no soro de pacientes que utilizassem esse medicamento.

Contudo, os estudos *in vitro* que utilizam altas doses de estatina não podem ser extrapolados para interpretações dos efeitos desse medicamento em pacientes, mas sim proporcionar uma à melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nos efeitos antitumorais dessa droga e buscar alvos que possam levar ao desenvolvimento de outras drogas que sejam viáveis em doses clínicas. Nesse sentido, esse trabalho contribuiu para a identificação da calcineurina e da TPM como fatores envolvidos no processo de morte de células PC-3.

6- CONCLUSÕES

- ❖ As estatinas sinvastatina e lovastatina têm efeitos antiproliferativos e citotóxicos semelhantes em células de câncer de próstata. Contudo, as células PC-3 (independentes de andrógeno) são mais sensíveis que as células LNCaP (dependentes de andrógeno);
- ❖ A sinvastatina 10 μM causa morte predominantemente por apoptose em células PC-3 e LNCaP, por processo dependente da deficiência de mevalonato e do aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$, mas independente de sinalização por p53 e de TPM.
- ❖ A sinvastatina 60 μM causa morte predominantemente por necrose em células PC-3 por processo independente do efeito de inibição da síntese de mevalonato, mas dependente de TPM e da ativação de calcineurina. Nesse processo o aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ precede a ativação de calcineurina e a disfunção mitocondrial.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agarwal B, Bhendwal S, Halmos B, Moss SF, Ramey WG & Holt PR. Lovastatin augments apoptosis induced by chemotherapeutic agents in colon cancer cells. *Clin Cancer Res* 5:2223–2229, 1999.

Akerman, KEO & Wikstron, KF. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. *FEBS Lett.* 68: 191–197, 1976.

Amanatullah DF, Reutens AT, Zafonte BT, Fu M, Mani S & Pestell RG. Cell-cycle desregulation and the molecular mechanisms of prostate cancer. *Frontiers in Bioscience* 5: 372-390, 2000.

Ankarcrona M, Dypbukt JM, Orrenius S & Nicotera P. Calcineurin and mitochondrial function in glutamate-induced neural cell death. *FEBS Lett* 394(3):321-4, 1996.

Baehrecke EH. Autophagy: dual roles in life and death? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 505-510, 2005.

Baigent C, Keech A, Kearney PM, Blackwell L, Buck G, Pollicino C, Kirby A, Sourjina T, Peto R, Collins R & Simes R. Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaborators. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomized trials of statins. *Lancet* 366: 1267 – 78, 2005.

Bernardi PS, Vassanelli P, Veronese R, Colonna I, Szabo & Zoratti, M. Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. Effect of protons and divalent cations. *J Biol Chem* 267: 2934-2939, 1992.

Blais L, Desgagne A & LeLorier J. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors and the risk of cancer: a nested case-control study. *Arch Intern Med* 160:2363–8, 2000.

Bogoyevitch MA, Boehm I, Oakley A, Ketterman AJ & Barr RK. Targeting the JNK MAPK cascade for inhibition: basic science and therapeutic potential, *Biochim. Biophys. Acta* 1697:89–101, 2004.

Bouterfa HL, Sattelmeyer V, Czub S, Vordermark D, Roosen K & Tonn JC. Inhibition of Ras farnesylation by lovastatin leads to downregulation of proliferation and migration in primary cultured human glioblastoma cells. *Anticancer Res* 20:2761–2671, 2000.

Boya P, Morales C, Gonzales-Polo RA, Casares N, Perfettini JL, Dessen P, Larochette N, Metivier D, Meley D, Souquere S, Yoshimori T, Pierron G, Codogno P & Kroemer G. Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol Cell Biol.* 25: 1025-1040, 2005.

Brouet A, Sonveaux P, Dessy C, Moniotte S, Balligand JL & Feron O. Hsp90 and caveolin are key targets for the proangiogenic nitric oxide-mediated effects of statins. *Circ Res* 89:866–873, 2001.

Cafforio P, Dammacco F, Gernone A & Silvestris F. Statins activate the mitochondrial pathway of apoptosis in human lymphoblasts and myeloma cells. *Carcinogenesis* 26: 883–891, 2005.

Campos CBL, Degasperi GR, Pacífico DS, Alberici LC, Carreira RS, Fernando Guimarães F, Castilho RF & Vercesi AE. Ibuprofen-induced Walker 256 tumor cell death: cytochrome c release from functional mitochondria and enhancement by calcineurin inhibition. *Biochemical Pharmacology* 68:2197–2206, 2004.

Carmeliet E. Intracellular Ca^{2+} concentration and rate adaptation of the cardiac action potential. *Cell Calcium*, 35:557-573, 2004.

Cory S, Huang DC & Adams JM: The Bcl-2 family, roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 22, 8590-8607, 2003.

Crompton M: The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 341: 233-249, 1999.

Dale KM, Coleman CI, Henyan NN, Kluger J & White CM. Statins and cancer risk: a meta analysis. *JAMA.* 295:74 – 80, 2006

Demierre M-F., Higgins PDR., Gruber SB, Hawk E & Lippman SM Statins and cancer prevention. *Nat. Rev. Cancer* 5: 930-942, 2005.

Denmeade SR & Isaacs J T. A history of a prostate cancer treatment. *Nature Reviews in Cancer*, 2:389-396, 2002.

Dimitroulakos J, Marhin WH, Tokunaga J, Irish J, Gullane P, Penn LZ & Kamel-Reid S. Microarray and biochemical analysis of lovastatin-induced apoptosis of squamous cell carcinomas. *Neoplasia* 4:337–346, 2002.

Dimitroulakos J, Thai S, Wasfy GH, Hedley DW, Minden MD & Penn LZ. Lovastatin induces a pronounced differentiation response in acute myeloid leukemias. *Leuk Lymphoma* 40:167–178, 2000.

Dimitroulakos J, Ye LY, Benzaquen M, Moore MJ, Kamel-Reid S, Freedman MH, Yeger H & Penn LZ. Differential sensitivity of various pediatric cancers and squamous cell carcinomas to lovastatin induced apoptosis: therapeutic implications. *Clin Cancer Res* 7:158–167, 2001.

Edwards P A & Ericsson J. Sterols and isoprenoids: signalling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway. *Annu. Rev. Biochem.* 68: 157–185, 1999.

Elhyany S, Assa-Kunik E, Tsory S, Muller T, Fedida S, Segal S & Fishman D. The integrity of cholesterol-enriched microdomains is essential for the constitutive high activity of protein kinase B in tumour cells. *Biochem Soc Trans* 32:837–839, 2004.

Endo, A. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. *J. Lipid. Res.* 33:1569-1582, 1994.

Freeman MR & Solomon KR. Cholesterol and prostate cancer. *J Cell Biochem* 91:54–69, 2004.

Graaf MR, Beiderbeck AB, Egberts ACG, Richel DJ & Guchelaar H-J. The risk of cancer in users of statins. *J Clin Oncol* 22:2388–94, 2004.

Green DR & Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305: 626-629, 2004.

Green DR & Reed J. C. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312, 1998

Grijalba MT, Vercesi AE & Schreier S. Ca^{2+} -induced increased lipid packing and domain formation in submitochondrial particles. A possible early step in the mechanism of Ca^{2+} -stimulated generation of reactive oxygen species by the respiratory chain. *Biochemistry* 38, 13279-13287, 1999.

Gunter KK & Gunter TE. Transport of calcium by mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* 26:471-485, 1994.

Gunter TE, Yule DI, Gunter KK, Eliseev RA & Salter JD. Calcium and mitochondria. FEBS Lett 567: 96-102, 2004.

Halestrap AP & Brenner C. The adenine nucleotide translocase: a central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death. Curr Med Chem 10: 1507-1525, 2003.

Halestrap AP, Connern CP, Griffiths EJ & Kerr PM. Cyclosporin A binding to mitochondrial cyclophilin inhibits the permeability transition pore and protects hearts from ischaemia/reperfusion injury. Mol Cell Biochem 174:167-172, 1997

Halestrap AP, McStay GP & Clarke SJ. The permeability transition pore complex, another view. Biochimie 84, 153-166, 2002.

He L & Lemasters JJ. Regulated and unregulated mitochondrial permeability transition pores, a new paradigm of pore structure and function? FEBS Lett 512, 1-7, 2002.

Henderson PJ & Lardy HA. Bongkreikic acid. An inhibitor of the adenine nucleotide translocase of mitochondria. J Biol Chem 245: 1319-1326, 1970.

Hindler K, Cleeland CS, Rivera E & Collard CD. The role of statins in cancer therapy. Oncologist 11:306-315, 2006.

Hobbs HH, Brown MS & Goldstein JL. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. Hum.Mutat. 1: 445-466, 1992.

Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, Boland P, Alexander CR, Zagzag D, Yancopoulos GD & Wiegand SJ. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. Science 284:1994-1998, 1999.

Iwai-Kanai E & Hasegawa K. Intracellular signalling pathways for norepinephrine- and endothelin-1-mediated regulation of myocardial cell apoptosis. Mol Cell Biochem 259:163-168, 2004.

Jiang P, Du W, Heese K & Wu M. The Bad guy cooperates with good cop p53: Bad is transcriptionally up-regulated by p53 and forms a Bad/p53 complex at the mitochondrial to induce apoptosis. Mol Cell Biol, 26 (23): 9071-9082, 2006

- Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF & Jones LW. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest.Urol.* 17:16-23, 1979.
- Kolanjiappan K, Ramachandran CR & Manoharan S. Biochemical changes in tumor tissues of oral cancer patients. *Clin Biochem* 36:61–65, 2003.
- Kowaltowski AJ, Castilho RF & Vercesi AE. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett* 495: 12-15, 2001
- Kowaltowski AJ, Vercesi AE & Castilho RF: Mitochondrial membrane protein thiol reactivity with nethylmaleimide or mersalyl is modified by Ca^{2+} , correlation with mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 1318: 395-402, 1997.
- Koyuturk M., Ersoz M & Altioek NA. Simvastatin induces apoptosis in human breast cancer cells: p53 and estrogen receptor independent pathway requiring signalling through JNK. *Cancer Letters* 250:220-228, 2007.
- Kroemer G, Dallaporta B & Resche-Rigon M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol.* 60: 619-642, 1998
- Kroemer G, Galluzzi, L. & Brenner, C. Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. *Physiol Ver.* 87:99-163, 2007
- Kroemer G & Martin SJ. Caspase-independent cell death. *Nat Med* 11:725–730, 2005.
- Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, Bialik A, Fulton D, Lefer DJ, Sessa WC & Walsh K. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat Med.* 6:1004–1010, 2000.
- Kusama T, Mukai M, Iwasaki T, Tatsuta M, Matsumoto Y, Akedo H & Nakamura H. Inhibition of epidermal growth factor-induced RhoA translocation and invasion of human pancreatic cancer cells by 3-hydroxy-3 methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors. *Cancer Res* 61: 4885–4891, 2001.
- Laufer M, Denmeade S R, Sinibaldi VJ, Carducci MA & Eisenberger MA. Complete androgen blockage for prostate cancer: what went wrong? *Journal of Urology.* 164:3-9, 2000.

Leist M, Single B, Castoldi AF, Kühnle S & Nicotera P. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J. Exp. Med.* 185(8): 1481–1486, 1997.

Li YC, Park MJ, S-K Ye, C-W Kim & Y-N Kim. Elevated levels of cholesterol-rich lipid rafts in cancer cells are correlated with apoptosis sensitivity by cholesterol-depleting agents. *Cell Injury, Repair, Aging and Apoptosis* 168 (4): 1107-1118, 2006.

Liu J, Farmer JDJ, Lane WS, Friedman J, Weissman I & Schreiber SL. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66:807-15, 1991.

Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R & Wang, X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86, 147-157, 1996.

London E & Brown DA. Insolubility of lipids in Triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts). *Biochim Biophys Acta* 1508:182–195, 2000.

Marcelli M, Cunningham GR, Haidacher SJ, Padayatty SJ, Sturgis L, Kagan C & Denner L. Caspase-7 is activated during lovastatin-induced apoptosis of the prostate cancer cell line LNCaP. *Cancer Res* 58:76–83, 1998.

Marin J, Encabo A, Briones A, Garcia-Cohen EC & Alonso, MJ. Mechanisms involved in the cellular calcium homeostasis in vascular smooth muscle: calcium pumps. *Life Sci.* 64:279-303, 1999.

Maron DJ, Fazio S & Linton MF. Current perspectives on statins. *Circulation* 101:207–213, 2000.

Meral K, Ersoz M & Altioek N. Simvastatin induces apoptosis in human breast cancer cells: p53 and androgen receptor independent pathway requiring signalling through JNK. *Cancer Letters* 250: 220-228, 2007.

Mather, MW & Rottenberg, H. The inhibition of calcium signalling in T lymphocytes from old mice results from enhanced activation of the mitochondrial permeability transition pore. *Mech. Ageing. Dev.* 123: 707-724, 2002.

Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191: 144-148, 1961.

Murphy G. Models for prostate cancer. 37:115-132, New York: Liss, 1980.

Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, Yamaguchi O, Otsu K, Yamagata H, Inohara H, Kubo T, Tsujimoto Y. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* 434: 652–658, 2005.

Newman TB & Hulley SB. Carcinogenicity of lipidlowering drugs. *JAMA* 275: 55–60, 1996.

Nicotera P & Orrenius S. The role of calcium in apoptosis. *Cell Calcium* 23:173-180, 1998.

Nübel T, Dippold W, Kleinert H, Kaina B & Fritz G. Lovastatin inhibits Rho-regulated expression of E-selectin by TNF α and attenuates tumor cell adhesion. *FASEB J*.18:140–142, 2004.

Oliver MF. Might treatment of hypercholesterolemia increase non-cardiac mortality? *Lancet* 337:1529–1531, 1991.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J. & Pisani P (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55(2): 74-108, 2005.

Peehl DM. Primary cell cultures as models of prostate cancer development. *Endocrine-Related Cancer* 12:19-47, 2005.

Penzo D, Petronilli V, Angelin A, Cusan C, Colonna R, Scorrano L, Pagano F, Prato M, Di Lisa F & Bernardi P. Arachidonic acid released by phospholipase A(2) activation triggers Ca⁽²⁺⁾-dependent apoptosis through the mitochondrial pathway. *J. Biol. Chem.* 279: 25219-25225, 2004.

Platz EA, Leitzmann MF, Visvanathan K, Rimm EB, Stampfer MJ, Willett WC, Giovannucci E. & Platz EA. Statin drugs and risk of advanced prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 98(24):1819 1825, 2006.

Rao S, Lowe M, Herliczek TW & Keyomarsi K. Lovastatin mediated G1 arrest in normal and tumor breast cells is through inhibition of cdk2 activity and redistribution of p21 and p27, independent of p53. *Oncogene* 17:2393–2402, 1998.

Rao S Porter DC, Chen X, Herliczek T, Lowe M, Keyomarsi K. Lovastatin-mediated G1 arrest is through inhibition of the proteasome, independent of hydroxymethyl glutaryl-CoA reductase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96: 7797–7802 (1999).

Robinson J & Cooper, JM. Method of determining oxygen concentrations in biological media, suitable for calibration of the oxygen electrode. *Anal Biochem.* 33(2):390-9, 1970.

Rubins JB, Greatens T, Kratzke RA, Tan AT, Polunovsky VA & Bitterman P. Lovastatin induces apoptosis in malignant mesothelioma cells. *Am J Respir Crit Care Med* 157: 1616–1622, 1998.

Saelens X, Festjens N, Parthoens E, Vanoverberghe I, MK, vKF, Vandenabeele P. Protein synthesis persists during necrotic cell death. *J Cell Biol* 168: 545–551, 2005.

Schachter, M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 19:117-125, 2004.

Scheel-Toellner D, Wang K, Singh R, Majeed S, Raza K, Curnow SJ, Salmon M & Lord JM: The death-inducing signalling complex is recruited to lipid rafts in Fas-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 297:876–879, 2002.

Shibasaki F, Hallin U & Uchino H. Calcineurin as a multifunctional regulator. *J. Biochem.* 131, 1-15, 2002.

Shibasaki F & McKeon F. Calcineurin functions in $\text{Ca}^{(2+)}$ -activated cell death in mammalian cells. *J Cell Biol* 131:735–743, 1995.

Sivaprasad U, Abbas T & Dutta A. Differential efficacy of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase inhibitors on the cell cycle of prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther* 5(9):2310-2316, 2006.

Soma MR, Corsini A & Paoletti R. Cholesterol and mevalonic acid modulation in cell metabolism and multiplication. *Toxicol Lett* 64-65 Spec N°:1–15 (1992)

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J E, Jacotot P, Costantini M, Loeffler N, Larochette DR, Goodlett R, Aebersold DP, Siderovski JM, Penninger & G. Kroemer: Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397, 441-446, 1999

Thibault A, Samid D, Tompkins AC, Figg WD, Cooper MR, Hohl RJ, Trepel J, Liang B, Patronas N, Venzon DJ, Reed E & Myers CE. Phase I study of lovastatin, an inhibitor of the mevalonate pathway, in patients with cancer. *Clin. Cancer Res.* 2: 483-491, 1996.

Ukomadu C & Dutta A. Inhibition of cdk2 activating phosphorylation by mevastatin. *J Biol Chem* 278:4840–6, 2003.

Velho JA, Okanobo H, Degaspero GR, Matsumoto MY, Alberici LC, Cosso RG, Oliveira HCF & Vercesi AE. Statins induce calcium-dependent mitochondrial permeability transition. *Toxicology* 219:124-132, 2006.

Vercesi AE, Kowaltowski, AJ, Grijalba MT, Meinicke AR & Castilho RF. The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. *Biosci Rep* 17, 43-52, 1997.

Vincent L, Chen W, Hong L, Mirshahi F, Mishal Z, Mirshahi-Khorassani T, Vannier JP, Soria J & Soria C. Inhibition of endothelial cell migration by cerivastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor: contribution to its anti-angiogenic effect. *FEBS Lett.* 495:159–166, 2001.

Wang HG, Pathan N, Ethell IM, Krajewski S, Yamaguchi Y, Shibasaki F, McKeon F, Bobo T, Franke TF & Reed JC. Ca^{2+} -induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* 284:399-43, 1999

Wang IK, Lin-Shiau SY & Lin JK. Induction of apoptosis by lovastatin through activation of caspase-3 and DNase II in leukaemia HL-60 cells. *Pharmacol Toxicol* 86:83–91, 2000 (a).

Wang IK, Lin-Shiau SY & Lin JK. Suppression of invasion and MMP-9 expression in NIH 3T3 and v-H-Ras 3T3 fibroblasts by lovastatin through inhibition of ras isoprenylation. *Oncology* 59:245–254, 2000 (b).

Weitz-Schmidt G, Welzenbach K, Brinkmann V, Kamata T, Kallen J, Bruns C, Cottens S, Takada Y & Hommel U. Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site. *Nature Med.* 7, 687–692, 2001.

Wejde J, Hjertman M, Carlberg M, Egestad B, Griffiths WJ, Sjövall J & Larsson O. Dolichol-like lipids with stimulatory effect on DNA synthesis: substrates for protein dolichylation? *J Cell Biochem.* 71:502–514, 1998.

Zamzami N, Larochette N & Kroemer G. Mitochondrial permeability transition in apoptosis and necrosis. *Cell Death Differ* 12 Suppl 2:1478-1480, 2005

Zecchin KG, Seidinger, ALO, Chiaratti M R, Degasperri GR, Meirelles FV, Castilho RF & Vercesi AE. High Bcl-2/Bax ratio in Walker tumor cells protects mitochondria but does not prevent H₂O₂-induced apoptosis via calcineurin pathways. *J Bioenerg Biomembr* 39, 186–194, 2007.

Zhivotovsky B, A. Samali, A. Gahm & Orrenius S. Caspases: their intracellular localization and translocation during apoptosis. *Cell Death Differ.* 6, 644-651, 1999.

