

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

DEBORA DUMMER MEIRA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO CLOTRIMAZOL EM CÉLULAS
MCF-7 DE CARCINOMA MAMÁRIO HUMANO**

RIO DE JANEIRO

2005



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FÁRMACOS
FACULDADE DE FARMÁCIA**

DEBORA DUMMER MEIRA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO CLOTRIMAZOL EM CÉLULAS
MCF-7 DE CARCINOMA MAMÁRIO HUMANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia, Departamento de Fármacos, Laboratório de Enzimologia e Controle do Metabolismo (LabECoM), da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

RIO DE JANEIRO

2005

FICHA CATALOGRÁFICA

Meira, Debora Dummer.

Avaliação dos efeitos do clotrimazol em células MCF-7 de carcinoma mamário humano/ Debora Dummer Meira. - Rio de Janeiro: UFRJ/ FF, 2005.

x, 79f.: il.; 31 cm.

Orientador: Mauro Sola-Penna

Dissertação (mestrado) - UFRJ/ Faculdade de Farmácia/ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2005.

Referências Bibliográficas: f. 50 - 57.

1. Clotrimazol. 2. Neoplasias mamárias. 3. Fosfofrutoquinase. 4. Antagonistas da calmodulina. 5. Células MCF-7. 6. Antineoplásicos. I. Sola-Penna, Mauro. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. III. Título.

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO CLOTRIMAZOL EM CÉLULAS MCF-7 DE CARCINOMA MAMÁRIO HUMANO

DEBORA DUMMER MEIRA

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Enzimologia e Controle do Metabolismo, LabECoM, do Departamento de Fármacos da Faculdade de Farmácia – UFRJ, sob orientação do Professor Mauro Sola-Penna e na vigência dos auxílios concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo a Ciência do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), do Programa de Núcleos de Excelência (Pronex), do Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT), do Programa de Oncobiologia da Fundação Ary Frauzino/ Fundação Educacional Charles Darwin (FAF/FECD) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Aprovado em

Mauro Sola-Penna

Departamento de Fármacos - Faculdade de Farmácia – UFRJ

Vivaldo Moura Neto

Departamento de Anatomia - UFRJ

Ana Luisa Palhares de Miranda

Departamento Fármacos - Faculdade de Farmácia - UFRJ

Vera Lúcia G. Koatz

Instituto de Bioquímica Médica - UFRJ

Rio de Janeiro

2005

DEDICATÓRIA E AGRADECIMENTOS

Primeiramente dedico este trabalho a Deus, que me deu força em todos os momentos de fraqueza, desânimo e cansaço...

Depois à minha mãe e Rodolpho, porque eles me ajudaram além do que eu poderia esperar...

Agradeço ao Professor Mauro Sola-Penna pela orientação deste trabalho.

Gostaria de agradecer aos professores Luis Maurício Trambaioli Lima, Andréia T. Da Poian, Marta Sampaio de Freitas, Marcos Farina, Vivaldo Moura Neto, Carla Holandino, Venício F. Veiga, André Santos, Irene Von Der Weid e ao aluno Leonardo Tavares por ajudarem de diversas formas para realização e conclusão deste trabalho.

Não poderia deixar de agradecer aos amigos e colegas (São muitos, não poderia descrever em apenas uma página...) que entre uma conversa ou ajuda, me fizeram chegar até o fim...

Enfim, agradeço a todos vocês, que tiveram uma função muito especial em cada fase da minha vida aqui no Rio... OBRIGADA!

RESUMO

MEIRA, Debora Dummer. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO CLOTRIMAZOL EM CÉLULAS MCF-7 DE CARCINOMA MAMÁRIO HUMANO. Rio de Janeiro, 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

O câncer é uma das doenças de maior gravidade nos dias atuais. As neoplasias mais agressivas são aquelas que possuem elevada taxa de divisão celular, com mudanças profundas no metabolismo energético, para que elas possam atingir um estágio anormal de proliferação. Sabe-se que a glicólise é a fonte primária de energia utilizada pelas células cancerígenas para sustentar seu crescimento celular desordenado. A enzima chave desta via é a fosfofrutocinase (PFK). Recentemente foi proposto que a associação da PFK ao citoesqueleto seja um passo importante para a modulação do fluxo glicolítico. Existem vários estudos sobre fármacos capazes de alterar e modular esta via, dentre eles o clotrimazol (1-(α -2-chlorotritil)imidazol), um antifúngico que foi recentemente reconhecido como antagonista de calmodulina. A partir dos dados obtidos da literatura, resolveu-se testar o clotrimazol em cultura de células MCF-7 de carcinoma mamário humano para avaliar o efeito dessa substância sobre a viabilidade e morfologia celulares. Um outro objetivo foi verificar possíveis alterações da distribuição intracelular da PFK e sua ligação ao citoesqueleto. No presente trabalho observamos que o clotrimazol induziu uma marcante diminuição da viabilidade celular de maneira dependente do tempo e da dose, quando comparado aos controles (IC_{50} de $88.6 \pm 5.3 \mu\text{M}$ e um $t_{0.5}$ de 89.7 ± 7.2 minutos com $50 \mu\text{M}$ clotrimazol). Notamos também que as células tratadas com este fármaco apresentaram alterações morfológicas em seu citoplasma, membrana celular e núcleo, observadas através de microscopia ótica (Coloração de Giemsa e DIC) e eletrônica de varredura. Além disso, realizamos o fracionamento das células por centrifugação diferencial em duas forças gravitacionais ($27.000 \times g$ por 20 minutos e $120.000 \times g$ por 45 minutos) obtendo cinco frações referentes ao homogeneizado total (HT), ao sedimento e sobrenadante da primeira centrifugação (P1 e S1, respectivamente) e ao sedimento e sobrenadante da segunda centrifugação (P2 e S2, respectivamente). Após tratamento das células com $50 \mu\text{M}$ clotrimazol por 30 minutos, a atividade enzimática remanescente na subfração P2 foi $16.4 \pm 3.6\%$ e $41.0 \pm 15.6\%$ do controle para PFK e aldolase, respectivamente. Os resultados obtidos por Western Blot das frações HT, S1, P1, S2 e P2 e imunocitoquímica das células marcadas para actina e PFK demonstraram a dissociação da enzima em relação ao citoesqueleto (actina), sendo este efeito aumentado à medida que se aumenta o tempo de exposição ao fármaco. Concluímos com estes resultados que o clotrimazol atua como um agente modulador da atividade da PFK, interferindo de alguma forma na ligação dessa enzima aos filamentos de actina. Isto resulta na diminuição de sua atividade e, como consequência, ocorre a redução do fluxo glicolítico, gerando um decréscimo na síntese de ATP, culminando com a morte das células de carcinoma mamário humano. Este trabalho revela um diferente mecanismo de ação do antifúngico clotrimazol e abre uma nova área de pesquisa para a descoberta de novos fármacos antineoplásicos que funcionem como moduladores da via glicolítica.

ABSTRACT

MEIRA, Debora Dummer. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO CLOTRIMAZOL EM CÉLULAS MCF-7 DE CARCINOMA MAMÁRIO HUMANO. Rio de Janeiro, 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

Cancer cells are characterized by a high rate of glycolysis, which is their primary energy source. Glycolysis is known to be controlled by allosteric regulators, as well as by reversible binding of glycolytic enzymes to cytoskeleton. Clotrimazole is an antifungal azole derivative recently recognized as a calmodulin antagonist with promising anticancer effect. Here we show that clotrimazole induced morphological and functional alterations on human breast cancer derived cell line, MCF-7. The drug decreased cell viability in a dose- and time-dependent manner, exhibiting an IC_{50} of $88.6 \pm 5.3 \mu\text{M}$ and a $t_{0.5}$ of 89.7 ± 7.2 minutes, with $50 \mu\text{M}$ clotrimazole. Morphological changes were evident as observed by optical and scanning electron microscopy. Giemsa stained cells showed morphological alterations and a marked nuclear condensation. Scanning electron microscopy revealed the complete loss of protrusions responsible for cell adhesion after a 180 min of treatment with $50 \mu\text{M}$ clotrimazole. These changes occur in parallel to the detachment of the glycolytic enzymes, 6-phosphofructo-1-kinase and aldolase, from cytoskeleton. After a 30 min treatment with $50 \mu\text{M}$ clotrimazole, the remaining activities in a cytoskeleton enriched fraction was $16.4 \pm 3.6\%$ and $41.0 \pm 15.6\%$ of control for 6-phosphofructo-1-kinase and aldolase, respectively. Western Blot and Immunocytochemistry experiments revealed a decrease in the overlapping of the labeling of 6-phosphofructo-1-kinase and F-actin after clotrimazole treatment, suggesting the site of detachment of the enzymes. Altogether, our results support evidence for apoptotic events that might be started by clotrimazole involving inhibition of glycolytic flux in MCF-7 cells and makes this drug a promising agent for treatment of human breast cancer. In addition, the results reported here suggest that detachment of glycolytic enzymes from cytoskeleton could be employed as a marker for cancer cell dysfunction and to evaluate the therapeutic action of anti-cancer drugs.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

1. Efeitos do clotrimazol sobre a viabilidade de células MCF-7	25
2. Morfologia das células MCF-7 analisadas através de M.O. (Giemsa)	27
3. Morfologia das células MCF-7 analisadas através microscopia (DIC)	29
4. Morfologia das células MCF-7 analisadas por microscopia eletrônica de varredura	31
5. Gel de agarose das amostras submetidas ao tratamento com clotrimazol ou DMSO	32
6. Atividade da enzima PFK nas subfrações HT, S1, P1, S2 e P2	34
7. Atividade da enzima aldolase nas subfrações HT, S1, P1, S2 e P2	35
8. Atividade das enzimas PFK e aldolase na subfração enriquecida com actina-f	36
9. Western Blot das subfrações HT, S1, P1, S2 e P2	37
10. Relação Sobrenadante/ Sedimento (S1/P1 e S2/P2) para Actina e PFK	38
11. Co-localização da enzima PFK e Actina em células MCF-7	40
12. Sobreposição das fluorescências do TRITC (Actina) e FITC (PFK)	41
13. Correlação de Pearson da sobreposição das marcações do TRITC e FITC	42
14. Dosagem do consumo de glicose e da produção de lactato	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Moduladores fisiológicos da atividade da fosfofrutocinase

9

LISTA DE ABREVIATURAS

Actina-f - Actina filamentosa
ADP - Adenosina-5'-difosfato
AMP - Adenosina-5'-monofosfato
AMPC - Adenosina-5'-monofosfato cíclica
ATP - Adenosina-5'- trifosfato
BSA - Albumina de soro Bovina
Clotrimazol - 1-(α -2-chlorotriptyl) imidazol
DIC - Microscopia ótica de Contraste Interferencial Diferencial de Nomarski
DL₅₀ - Dose letal para metade (50%) de um grupo de animais
DMEM - Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMF - Dimetilformamida
DMSO - Dimetilsulfóxido
DNA - Ácido Desoxiribonucléico
DTT - Ditiotreitól
EDTA - Ácido Etileno Diamino Tetracético
FITC - Isotiocianato de Fluoresceína
F6P - Frutose-6-fosfato
F-2,6-BP - Frutose-2,6-bifosfato
Gli-1,6-BP - Glicose-1,6-bifosfato
HEPES - *N'*-(2-hidroxietil)-piperazina-*N'*-(2-ácido etanosulfônico)
IC₅₀ – Concentração do fármaco que inibe o crescimento de 50% das células
NADH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzido
PFK - Fosfofrutocinase
TRITC - Isotiocianato de Tetrarodamina
T_{0,5} - Tempo para atingir 50% de morte celular
UV - Ultra-violeta

Sumário

Ficha catalográfica	i
Folha de aprovação	ii
Dedicatória e Agradecimentos	iii
Resumo	iv
Abstract	v
Lista de ilustrações	vi
Lista de tabelas	vii
Lista de abreviaturas	viii
Sumário	ix,x
1. Introdução	1
2. Revisão da literatura	3
2.1. Câncer: Características da doença e epidemiologia	3
2.2. Citoesqueleto como agente modulador das funções celulares	5
2.3. Relação entre citoesqueleto e câncer	6
2.4. Alterações no metabolismo energético e glicolítico das células neoplásicas	7
2.5. Associação da PFK ao citoesqueleto e suas conseqüências metabólicas	9
2.6. Ação do clotrimazol em sistemas biológicos	11
3. Objetivos	14
3.1. Objetivo geral	14
3.2. Objetivos específicos	14
4. Material e Métodos	15
4.1. Reagentes	15
4.2. Cultura de células	15
4.3. Determinação da viabilidade celular através do MTT	16
4.4. Microscopia ótica por coloração de Giemsa	16

4.5. Microscopia ótica de Contraste Interferencial Diferencial de Nomarski(DIC)	17
4.6. Microscopia eletrônica de varredura	17
4.7. Extração de fragmentos apoptóticos	18
4.8. Fracionamento celular	19
4.9. Determinação da atividade das enzimas PFK e Aldolase	20
4.10. Dosagem de proteínas	20
4.11. Síntese de anticorpos anti-fosfofrutocinase	20
4.12. Western Blot das subfrações HT, S1, P1, S2 e P2	21
4.13. Imunocitoquímica: Co-localização da enzima PFK e Actina	21
4.14. Dosagem do consumo de glicose e produção de lactato	22
4.15. Análises estatísticas	23
5. Resultados	24
5.1. Determinação da viabilidade celular	24
5.2. Microscopia ótica por coloração de Giemsa	26
5.3. Microscopia ótica de Contraste Interferencial Diferencial de Nomarski (DIC)	28
5.4. Microscopia eletrônica de varredura	30
5.5. Extração de fragmentos apoptóticos	32
5.6. Determinação da atividade da enzima PFK e Aldolase	33
5.7. Western Blot das subfrações HT, S1, P1, S2 e P2	37
5.8. Imunocitoquímica: Co-localização da enzima PFK e Actina	39
5.9. Dosagem do consumo de glicose e produção de lactato	43
6. Discussão	45
7. Conclusão	49
8. Referências Bibliográficas	50
9. Anexo I - Carta de Aceite e Manuscrito	58

1. Introdução

Atualmente o câncer representa a segunda causa de morte por doença no Brasil, e a cada dia cresce a necessidade de se desenvolver um tratamento eficiente e com o mínimo de efeitos colaterais para o paciente. As neoplasias mais agressivas são aquelas que possuem elevada taxa de divisão celular. Portanto, mudanças profundas no metabolismo energético dessas células ocorrem para que elas possam atingir esse estágio anormal de proliferação (EL-BACHA e SOLA-PENNA, 2003).

Algumas alterações metabólicas já foram claramente descritas, sendo a glicólise a fonte primária de energia utilizada pelas células cancerígenas para sustentar seu crescimento celular desordenado (BECKENER, 1990). Sabe-se que o controle da glicólise é feito por regulação alostérica (GREINER e col., 1994) e também por ligação reversível das enzimas glicolíticas ao citoesqueleto (ARNOLD e PETTE, 1968). Dentre essas enzimas, destaca-se a fosfofrutocinase (PFK), que funciona como uma válvula que regula o fluxo de carbono através da glicólise e a síntese de ATP (NELSON e COX, 2000). Recentemente foi proposto que a associação da PFK ao citoesqueleto, especialmente aos filamentos de actina, é importante para a modulação do fluxo glicolítico em células de melanoma, determinando a viabilidade celular (PENSO e BEITNER, 1997; GLASS-MARMOR e BEITNER, 1999 e KARNIEL e BEITNER, 2000). Esse último mecanismo tem atraído muita atenção e foi identificado como um importante mecanismo para gerar ATP nas vizinhanças do citoesqueleto, modulando a morfologia e funções celulares (BEITNER, 1993; VÉRTESSY e col., 1999).

Estudos realizados recentemente em nosso laboratório descreveram que a associação da enzima fosfofrutocinase ao citoesqueleto é mais pronunciada nos tecidos cancerígenos, do que nos tecidos normais extraídos da mesma mama. Adicionalmente, observou-se que nas células neoplásicas, 60% da atividade da PFK está localizada na fração enriquecida com actina, ao passo que nos tecidos sadios apenas 36% da atividade encontra-se nesta fração. A maior associação da PFK ao citoesqueleto seria influenciada direta ou indiretamente pelo potencial metastático deste tipo de câncer e poderia ter um efeito direto sobre o fluxo glicolítico e conseqüentemente sobre o consumo de glicose (EL-BACHA e col., 2003).

Logo, um fármaco que atuasse sobre a via glicolítica, modificando a distribuição e a associação da fosfofrutocinase ao citoesqueleto, estaria também modulando o mecanismo pelo qual as células cancerígenas obtêm energia para manter seu crescimento desordenado.

Existem alguns estudos acerca de fármacos capazes de diminuir a viabilidade de algumas linhagens de células cancerígenas, sendo estes classificados como promissores agentes antineoplásicos. Dentre esses agentes, destaca-se o clotrimazol (1-(α -2-chlorotritil)imidazol), antifúngico que foi recentemente reconhecido como antagonista de calmodulina. De acordo com os estudos feitos em culturas de células de melanoma, adenocarcinoma de cólon e carcinoma de pulmão, esse derivado imidazolínico foi capaz de induzir uma significativa redução nos níveis de glicose 1,6- bisfosfato, frutose 1,6- bisfosfato, ATP e viabilidade celular (PENSO e BEITNER, 1997, 2002a, 2002b).

A partir dos dados obtidos da literatura, resolvemos então testar o clotrimazol em cultura de células de carcinoma mamário humano, da linhagem MCF-7, e avaliar os efeitos dessa substância sobre a viabilidade celular, morfologia e danos subcelulares, por microscopia ótica (Coloração de Giemsa e Contraste Interferencial Diferencial) e eletrônica de varredura, respectivamente. Um outro objetivo foi tentar identificar os possíveis mecanismos associados à morte celular, através da extração de fragmentos apoptóticos e posterior eletroforese em gel de agarose. Além desses objetivos, tentamos verificar se haveriam mudanças significativas das atividades das enzimas PFK e aldolase devido ao tratamento com o clotrimazol. Finalmente, verificaremos se haveriam alterações da ligação e distribuição da fosfofrutocinase ao citoesqueleto, através de Western Blot e imunocitoquímica.

Parte dos resultados obtidos foi recentemente aceita para publicação no periódico "*Molecular Genetics and Metabolism*". A carta de aceite e o manuscrito encontram-se no Anexo I.

2. Revisão da literatura

2.1. Câncer: Características da doença e epidemiologia

O câncer é uma doença originada a partir de três fatores preponderantes: a pré-disposição genética, os fatores ambientais e os fatores hereditários. Esses fatores levam ao surgimento de mutações genéticas, que podem ocasionar lesões do DNA, que quando não reparadas, poderão dar início ao processo neoplásico. Embora o dano genético seja randomizado, existem alguns genes que estão mais freqüentemente associados aos processos neoplásicos como, por exemplo, o gene P53, que na sua forma não mutada é um gene supressor de tumores (NIGRO e col., 1989).

O câncer é caracterizado por uma população celular heterogênea, com expressão de diferentes antígenos de superfície e receptores hormonais, além da morfologia celular não convencional. Pontén e col. (1990) descreveram que algumas células normais (endoteliais e fibroblastos) possuiriam receptores para os fatores de crescimento produzidos pelas células malignas, formando-se assim um cenário de interdependência mútua e consequente manutenção do crescimento celular desordenado dos processos neoplásicos. Nota-se com isso que o mesênquima do tecido normal adjacente ao processo neoplásico, também colabora para o crescimento e desenvolvimento das neoplasias.

Alguns estágios devem ser percorridos até que o câncer se instale, destacando-se a “indução”, “promoção” e “progressão”, que passamos a descrever. No estágio da indução, caracterizado pela lesão do DNA, vários fatores são responsáveis pelo dano do DNA, dentre eles rearranjos cromossômicos, radiação UV, agentes químicos e vírus oncogênicos. Todos estes fatores poderão gerar uma mudança irreversível do genótipo da célula normal progenitora, produzindo uma célula “iniciada”. O segundo estágio consiste na ativação de oncogenes ou inibição de genes supressores, e é denominado de promoção. Um exemplo já citado anteriormente é o do gene P53. As células neste estágio são denominadas “transformadas”. O último estágio da carcinogênese é chamado de “progressão”, onde há a mudança do microambiente celular, com o objetivo de manter o processo maligno e a capacidade de gerar metástases. Durante esta fase, são geradas condições para o

crescimento das células imortalizadas, tais como produção de fatores de crescimento e citocinas (PONTÉN e col., 1990).

O termo tumor ou neoplasia caracteriza-se por uma massa anormal de tecido com crescimento que excede os limites anatômicos do tecido sadio. Os tumores podem ser benignos, não apresentando risco de levar à morte, ou malignos. Câncer é o termo utilizado para todos os tumores malignos e compreende um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem outros tecidos e órgãos, adjacentes ou não. Geralmente, as células neoplásicas malignas proliferam agressivamente (EL-BACHA e SOLA-PENNA, 2003).

Dentre os tipos de câncer, destaca-se o câncer de mama. O câncer de mama é provavelmente o mais temido pelas mulheres devido à sua alta freqüência e principalmente pelos seus efeitos psicológicos, que afetam a percepção da sexualidade e da própria imagem pessoal. Ele é relativamente raro antes dos 35 anos de idade, mas acima desta faixa etária sua incidência cresce rápida e progressivamente. No Brasil, o câncer de mama é o que mais causa mortes entre as mulheres, sendo que o número de novos casos esperados para o ano de 2005 é de 49.470, com um risco estimado de 53 casos a cada 100 mil mulheres (INSTITUTO NACIONAL DO CANCER, 2004).

Atualmente, o câncer se constitui na segunda causa de morte por doença no Brasil, e, em 1994, as neoplasias foram responsáveis por 10,86% dos 887.594 óbitos registrados, sendo que 53,81% dos óbitos ocorreram entre os homens e 46,05%, entre as mulheres. Recentemente, PARKIN e col. (2001) estimaram, para o ano de 2000, que o número de casos novos de câncer no mundo alcançaria a marca dos 10 milhões, dentre os quais, 53% dos casos ocorreriam nos países em desenvolvimento. Dentre esses casos, os tumores de pulmão (902 mil casos novos) e próstata (543 mil) foram os mais freqüentes no sexo masculino, enquanto que no sexo feminino observaram-se as maiores ocorrências para os tumores de mama (1 milhão de casos novos) e colo do útero (471 mil). No Brasil, as estimativas para o ano de 2005 apontam que ocorrerão 467.440 casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes, à exceção de pele não melanoma, serão os de próstata e pulmão no sexo masculino e mama e colo do útero para o sexo feminino, acompanhando a mesma magnitude observada no mundo. São esperados 229.610 casos novos para o sexo masculino e 237.830 para o sexo feminino (INSTITUTO NACIONAL DO CANCER, 2004).

2.2. Citoesqueleto como agente modulador das funções celulares

Apesar da maioria das células animais não possuir mobilidade, quase todas exibem alterações em sua morfologia que são indicativas de movimento. Alguns exemplos são o alongamento dos axônios, a contração muscular e a constrição da membrana celular durante a mitose. Okabe e Hirokawa (1990) mostraram claramente que os microtúbulos e microfilamentos associam-se e dissociam-se continuamente ao longo do axônio, em neurônios em cultura. Além dessas alterações, as células exibem vários movimentos internos, tais como a separação dos cromossomos e o transporte de vesículas, porém sem aparente alteração de sua morfologia. Estes movimentos internos sofrem um controle muito delicado e são essenciais para o crescimento e diferenciação celulares. Como podemos imaginar, todos esses movimentos requerem energia (ATP), assim como proteínas que convertam energia química contida nessas moléculas em trabalho ou mobilidade. Essas proteínas “conversoras” formam uma rede denominada CITOESQUELETO, que está em constante rearranjo, possibilitando que os movimentos celulares aconteçam (LODISH e col., 2000).

O citoesqueleto é composto por três tipos principais de proteínas: microfilamentos ou filamentos finos, compostos por actina, filamentos intermediários e microtúbulos, composto de polímeros de tubulina (NELSON e COX, 2000; LODISH e col., 2000). As proteínas que formam a ultra-estrutura do citoesqueleto possuem grande relevância na manutenção da forma e mobilidade celulares; no suporte de organelas celulares (LEE e CHEN, 1988; LEE e col., 1989); na orientação dos ribossomas; na maquinaria de síntese de proteínas (ORNELLES e col., 1986) além de desempenhar um papel fundamental na regulação das atividades metabólicas celulares (POGLAZOV, 1983).

A influência do citoesqueleto na regulação das atividades metabólicas parece ser causada pela associação de várias enzimas glicolíticas aos filamentos de actina. Atualmente sabe-se que a glicólise é extremamente estruturada e suas enzimas interagem com elementos do citoesqueleto, principalmente actina (CLEGG, 1992; OVÁDI e ORÓSZ, 1997).

2.3. Relação entre citoesqueleto e câncer

Como já foi descrito anteriormente, o câncer é causado principalmente por mutações dos genes das células somáticas, sendo necessários vários anos para o acúmulo dessas mutações. Assim, observa-se que o câncer está relacionado ao processo de envelhecimento celular (LODISH e col.,2000). Na literatura existem relatos de que as mudanças nas funções dos elementos do citoesqueleto têm papel fundamental no processo de envelhecimento (RAO e COHEN, 1991).

Nota-se então que existe uma relação entre as mudanças do citoesqueleto com o desenvolvimento do câncer. Rao e Cohen (1991) observaram que alterações na estrutura da actina componente do citoesqueleto estão associadas à proliferação celular e neoplasia. A maioria das evidências que mostra o papel dos filamentos de actina na proliferação e diferenciação celular é baseada em ensaios utilizando citocalasinas em cultura de células (REBILLARD e col., 1987; TANAKASUKA e col., 1987; TUNG e FRITZ, 1987; FREED e col., 1989).

Alterações da organização e função da actina são possíveis mecanismos envolvidos na formação de tumores malignos (BEM-ZE'EV,1985; HOLME, 1990). Vários promotores de tumores, por exemplo, são conhecidos por induzirem a reorganização da actina em diversos tipos celulares (RAO,1985; SASTRODIHARDJO e col., 1987; SOBUE e col.,1988; KELLER e col., 1989; BIRREL e col., 1990) e mudanças na organização da actina foram observadas em diversas linhagens transformadas (POLLAK e col., 1975; WANG e GOLDBERG,1976; KOFFER e col., 1985; BEM-ZE'EV, 1986). Infecções virais também podem ser causadoras do câncer e afetam profundamente a arquitetura da actina do citoesqueleto (JACSON e BELLET, 1989).

O tecido tumoral periférico é rico em actina, e alguns estudos sugerem que a mesma esteja envolvida na capacidade de invasão das células cancerígenas (GABBIANI e KOCHER, 1983). Realmente, células de melanoma B16, uma linhagem com capacidade metastática elevada, parecem ter mais actina-f (actina filamentosa) quando comparada a outros tumores menos invasivos (HOLME e col. 1987). Existem relatos de que um aumento na síntese da actina parece estar envolvido na transformação benigna de tumores e no potencial metastático (RAZ e GEIGER, 1982; FRIEDMAN e col., 1984).

2.4. Alterações no metabolismo energético e glicolítico das células neoplásicas

As neoplasias malignas mais agressivas são aquelas que possuem elevada taxa de divisão. Portanto, mudanças profundas no metabolismo energético dessas células ocorrem para que elas possam atingir esse estágio anormal de proliferação. Algumas alterações metabólicas já foram claramente descritas ao passo que outras não foram suficientemente estudadas. São verificadas várias alterações nas funções de marcadores bioquímicos da célula neoplásica, dentre eles a enzima málica (OVÁDI, 1997), a síntese de colesterol (SABINE, 1976), as lançadeiras glicerol-fosfato e malato-aspartato (NAKASHIMA, 1984) e a enzima creatina cinase (HANSEN, 1986). A atividade das enzimas regulatórias da via glicolítica geralmente encontra-se elevada no câncer (BAGGETO, 1992). Diversos trabalhos relataram o aumento das atividades das enzimas hexocinase (PARRY e PEDERSEN, 1983), fosfofrutocinase (VORA, 1985; EL-BACHA e col., 2003) e piruvato cinase (HAMMOND, 1978) nos processos neoplásicos. Essas mudanças nos perfis enzimáticos estão positivamente correlacionadas com a progressão da malignidade e, conseqüentemente, com a agressividade do tumor.

Dentre as enzimas citadas, focaremos nossa atenção nas alterações da fosfofrutocinase (PFK), enzima chave do metabolismo energético. Em tecidos e células normais, a ligação da PFK aos filamentos de actina ativa a enzima e aumenta a afinidade por um de seus substratos, frutose-6-fosfato (OVÁDI, 1997). A partir de ensaios de co-sedimentação e microscopia eletrônica, foi mostrado que em condições fisiológicas, a associação da PFK aos filamentos de actina estabiliza a estrutura tetramérica (mais ativa) da enzima (ROBERTS e SOMERO, 1987).

Atualmente, tem sido demonstrado que alguns hormônios promotores do crescimento, tais como insulina e fatores do crescimento, estimulam a glicólise por aumentar a ligação das enzimas glicolíticas ao citoesqueleto assim como os níveis de glicose-1,6-bisfosfato (SILVA e col., 2004). Esse composto atua como um sinal intracelular, que regula as diferentes vias do metabolismo da glicose em diferentes condições, através de seus efeitos alostéricos nas enzimas chave do metabolismo de carboidratos. A glicose 1,6-bisfosfato é um potente ativador da fosfofrutocinase citosólica (PFK), a enzima limitante da glicólise e, além disso, regula a produção de ATP pela glicólise citosólica (BEITNER, 1993; PENSO e BEITNER,

2002b). Livnat e col. (1995) demonstraram que todos os efeitos estimulatórios da insulina e fatores de crescimento sobre os níveis de glicose-1,6-bifosfato e glicólise, podem ser prevenidos por tratamento com antagonistas de calmodulina. Estes resultados sugerem que o complexo Ca^{2+} / calmodulina está envolvido na ação estimulatória da insulina e fatores de crescimento sobre a glicólise. A calmodulina é uma proteína multifuncional ligadora de Ca^{2+} que está envolvida na regulação de vários eventos celulares, inclusive no crescimento normal, anormal e proliferação celular (REDDY, 1994). Já foi relatado que os níveis de calmodulina estão aumentados em células cancerígenas, e que há uma correlação positiva entre a taxa de crescimento e os níveis de calmodulina em células cancerígenas. Os antagonistas de calmodulina estão associados à diminuição da viabilidade de vários tipos celulares (MAC NEIL e col., 1993). Baseado nesses achados é razoável supor que os antagonistas de calmodulina possam modular o crescimento e a glicólise em células cancerígenas.

Como a fosfofrutocinase é um dos pontos de regulação da via glicolítica e sua interação com os filamentos de actina é bem esclarecida, o estudo da compartimentalização desta enzima em células cancerosas torna-se um ótimo modelo para a compreensão da regulação do fluxo glicolítico e, em última análise, do consumo de glicose pelas células tumorais. Além disso, estudos com fármacos que modulem a atividade da PFK podem contribuir para elucidar os mecanismos de regulação da via glicolítica e, em última estância, do controle da proliferação de células neoplásicas.

2.5. Associação da PFK aos filamentos de actina e suas conseqüências metabólicas

Enzimas são catalisadores biológicos com propriedades muito peculiares, estando envolvidas em quase todos os eventos celulares. Dentre todas as enzimas da via glicolítica que se associam a elementos do citoesqueleto, a PFK é a enzima que se liga com mais afinidade aos filamentos de actina (ROBERTS e SOMERO, 1987; MASTERS, 1987; CLARKE e MARTERS, 1975; CLARKE e MORTON, 1982).

A ação da PFK consiste em catalisar a fosforilação da frutose-6-fosfato formando a frutose-1,6-bifosfato, na presença de ATP e magnésio, sendo um dos pontos de regulação da via glicolítica. Diversos estudos mostram que esta enzima sofre regulação por uma série de metabólitos e hormônios, os quais alteram a velocidade desta via, de acordo com a necessidade celular energética ou de intermediários glicolíticos (NELSON e COX, 2000). Na Tabela 1 são mostrados alguns moduladores fisiológicos da atividade da fosfofrutocinase.

Tabela 1. Moduladores fisiológicos da atividade da fosfofrutocinase

Ativadores	Inibidores
AMP	ATP(Concentrações > 1 mM)
AMPc	Citrato
ADP	Adrenalina (Fígado)
F 2,6 BP	Glucagon (Fígado)
Insulina (Fígado e músculo)	
Adrenalina (Músculo)	
Actina-f	

A atividade da enzima PFK é regulada por sua ligação aos filamentos de actina, em que a forma ligada está mais ativa, e apresenta uma maior afinidade pela frutose-6-fosfato (F6P) (LIU e ANDERSON, 1980; ALVES e SOLA-PENNA, 2003; SILVA e col., 2004). Segundo Kuo e col. (1986) e Luther e Lee (1986) a forma fosforilada da enzima presente em músculo esquelético de coelho apresenta uma maior afinidade pela actina do que a forma defosforilada.

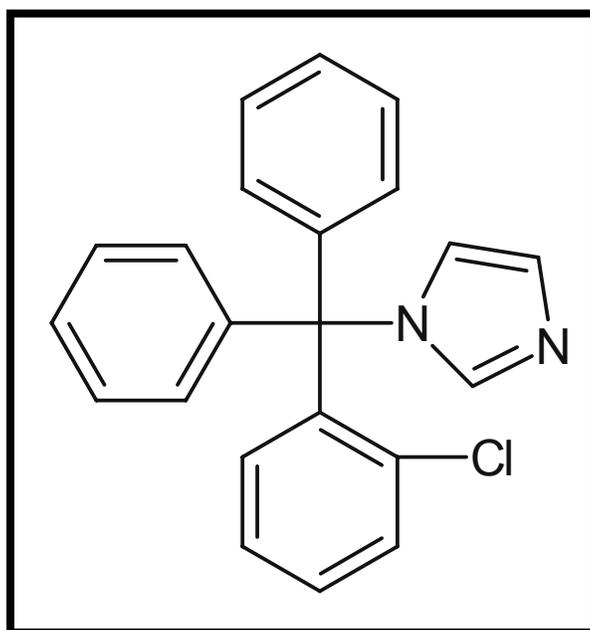
De acordo com a literatura, alguns estudos indicam que a PFK em sua forma ligada, por estar funcionando em sua atividade máxima, não é passível de sofrer regulação alostérica, como por exemplo por F2,6BP e inibição por ATP e citrato (MASTER e col., 1987; OVÁDI e ORÓSZ, 1997). Porém, esta observação parece ser aplicada especialmente às formas musculares da enzima, sob condições fisiológicas. Já foi demonstrado *in vivo*, que a insulina estimula rapidamente a ligação da PFK aos filamentos de actina em tecidos musculares, e que a fração ligada encontra-se mais ativa que a solúvel (CHEN-ZION e col., 1992 a e 1992 b). Foi observado também que a PFK associada à membrana celular de eritrócitos se encontra mais ativa (HIGASHI e col., 1979).

Analisando todos esses fatos, observa-se que nas células e tecidos que necessitam de um fornecimento mais eficiente de ATP, tais como músculo esquelético em exercício, neurônios e principalmente células cancerígenas, a interação da PFK com o citoesqueleto se torna um dos pontos chave da regulação da via glicolítica. Logo, os estudos com fármacos moduladores desta via são de extrema importância para melhor compreendermos os processos neoplásicos, assim como para se interferir na progressão dos mesmos.

2.6. Ação do clotrimazol em sistemas biológicos

O clotrimazol, fórmula molecular $C_{22}H_{17}ClN_2$ (Figura A) possui um anel imidazolínico ligado a uma molécula de bisfenil-(o-clorofenil)-carbinol e foi primeiramente sintetizado por Büchel e col. (1972). Essa substância possui peso molecular de 344,85 g, ponto de ebulição entre 147-149 °C e se apresenta na forma de cristal branco a amarelo pálido. Ele é uma base fraca, levemente solúvel em água, benzeno, tolueno e solúvel em acetona, clorofórmio, DMF e DMSO. A DL_{50} oral em ratos é 923,708 mg/Kg (HOOGERHEIDE, 1982). Este fármaco possui diversas ações sobre vários sistemas biológicos, porém sua principal ação é como antifúngico de largo espectro, sendo muito eficaz no tratamento de micoses causadas por dermatófitos patogênicos, infecções por alguns gêneros de leveduras e infecções tópicas causadas por várias espécies de *Cândida*, *Microsporum* e outros fungos (MEADE, 1979). A ação antifúngica do clotrimazol se dá pela inibição da esterol-14- α -demetilase, enzima que atua na síntese do ergosterol, componente da membrana celular. Com a inibição desta enzima, há o acúmulo do precursor 14- α -metilesterol, que desestabiliza a membrana fosfolipídica, aumentando a permeabilidade da mesma, inibindo o crescimento fúngico (BOSSCHE e col., 1989). O clotrimazol possui diversas denominações comerciais, tais como Canesten®, Lotrimin®, Mono-Baycuten®, entre outros.

Figura A. Estrutura Química do Clotrimazol



Além da ação antifúngica, o clotrimazol também exerce papel modulador das vias de sinalização, que são cruciais para a sobrevivência e crescimento celulares normais. Em células sanguíneas e outros tipos celulares, a transdução de sinais externos, via receptores de superfície, levam a produção de inositol (1,4,5)-trifosfato e a resultante liberação de cálcio do retículo endoplasmático. Normalmente, essa liberação induz a abertura dos canais de cálcio da membrana plasmática e ativa os canais intermediários de condução de cálcio ativados por potássio (Canais IK), permitindo o fluxo de cálcio para o espaço extracelular (BERRIDGE, 1993). O clotrimazol desestabiliza a homeostase do cálcio por liberá-lo de seus estoques intracelulares, através da inibição do influxo do mesmo e também por bloquear os canais IK (BRUGNARA e col., 1997).

Essa alteração da regulação do cálcio, causada pelo clotrimazol, foi demonstrada como sendo a responsável pela inibição da progressão do ciclo celular na transição da fase G1-S, resultando na parada do ciclo na fase G0-G1. A indução da liberação do cálcio pelo clotrimazol leva a depleção do Ca^{++} intracelular, que causa a ativação da Proteína Quinase R RNA dependente, resultando na fosforilação do fator $eIF2\alpha$ (eukaryotic translation initiation factor) na serina 51, com concomitante inativação do mesmo. Essa inativação inibe a formação do complexo ternário entre Met-t RNA, $eIF2\alpha$ e GTP, um passo crucial na iniciação da tradução. Este fato resulta na inibição da síntese de proteínas promotoras do crescimento, tais como as ciclinas A, D e E no estágio de iniciação da tradução, levando à parada do crescimento celular na fase G1 (AKTAS e col., 1998).

O clotrimazol foi também associado à inibição da proliferação de células vasculares endoteliais, agindo como um inibidor do fator de crescimento vascular endotelial *in vitro* e *in vivo* (TAKAGASHI, 1998; TAKEI e col., 2003). Além disso, foi demonstrado que o clotrimazol possui atividade anti-malarial, através da inibição da degradação do grupo heme, componente das hemácias, resultando num aumento da hemólise induzida pelo mesmo (TIEN HUY, 2004).

Recentemente o clotrimazol foi reconhecido como antagonista de calmodulina e alguns estudos demonstraram que ele é capaz de causar um decréscimo dos níveis de glicose-1,6-bisfosfato e frutose-1,6-bisfosfato em células CT-26 de adenocarcinoma de cólon e LL/2 de carcinoma pulmonar. Esses resultados sugerem que o clotrimazol exerce algum efeito sobre essas duas moléculas sinalizadoras da glicólise, através da inibição da atividade do complexo Ca^{2+} / calmodulina, uma vez que a potência relativa do clotrimazol em reduzir os

níveis de glicose-1,6-bisfosfato e frutose-1,6-bisfosfato está próximo ao IC₅₀ reportado para inibição pela calmodulina. A queda na concentração da glicose-1,6-bisfosfato leva a uma diminuição da atividade da PFK, que é refletida pela queda drástica dos níveis de frutose-1,6-bisfosfato, que é o produto da reação da PFK e também um ativador alostérico desta enzima. Essa redução está fortemente relacionada ao decréscimo do conteúdo de ATP celular. Sabe-se que um decréscimo nos níveis de ATP causa uma série de anormalidades celulares, uma vez que o mesmo é requerido para os processos dependentes de fosforilação (transporte de íons através da membrana celular, translocações etc) e que sua queda pode levar à morte celular (PENSO e BEITNER, 2002b).

Podemos notar que o clotrimazol atua em diversos sistemas biológicos, modulando ou inibindo várias funções celulares, destacando-se sua capacidade de alterar a atividade de algumas enzimas da via glicolítica. Sabemos que o câncer é uma doença de extrema gravidade e que as células neoplásicas possuem um metabolismo energético muito eficiente, que as torna capazes de atingir um estágio anormal de proliferação. Infelizmente, não existem medicamentos eficientes e com reduzidos efeitos colaterais disponíveis no mercado. Nota-se uma necessidade urgente em se descobrir novos fármacos que sejam capazes de destruir as células cancerígenas sem prejudicar as células normais. Foi com esse objetivo que resolvemos testar o clotrimazol em cultura de células MCF-7 de carcinoma mamário humano e avaliar o efeito dessa substância sobre a viabilidade e morfologia celulares. Um outro objetivo foi verificar possíveis alterações da distribuição intracelular das enzimas fosfofrutocinase e aldolase, verificando se há algum tipo de alteração da ligação da PFK ao citoesqueleto, propondo o possível mecanismo de ação do clotrimazol.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a citotoxicidade do clotrimazol sobre cultura de células de carcinoma mamário humano (linhagem MCF-7) e elucidar seu mecanismo de ação como potencial agente antineoplásico.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar os efeitos do clotrimazol sobre a viabilidade de células MCF-7 de carcinoma mamário humano;
- Verificar as alterações morfológicas e danos subcelulares causados pelo clotrimazol;
- Avaliar os efeitos do clotrimazol sobre o fluxo glicolítico das células MCF-7, bem como seu mecanismo de ação.

4. Material e Métodos

4.1. Reagentes

As células de carcinoma mamário humano da linhagem MCF-7, foram obtidas do Banco de Células do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro. O clotrimazol foi obtido da DEG Importação de Produtos Químicos, Lote 1102659003, NF 187.980 (São Paulo, SP, Brasil). Ditioneitol (DTT), 3,3'-diaminobenzidina, fluoreto de sódio (NaF), ATP, frutose-6-fosfato, frutose-1,6-bifosfato, glicose, aldolase, triosefosfato isomerase, α -glicerofosfato desidrogenase, NADH, DMSO, cloreto de magnésio, sulfato de amônio, MTT e Faloidina-TRITC foram obtidos da Sigma Chemicals (St. Louis, MO, USA). Tris, álcool metílico e álcool etílico foram obtidos da Merck do Brasil (Rio de Janeiro, R.J., Brasil). Filtros de difluoreto de polivinilideno (PVDF Hybond-P) foram obtidos da Amersham Pharmacia Biotech. Anticorpo monoclonal anti-actina e IgG conjugada a biotina foram obtidos da Santa Cruz Biotechnology. Estreptavidina conjugada a peroxidase de nabo e Estreptavidina conjugada a FITC foram obtidos da Caltag Laboratories (Burlingame, California, USA). Os frascos e placas utilizadas para o crescimento das células foram obtidos da Corning Incorporated (N.Y., USA). DMEM, HEPES e soro fetal bovino foram obtidos da Gibco-Invitrogen Corporation (N.Y., USA). Os demais reagentes utilizados apresentavam o mais alto grau de pureza.

4.2. Manutenção da cultura de células

As células de carcinoma mamário humano da linhagem MCF-7 foram mantidas em frascos de cultura e acondicionadas em estufa de cultura sem CO₂. As mesmas cresceram em meio DMEM (Meio de Eagle modificado por Dulbecco) e foram suplementadas com 10% de soro fetal bovino, insulina (5 μ g/ml), tampão HEPES (3g/l), glutamina (0,3 g/l) e bicarbonato de sódio (0,2 g/l), pH 7,2. O inóculo inicial foi de $5,0 \times 10^4$ células ml⁻¹, que foram subcultivadas a cada dois dias e mantidas em fase log de crescimento celular, como descrito por Holandino e col., 2001.

4.3. Determinação da viabilidade celular através do MTT

A viabilidade celular foi determinada pelo método de Mosmann (1983). Células MCF-7 ($2,0 \times 10^4$ células ml^{-1}) foram cultivadas em placas de 96 poços, em meio DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino, insulina (5 $\mu\text{g/ml}$), tampão HEPES (3g/l), glutamina (0,3 g/l) e bicarbonato de sódio (0,2 g/l), pH 7,2. Após 24 horas foram lavadas com PBS duas vezes e incubadas a 37°C em PBS contendo glicose 5 mM e diferentes concentrações de clotrimazol (30, 40, 50 e 60 μM) por 30, 60, 120 e 180 minutos. O clotrimazol foi dissolvido em DMSO, utilizando-se como controle uma solução de 0,5% do mesmo em PBS, contendo glicose 5 mM nas mesmas condições utilizadas para o clotrimazol. Ao final do tratamento, lavou-se os poços duas vezes com PBS e adicionou-se 200 μl de uma solução de MTT (Brometo de 3,4,5-dimetilazol-2,5-difeniltetrazolium) 0,5 mg/ml em DMEM. As placas de cultura contendo essa solução foram deixadas por 4 horas a 37°C. Ao final dessa incubação, descartou-se o sobrenadante e os cristais de formazam produzidos foram dissolvidos em 200 μl de DMSO. Procedeu-se leitura em espectrofotômetro a 490 nm. Foram feitas triplicatas de cada concentração de clotrimazol.

4.4. Microscopia óptica por coloração de Giemsa

Células MCF-7 ($1,0 \times 10^5$ células ml^{-1}) foram cultivadas em placas de cultura de 24 poços contendo lamínulas de vidro, nas mesmas condições descritas no item 4.2. Após 24 horas, as células estavam aderidas às lamínulas, que foram lavadas com PBS duas vezes e incubadas a 37°C em PBS contendo glicose 5 mM e clotrimazol 50 μM por 90 e 180 minutos. Como controle, utilizamos uma solução de DMSO 0,5% em PBS, contendo glicose 5 mM nos tempos de 90 e 180 minutos. As células foram analisadas através de coloração de Giemsa (GIEMSA, 1926) em microscópio óptico modelo Axioplan-2, marca Zeiss (Alemanha). Pelo menos 200 células de cada preparação foram analisadas ao microscópio óptico. Foram feitos três experimentos independentes para a detecção das alterações celulares.

4.5. Microscopia óptica de contraste interferencial diferencial de Nomarski (DIC)

Células MCF-7 ($4,0 \times 10^4$ células ml^{-1}) foram cultivadas em placas de cultura de 24 poços contendo lamínulas de vidro, nas mesmas condições já descritas no item 4.2. Após 24 horas as células estavam aderidas às lamínulas e foram lavadas com PBS duas vezes e incubadas a 37°C em PBS contendo glicose 5 mM e clotrimazol 50 μM por 30 e 180 minutos. Como controle, utilizamos uma solução de DMSO 0,5% em PBS, contendo glicose 5 mM nos tempos de 30 e 180 minutos. As lamínulas foram montadas sobre lâminas de vidro, utilizando solução de N-propilgalato 20 mM. A análise microscópica das imagens foi feita com auxílio de um Microscópio Óptico modelo Axioplan-2, marca Zeiss (Alemanha) com filtros apropriados.

4.6. Microscopia eletrônica de varredura

Células MCF-7 ($4,0 \times 10^4$ células ml^{-1}) foram cultivadas em placas de cultura de 24 poços contendo lamínulas de vidro, nas mesmas condições descritas no item 4.2. Após 24 horas as células estavam aderidas às lamínulas e foram lavadas com PBS duas vezes e incubadas a 37°C em PBS contendo glicose 5 mM e clotrimazol 50 μM por 30 e 180 minutos, respectivamente. Como controle, utilizamos uma solução de DMSO 0,5% em PBS, contendo glicose 5 mM nos tempos de 30 e 180 minutos. As células aderidas às lamínulas de vidro, tratadas ou não com o clotrimazol, foram fixadas com glutaraldeído 2,5% em PBS por 2 horas. As lamínulas foram então lavadas três vezes com PBS, com intervalos de 10 minutos de uma lavagem para outra. Após isso, procedeu-se à etapa de desidratação, que consistiu em se mergulhar as lamínulas em concentrações crescentes de etanol (35, 50, 70, 90 e 100%). Este etanol foi trocado por CO_2 em um aparelho de Ponto Crítico, modelo CPD 030, marca Balzers (Germany). As lamínulas foram então recobertas por uma película de ouro por um metalizador modelo FL9496, Balzers (Germany). As células foram examinadas utilizando microscópio eletrônico de varredura, modelo JSM 5310, marca Jeol (Tóquio, Japão).

4.7. Extração de fragmentos apoptóticos

Células MCF-7 cultivadas em garrafa de 150cm², foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas com PBS contendo glicose 5 mM e clotrimazol 50 µM, a 37°C por 180 minutos. Como controle, utilizamos uma solução de DMSO 0,5% em PBS, contendo glicose 5 mM no tempo de 180 minutos. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com PBS, incubadas com DMEM suplementado (como descrito no item 4.2) a 37°C por 180 minutos. Logo após este procedimento, as células ($2,0 \times 10^7$) foram retiradas da garrafa de cultura com um pequeno raspador de células ("Cell scraper") e centrifugadas a 1000 x g por 1 minuto em centrífuga Centra modelo MP4R, marca IEC (USA). Procedeu-se à extração dos fragmentos apoptóticos, que consistiu em: adicionar solução de lise celular (Tris 10 mM, pH 7,4; EDTA 5 mM e Triton X-100 1%) e incubar por 20 minutos a 4°C. O homogeneizado obtido foi centrifugado a 12.000 x g por 20 minutos. Foi adicionado ao sobrenadante RNase A (100 µg/ml) e incubou-se a 37°C por 1 hora. Após isso, foi adicionada Proteinase K (0,1 mg/ml) e incubou-se a 57°C por 1 hora. Procedeu-se a extração do DNA através da mistura de 1 parte da amostra para 1 parte de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). Centrifugou-se a amostra a 12.000 x g por 5 minutos e precipitou-se o DNA com 1/10 de NaCl 3M e 3 vezes o volume de etanol absoluto gelado, agitando levemente, e deixando precipitar "overnight" a -20°C. Após isso, a amostra foi centrifugada a 13.000 x g por 20 minutos. O pellet obtido foi então lavado com etanol 70% e novamente centrifugado a 13.000 x g por 5 minutos, sendo lavado finalmente com etanol absoluto e centrifugado a 13.000 x g por 5 minutos. O produto final obtido (fragmentos apoptóticos) foram deixados secar a temperatura ambiente e depois ressuspensos em 50 µl de tampão TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 10 mM; pH 8,0). As amostras (20 µl) foram então submetidas à eletroforese em gel de agarose (1,2%) a 85 v por 1 hora. Esse gel foi tratado por 15 minutos com brometo de etídeo (2 µl/ml) e as bandas foram observadas em transiluminador com luz ultra-violeta em comprimento de onda de 300 nm e fotografado com câmara Polaroid.

4.8. Fracionamento celular

Células MCF-7 cultivadas em garrafa de 150cm² foram lavadas com PBS duas vezes e incubadas a 37°C em PBS contendo glicose 5 mM e clotrimazol 50 µM por 30 minutos. Como controle, utilizamos uma solução de DMSO 0,5% em PBS, contendo glicose 5 mM por 30 minutos. Após isso, as células ($1,5 \times 10^7$) foram lavadas duas vezes com PBS e lisadas por cavitação com nitrogênio líquido. O produto da lise foi ressuspensão em aproximadamente 2,5 ml de tampão de reconstituição (Tris 50 mM; KCl 150 mM; MgCl₂ 5 mM; EGTA 1 mM; NaF 5 mM; NaVO₄ 1 mM; α-glicerofosfato 1 mM; DTT 1 mM; sacarose 0,25 M; PMSF 1% v/v; leupeptina 0,1% v/v, pepstatina 0,1% v/v) e posteriormente centrifugado a 100 x g por 5 minutos a 4°C em centrífuga Centra modelo MP4R, marca IEC (USA). O sedimento foi descartado e o sobrenadante, denominado homogeneizado total (HT), foi aliquotado para ensaio das atividades enzimáticas, dosagem de proteínas e Western Blot. Seguiu-se ao protocolo de fracionamento celular proposto por Alves e Sola-Penna (2003) e El-Bacha e col. (2003) em que o restante do HT foi submetido a uma nova centrifugação a 27.000 x g por 20 minutos a 4°C em ultracentrífuga HIMAC, modelo CS100, marca Hitachi (Koki, Japão), rotor modelo AT4. O sedimento obtido (denominado P1) foi ressuspensão em 400 µl de tampão de reconstituição. O sobrenadante (denominado S1) foi aliquotado para posterior dosagem das atividades enzimáticas, dosagem de proteínas e Western Blot. O restante do S1 foi centrifugado a 120.000 x g por 45 minutos a 4°C, em ultracentrífuga HIMAC, modelo CS100, marca Hitachi (Koki, Japão), rotor modelo AT4, conforme protocolos descritos para co-sedimentação de elementos do citoesqueleto, especialmente actina e enzimas da via glicolítica em tecidos musculares (ARNOLD e PETTE, 1968; CLARKE e MARTERS, 1975) e não musculares (CLARKE e MORTON, 1982). Após esta última ultra-centrifugação obteve-se duas subfrações celulares: o sobrenadante (denominado S2) e o sedimento (denominado P2), que foi ressuspensão em 400 µl de tampão de reconstituição. O restante deste foi congelado para posterior dosagem de proteínas e Western Blot. Todas as subfrações celulares foram mantidas em banho de gelo, até a realização dos ensaios enzimáticos.

4.9. Determinação da atividade das enzimas PFK e aldolase

As subfrações celulares obtidas no item 4.7 foram utilizadas para a dosagem da atividade das enzimas PFK e aldolase. O meio de reação utilizado para dosagem da enzima PFK continha Tris-HCl 50 mM, pH 7,4; MgCl₂ 5 mM; (NH₄)₂SO₄ 5 mM; frutose-6-fosfato 1 mM; ATP 0,1 mM; NADH 0,2 mM; 1,5 U aldolase; 2,5 U triosefosfato isomerase, 4 U α -glicerofosfato isomerase. O meio de reação utilizado para dosagem da enzima aldolase continha Tris-HCl 50 mM, pH 7,4; MgCl₂ 5 mM; (NH₄)₂SO₄ 5 mM; frutose-1,6-bisfosfato 1 mM; NADH 0,2 mM; 2,5 U triosefosfato isomerase, 4 U α -glicerofosfato isomerase. A reação foi iniciada com 50 μ l das subfrações (HT, S1, P1, S2 e P2) e a oxidação do NADH foi acompanhada pela medida da diminuição da absorbância a 340 nm em espectrofotômetro Shimadzu (Analytical Instruments Division), modelo 2401 PC UV-VIS (Kyoto, Japão).

4.10. Dosagem de proteínas

Foram utilizados 10 μ l das subfrações celulares obtidas no item 4.7 para determinação do conteúdo protéico pelo método descrito por LOWRY, 1951.

4.11. Síntese de anticorpos anti-fosfofrutocinase

Os anticorpos anti-fosfofrutocinase usados para o Western Blot (item 4.12) e Imunocitoquímica (item 4.13) foram produzidos em ratos a partir da PFK purificada de coelhos segundo método descrito por Kopperschläger, 1995. Os anticorpos foram produzidos em nosso laboratório e gentilmente cedidos pela aluna de mestrado Mônica M.M. de Carvalho.

4.12. Western blot das subfrações HT, S1, P1, S2 e P2

Foram utilizadas 50µg proteína das subfrações celulares obtidas no item 4.7, que foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% contendo SDS (SDS-PAGE) como descrito por Laemmli, 1970. Após a eletroforese, foi feita a transferência das proteínas para filtros do tipo PVDF Hybond-P (Amersham Pharmacia Biotech), em seguida bloqueados com Tween-PBS (Tris-HCl 20 mM, pH 7.5, NaCl 500 mM, Tween-20 0.1%) contendo BSA 2% e subsequentemente incubados com anticorpo monoclonal anti-actina (1:500; Santa Cruz Biotechnology) ou anticorpo anti-PFK (1:100). Os filtros PVDF foram então lavados três vezes com Tween-PBS, seguido de incubação por 1 hora com anti IgG conjugado com biotina (1:1000; Santa Cruz Biotechnology). Os filtros foram, então, incubados com estreptavidina conjugada a peroxidase de nabo (1:1000; Caltag Laboratories, Burlingame, California, USA). As proteínas imunoreativas foram visualizadas através da coloração com 3,3'-diaminobenzidina. As bandas foram quantificadas por densitometria utilizando o software Scion Image (Scion Co, Frederick, Maryland, USA).

4.13. Imunocitoquímica: Co-localização da enzima PFK e Actina

Células MCF-7 ($1,0 \times 10^5$ células ml^{-1}) foram cultivadas em placas de cultura de 24 poços contendo lamínulas de vidro, nas mesmas condições já descritas no item 4.2. Após 24 horas foram lavadas com PBS duas vezes e incubadas a 37°C em PBS contendo glicose 5 mM e clotrimazol 50 µM por 30, 60, 120 e 180 minutos. O clotrimazol foi dissolvido em DMSO, sendo este utilizado como controle, onde se usou uma solução com DMSO 0,5% em PBS contendo glicose 5 mM (mesma concentração final utilizada com o clotrimazol) nos respectivos tempos (30, 60, 120 e 180 minutos). As células tratadas com clotrimazol e o controle DMSO 0,5% foram fixadas com PBS contendo paraformaldeído 4% e sacarose 4% por 20 minutos, à temperatura ambiente, sendo em seguida permeabilizadas com PBS contendo Triton X-100 0.1% por 5 minutos, e em seguida lavadas com PBS e marcadas com Faloidina-TRITC (isotiocianato de tetraiodamina) (1:1000; Sigma) por 2 horas, à temperatura ambiente. As células foram então bloqueadas com Tween-PBS (Tris-HCl 20 mM, pH 7.5, NaCl 500 mM, Tween-20 0.1%) contendo BSA 2% e incubadas com anticorpo anti-fosfofrutocinase

(1:10) “overnight” a 4°C. Subseqüentemente, as células foram incubadas com anticorpo anti IgG conjugado a biotina (1:50; Santa Cruz Biotechnology) e estreptavidina conjugado a FITC (isotiocianato de fluoresceína) (1:50; Caltag Laboratories, Burlingame, CA) por 1 hora, à temperatura ambiente. As lamínulas foram montadas sobre lâminas de vidro utilizando solução de N-propilgalato 20 mM. A análise microscópica das imagens fluorescentes foi feita com auxílio de um microscópio (Olympus BX40, Tokyo, Japão), equipado com filtros apropriados e utilizando-se objetiva 100x em óleo de imersão. As imagens foram capturadas com uma “cooled-charged-coupled device” câmera (Photometrics, Tucson, AR). A análise da sobreposição das marcações com TRITC e FITC foi realizada através da Correlação de Pearson (Pearson’s correlation) utilizando-se o software Image-Pro Plus 4.0 (Media Cybernetics).

4.14. Dosagem do consumo de glicose e produção de lactato

Células MCF-7 (confluentes) foram adicionadas à placas de cultura de 24 poços, na presença de clotrimazol 50 µM e DMSO 0,5% (usado como veículo) e mantidas a 37°C por 30 e 120 minutos. Também foram feitos controles sem nenhum tipo de tratamento. Ao final do tratamento, as células foram lavadas duas vezes com PBS e foi adicionado meio de cultura. As placas de cultura foram incubadas por mais 48 horas a 37°C. Foram retiradas alíquotas do meio de cultura nos tempos 0, 24 e 48 horas de incubação, em que a glicose remanescente e o lactato formado, foram medidos como descrito a seguir. Para a quantificação da concentração de glicose remanescente foi usado um kit colorimétrico de dosagem enzimática (Glucox 500 – Doles Reagentes e Equipamentos para Laboratórios, LTDA, Brasil). A glicose foi medida através da diferença entre o seu conteúdo no tempo 0 e após 24 e 48 horas de incubação. A taxa do consumo de glicose foi calculada através de regressão linear. Os níveis de lactato foram medidos através da formação do NADH a partir da oxidação do lactato na presença de um excesso de NAD⁺. A reação foi catalisada pela adição da enzima lactato desidrogenase (2U/ ml) e a concentração de lactato foi calculada através do coeficiente de extinção molar do NADH a 340 nm ($\epsilon_{(340)} \text{ NADH} = 6,22 \times 10^6 \text{ M} \times \text{cm}^{-1}$).

4.15. Análises estatísticas

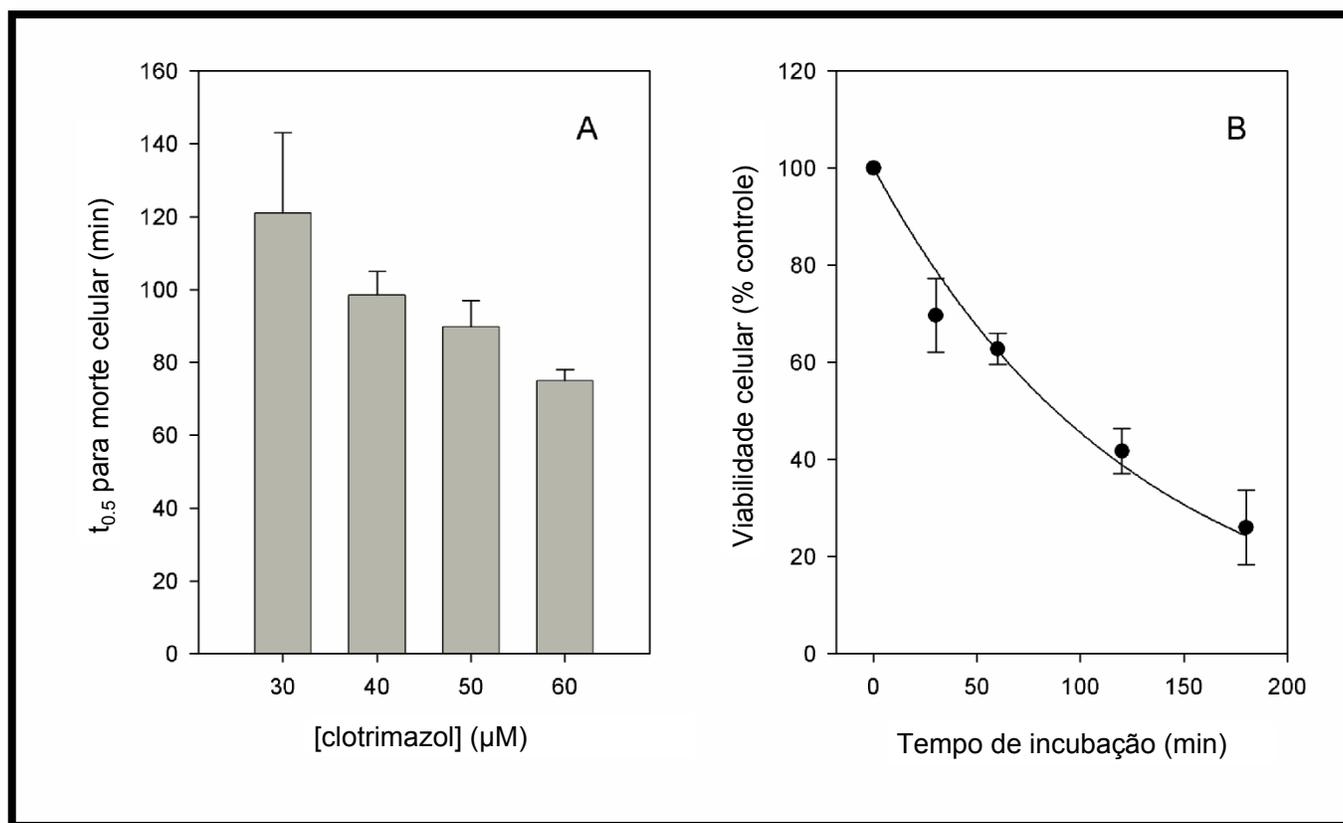
As análises estatísticas foram realizadas através do programa GraphPad InStat Software (Copyright 1992-1998, California, U.S.A), utilizando-se o teste de análise de variâncias ANOVA bicaudal para os ensaios de determinação da viabilidade celular e Imunocitoquímica (Co-localização da enzima PFK e Actina), *Teste t de Student* pareado para a determinação da atividade das enzimas PFK/ aldolase (subfração P2), *Teste t de Student* não pareado para a determinação da atividade das enzimas PFK/ aldolase (subfrações HT, S1, P1, S2 e P2), *Teste t de Student* não pareado para o Western Blot da subfrações (HT, S1, P1, S2 e P2), ANOVA bicaudal e ANOVA bicaudal, Pós-teste de Student-Newman-Keus para dosagem do consumo de glicose e produção de lactato, respectivamente. Utilizamos para todas as variáveis a média e o erro padrão (como medida de precisão da média). Todos os experimentos foram realizados, ao menos, em triplicata. O símbolo * denota diferença estatisticamente significativa para $P < 0,05$ em todos experimentos, com exceção da Figura 13 (Imunocitoquímica: Co-localização da enzima PFK e Actina), em que * significa diferença estatisticamente significativa para $P < 0,01$.

5. Resultados

5.1. Determinação da viabilidade celular

Os ensaios de determinação da viabilidade celular foram realizados para se verificar as alterações na sobrevivência das células MCF-7 quando tratadas ou não com o clotrimazol, estabelecendo assim o tempo e concentrações ideais de incubação com o fármaco. Observou-se que as células tratadas com o clotrimazol exibiram uma diminuição da viabilidade celular de maneira dependente da dose e do tempo de incubação. Notou-se que o aumento da concentração do clotrimazol induziu uma diminuição da viabilidade das células MCF-7, como pode ser observado na Figura 1A, confirmando que a resposta ao fármaco é dependente da dose utilizada. A IC_{50} calculada foi $83,3 \pm 6,5 \mu\text{M}$ ($P < 0,05$, ANOVA bicaudal). O tempo para atingir 50% da viabilidade celular ($t_{0,5}$) foi calculado para cada concentração de clotrimazol testada (30-60 μM) e os resultados são apresentados na Figura 1B ($P < 0,05$, ANOVA bicaudal). Observa-se que a resposta ao fármaco é dependente tanto do tempo de incubação, quanto da concentração do clotrimazol usada.

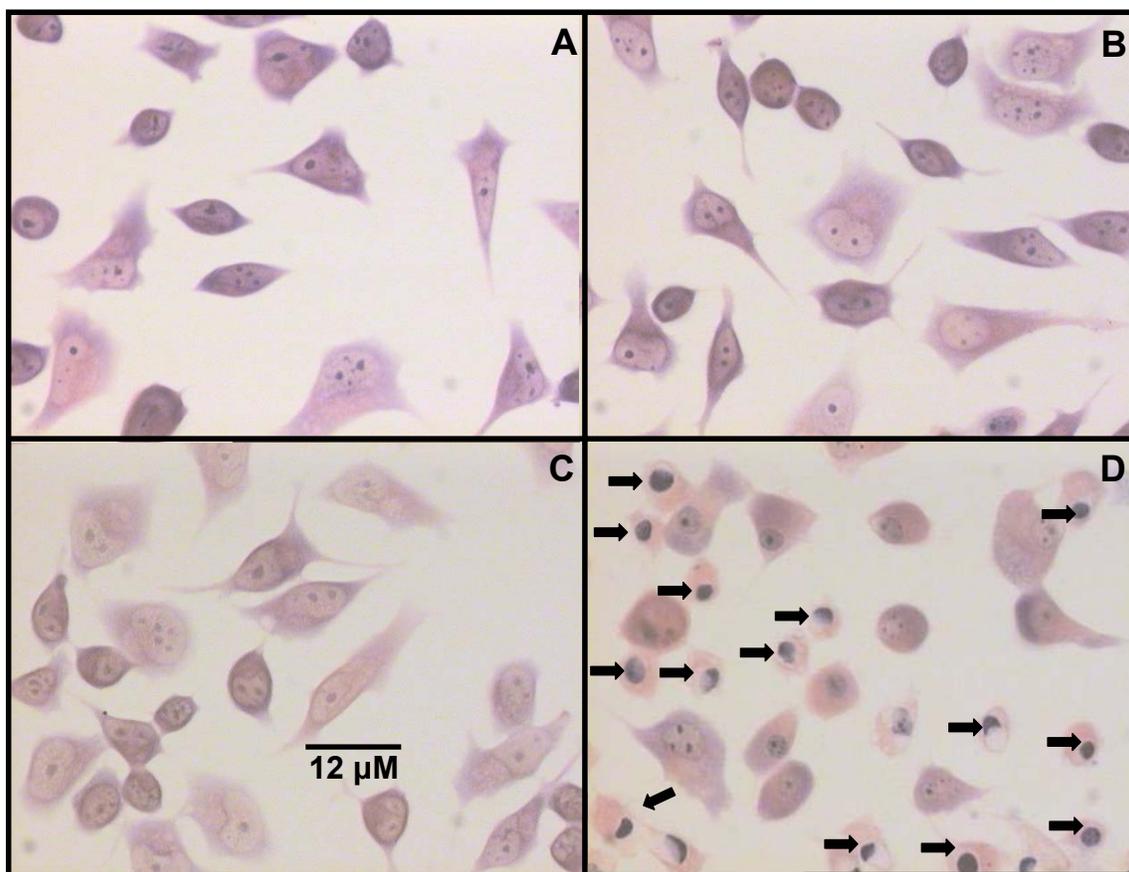
Figura 1. Efeitos do clotrimazol sobre a viabilidade de células MCF-7. A viabilidade das células MCF-7 foi detectada pelo ensaio do MTT, como descrito em Material e Métodos. Os resultados são apresentados em função da concentração de clotrimazol utilizada (A) e em função do tempo de incubação com clotrimazol 50 μM (B). O $t_{0.5}$ para morte celular foi calculado a partir da curva tempo-dependente para cada concentração de clotrimazol testada, através de regressão não-linear, utilizando o software Sigma Plot (SPSS Inc, USA). Os valores são a média \pm erro padrão de três experimentos independentes, realizados em triplicata (n=3).



5.2. Microscopia ótica por coloração de Giemsa

Uma vez confirmada que a resposta das células MCF-7 ao clotrimazol era dependente da dose e do tempo de incubação, resolvemos investigar as alterações morfológicas decorrentes do uso do fármaco. Após tratamento com clotrimazol 50 μ M por 180 minutos, observou-se uma diminuição no tamanho das células e o núcleo de algumas mostrou-se picnótico (indicado por setas pretas), com uma marcante condensação nuclear, como demonstra a Figura 2D, confirmando as alterações morfológicas das células MCF-7 após a incubação com o clotrimazol. Essas alterações nucleares estão muitas vezes associadas à morte celular por apoptose (BURSCH, 2000). Nos controles (Figura 2A e 2B), as células mostram-se normais, sendo que no primeiro grupo não foi adicionado DMSO e no segundo sim. Nota-se que não se observam diferenças morfológicas relevantes entre esses dois grupos. Não foram observadas alterações morfológicas significativas nas células que foram incubadas com clotrimazol 50 μ M por 90 minutos (Figura 2C).

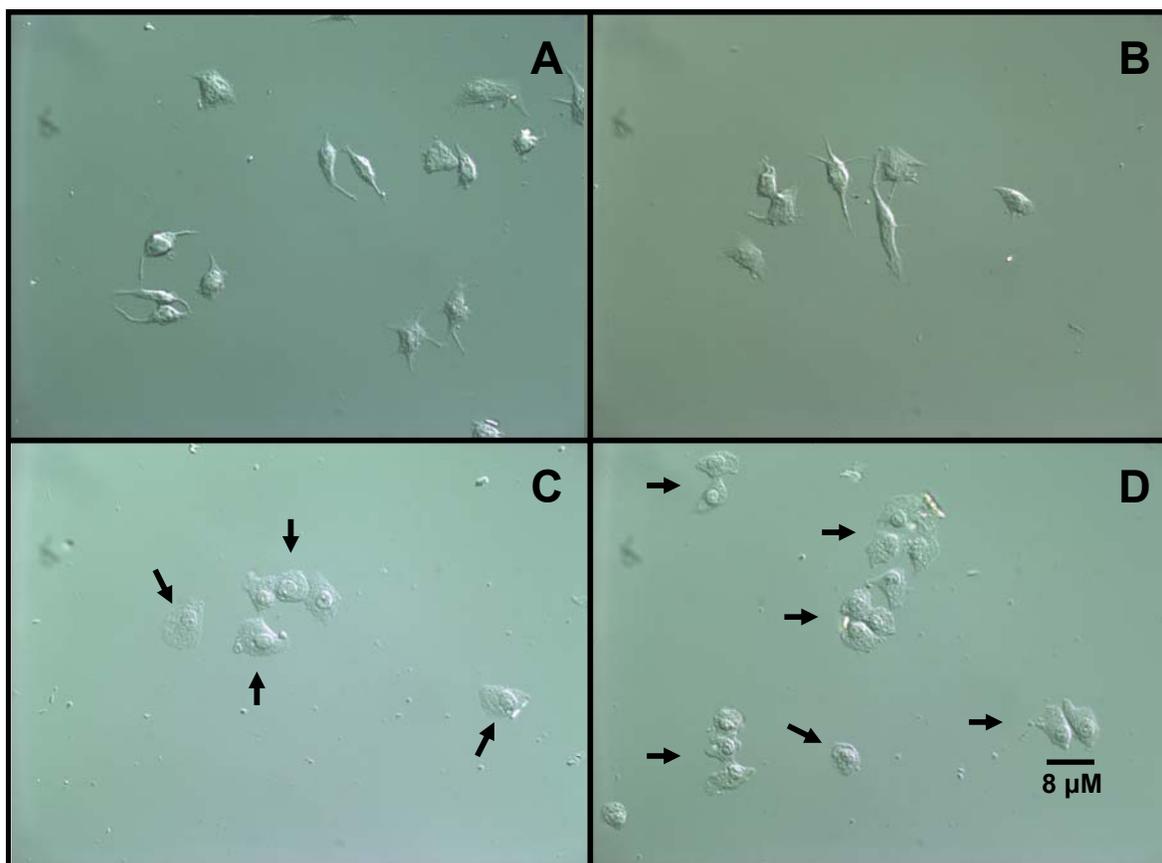
Figura 2. Morfologia das células MCF-7 analisadas através de microscopia ótica (coloração de Giemsa). As células foram cultivadas como descrito em Material e Métodos. A Figura 2A mostra as células incubadas com meio de cultura suplementado por 180 min. A Figura 2B mostra as células incubadas com DMSO 0,5% (controle do solvente) por 180 min. As Figuras 2C e 2D mostram as células tratadas com clotrimazol 50 μ M por 90 min. e 180 min., respectivamente. As setas da Figura 2D indicam a condensação nuclear observada. As Figuras são representações de uma série de três experimentos independentes em que foram analisadas, ao menos, 200 células para cada condição experimental.



5.3. Microscopia ótica de contraste interferencial diferencial de Nomarski (DIC)

Após verificarmos as alterações morfológicas por microscopia ótica (coloração de Giemsa), resolvemos analisar as células MCF-7 (após tratamento com clotrimazol ou DMSO 0,5%) ao microscópio ótico, porém agora por contraste interferencial diferencial de Nomarski (DIC), com o objetivo de verificar alterações na superfície celular resultantes do tratamento com o fármaco por 30 e 180 minutos. Notamos, após 180 minutos de incubação com o fármaco, alterações na superfície celular (Figuras 3C e 3D), tais como perda dos prolongamentos responsáveis pela adesão celular e mudanças da forma celular. Estas alterações morfológicas das células MCF-7 não foram observadas no controle DMSO 0,5% e nas células tratadas com clotrimazol 50 μ M por 30 minutos (Figura 3A e 3B, respectivamente). Pelo menos 200 células de cada preparação foram analisadas ao microscópio ótico. Foram feitos três experimentos independentes para a detecção das alterações celulares. As setas pretas indicam as células com alterações morfológicas e perda dos prolongamentos celulares.

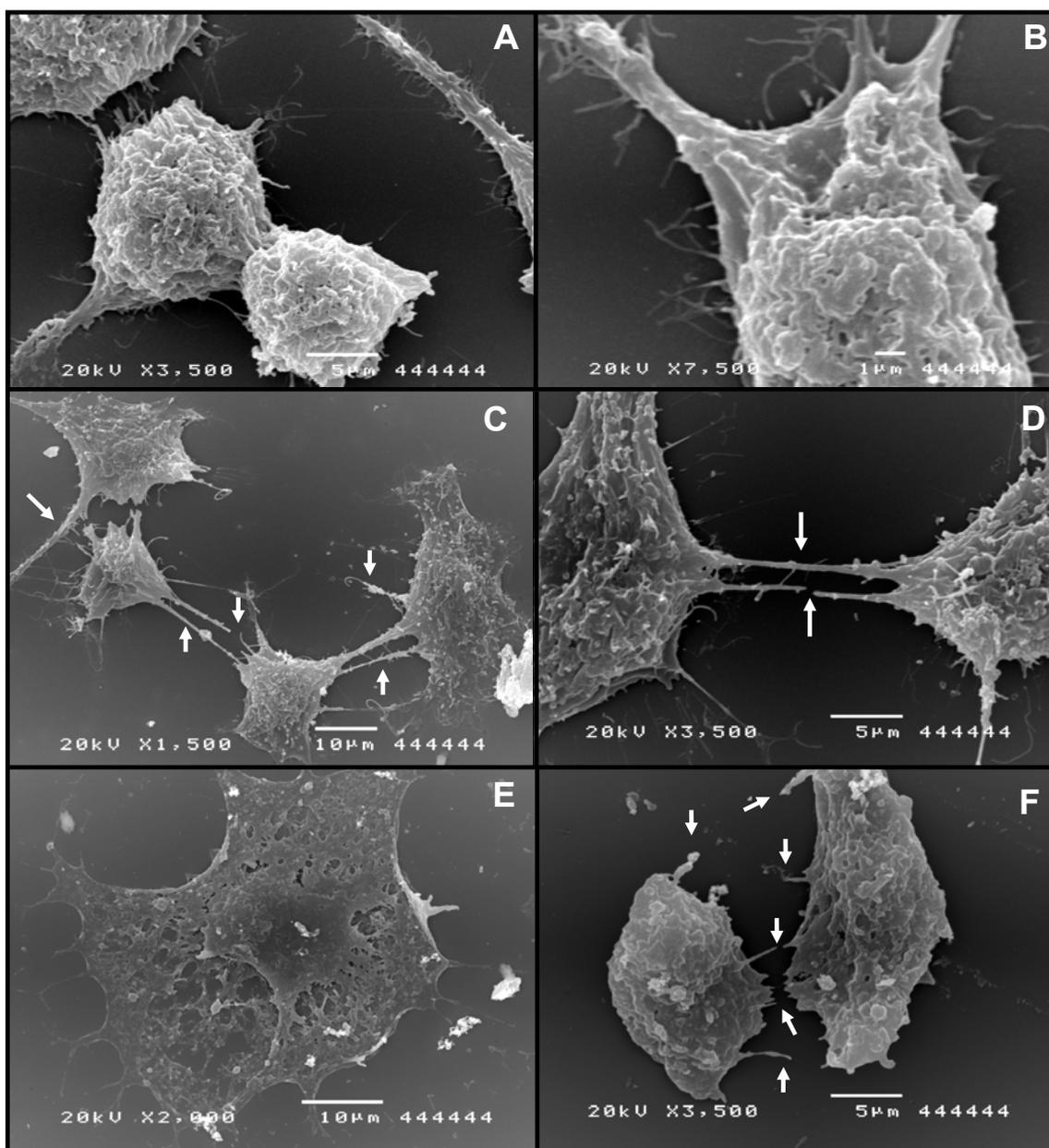
Figura 3. Morfologia das células MCF-7 analisadas através microscopia ótica de contraste interferencial diferencial de Nomarski (DIC). As células foram cultivadas como descrito em Material e Métodos. A Figura 3A mostra as células MCF-7 incubadas com DMSO 0,5% (controle do solvente) por 180 min. A Figura 3B mostra as células incubadas com clotrimazol 50 μ M por 30 min. As Figuras 3C e 3D mostram as células tratadas com clotrimazol 50 μ M por 180 min. As setas das Figuras 3C e 3D indicam as alterações morfológicas observadas. As Figuras são representações de uma série de três experimentos independentes em que foram analisadas, ao menos, 200 células para cada condição experimental.



5.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Após verificarmos as alterações morfológicas causadas pelo clotrimazol por microscopia ótica de contraste interferencial diferencial de Nomaski (DIC), resolvemos analisar as células MCF-7 ao microscópio eletrônico de varredura, com o objetivo de confirmar os resultados obtidos por DIC e procurar novas alterações celulares. Verificamos alterações ultra-estruturais, tais como perda dos prolongamentos responsáveis pela adesão das células ao substrato, assim como perda da integridade da membrana celular, após tratamento com clotrimazol 50 μ M por 30 e 180 minutos (Figuras 4C, 4D e 4E, 4F, respectivamente). Notamos que a microscopia eletrônica de varredura foi capaz de demonstrar alterações morfológicas das células MCF-7 após 30 minutos de incubação com o fármaco, resultado este que não havia sido demonstrado por DIC, devido à sua menor capacidade resolutiva. Também notamos mudanças na forma celular, que se tornou mais arredondada e com menor tamanho, principalmente no tempo de 180 minutos. Não foram notadas mudanças dessa natureza nas células tratadas com DMSO 0,5% por 180 minutos (Figuras 4A e 4B). As setas brancas indicam os locais de perda dos prolongamentos celulares após tratamento com o clotrimazol.

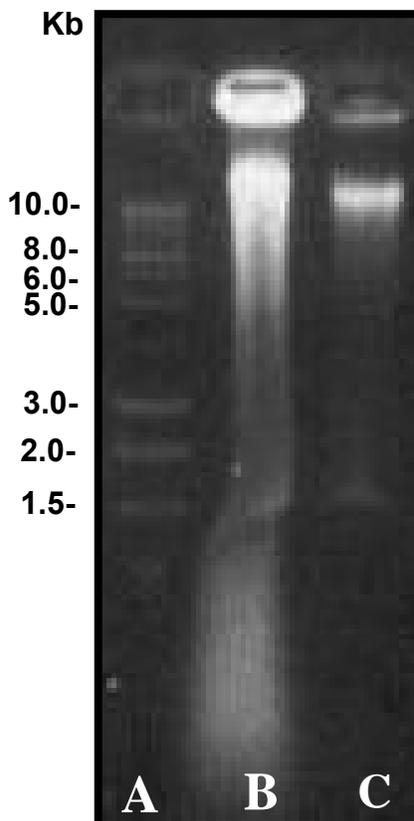
Figura 4. Morfologia das células MCF-7 analisadas por microscopia eletrônica de varredura. A preparação para a microscopia foi feita como descrito em Material e Métodos. As Figuras 4A e 4B mostram as células MCF-7 tratadas com DMSO 0,5% por 180 min., com um aumento de 3500X e 7500X, respectivamente. As Figuras 4C e 4D mostram as células MCF-7 tratadas com clotrimazol 50 μ M por 30 min., com um aumento de 1500X e 3500X, respectivamente. As Figuras 4E e 4F mostram as células MCF-7 tratadas com clotrimazol 50 μ M por 180 min., com um aumento de 2000x e 3500X, respectivamente. As setas das Figuras 4C, 4D, 4E e 4F indicam as alterações morfológicas observadas.



5.5. Extração de fragmentos apoptóticos

Como as alterações morfológicas observadas ao M.O. sugeriam morte celular por apoptose (BURSCH, 2000), resolvemos verificar esta possibilidade. Após tratamento das células com o clotrimazol, procedeu-se à extração dos fragmentos apoptóticos como descrito no item 4.7. Na Figura 5, observamos que não há diferenças entre o controle (Linha B) e o tratado (Linha C), nas condições experimentais descritas, não se observando a presença de bandas de fragmentação do DNA, um marcador muito utilizado para se identificar morte celular por apoptose. Na Linha A observa-se o padrão de peso molecular de “1 Kb ladder” e à esquerda, os respectivos valores (em kb) dos fragmentos de DNA.

Figura 5. Gel de agarose das amostras submetidas ao tratamento com DMSO 0,5% ou clotrimazol 50 μ M por 180 minutos, como descrito em Material e Métodos. Na Linha A observamos o padrão de peso molecular de “1 Kb ladder” e à esquerda, os respectivos valores (em kilobases) dos fragmentos de DNA. Nas linhas B e C observam-se, respectivamente, o controle e o tratado.



5.6. Determinação da atividade das enzimas PFK e aldolase

As células tratadas com clotrimazol 50 μ M ou DMSO 0,5% (Controle) foram lisadas com N_2 líquido e submetidas a centrifugação diferencial em duas forças gravitacionais (27.000 x g por 20 minutos e 120.000 x g por 45 minutos) obtendo cinco frações referentes ao homogeneizado total (HT), ao sedimento e sobrenadante da primeira centrifugação (P1 e S1, respectivamente) e ao sedimento e sobrenadante da segunda centrifugação (P2 e S2, respectivamente). Os resultados das atividades das subfrações HT, S1, P1, S2 e P2 das enzimas PFK e aldolase são mostrados nas Figuras 6 e 7, respectivamente. Os resultados das atividades remanescentes (% controle) na subfração P2 das enzimas PFK e aldolase são mostrados na Figura 8. Nota-se que o clotrimazol alterou de maneira considerável a distribuição subcelular dessas enzimas glicolíticas. Nas Figuras 6 e 7, nota-se que só há diferença significativa da atividade das enzimas PFK e aldolase na subfração P2, sendo que as outras subfrações (HT, S1, P1 e S2) não apresentaram diferenças relevantes ($P < 0,05$, *Teste t de Student* não pareado). Observa-se que após o tratamento das células MCF-7 com clotrimazol, há uma diminuição marcante da atividade da PFK e aldolase na subfração P2, fato não observado nos controles. Analisando a Figura 8, nota-se que a atividade remanescente na subfração P2 foi 16.4 ± 3.6 % e 41.0 ± 15.6 % do controle para PFK e aldolase, respectivamente, quando comparado aos controles ($p < 0,05$, *Teste t de Student* pareado).

Figura 6. Atividade da enzima PFK nas subfrações HT, S1, P1, S2 e P2. O fracionamento subcelular e a mensuração das atividades enzimáticas foram realizados como descrito em Material e Métodos. As barras negras são relativas aos controles (células MCF-7 incubadas com DMSO 0,5% por 30 min.). As barras cinzas são relativas às células MCF-7 incubadas com clotrimazol 50 μ M por 30 min. Os valores são a média \pm erro padrão de três experimentos independentes (* $P < 0,05$, Teste t Student não pareado).

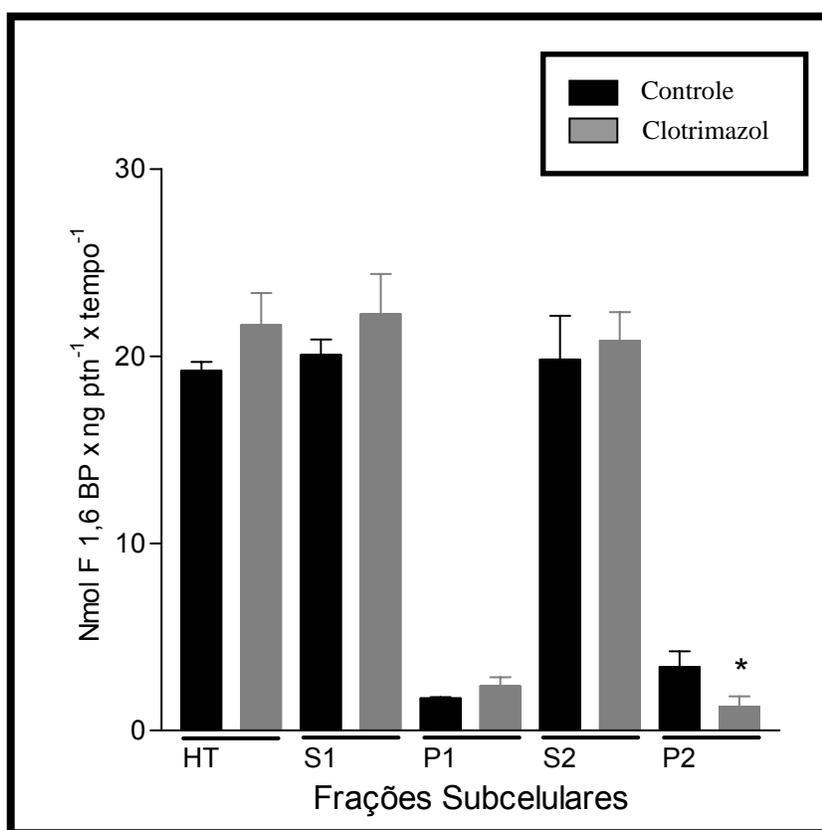


Figura 7. Atividade da enzima aldolase nas subfrações HT, S1, P1, S2 e P2. O fracionamento subcelular e a mensuração das atividades enzimáticas foram realizados como descrito em Material e Métodos. As barras negras são relativas aos controles (células MCF-7 incubadas com DMSO 0,5% por 30 min). As barras cinzas são relativas às células MCF-7 incubadas com clotrimazol 50 μ M por 30 min. Os valores são a média \pm erro padrão de três experimentos independentes (* $P < 0,05$, Teste t Student não pareado).

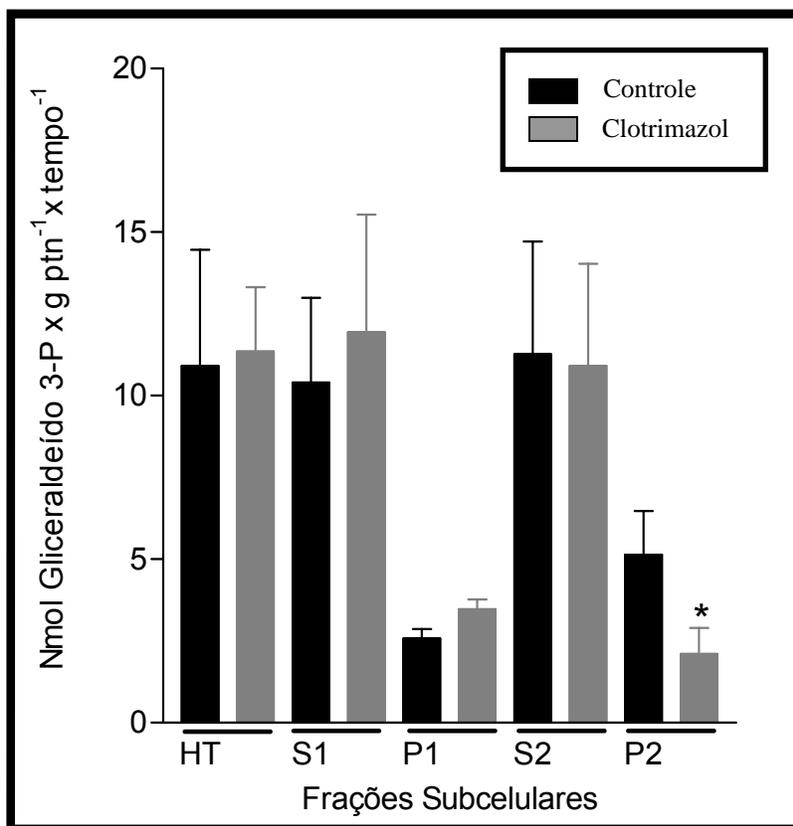
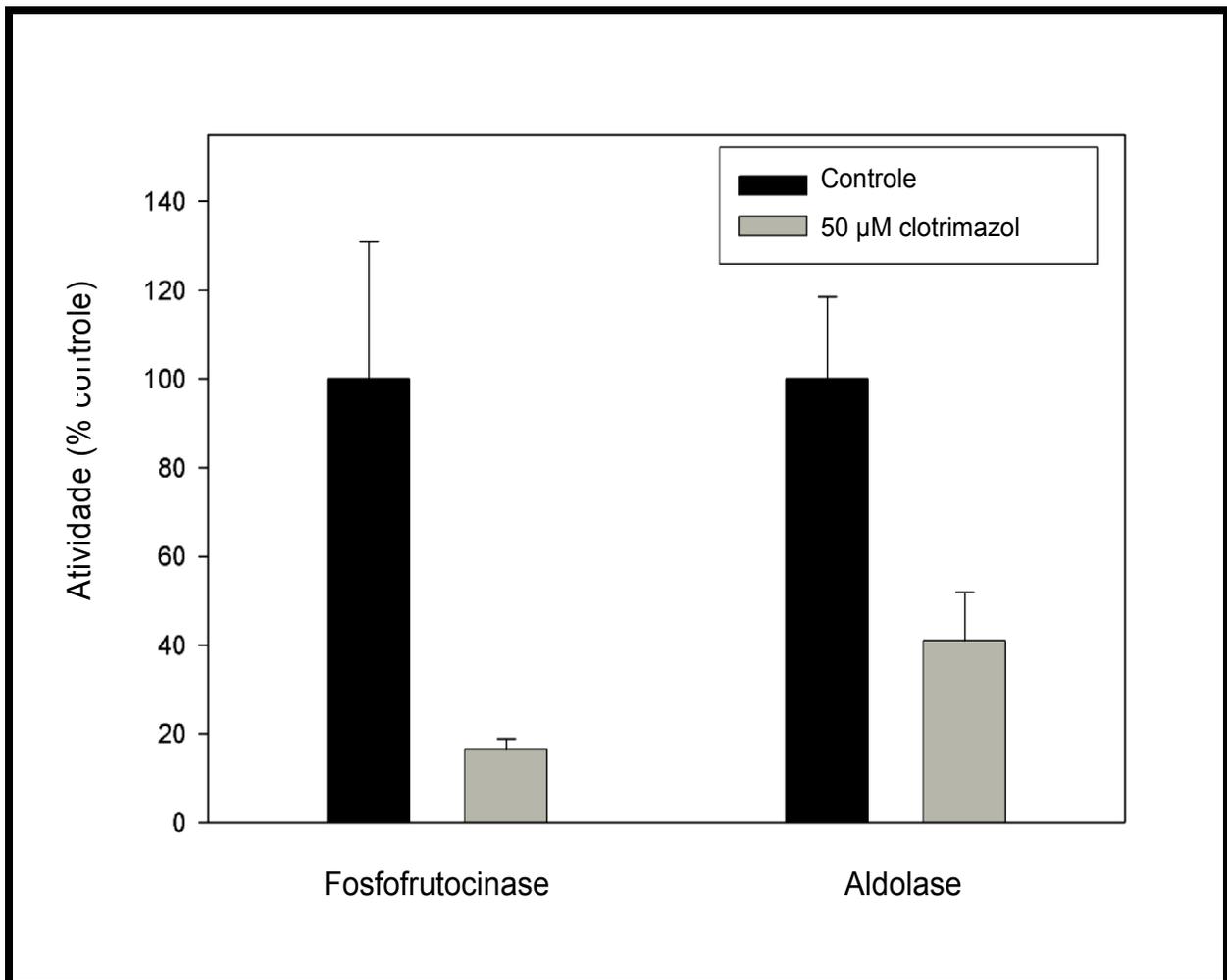


Figura 8. Atividade das enzimas PFK e aldolase na subfração enriquecida com actina-f, em células MCF-7. O fracionamento subcelular e a mensuração das atividades enzimáticas foram realizados como descrito em Material e Métodos. As barras negras são relativas aos controles (células MCF-7 incubadas com DMSO 0,5% por 30 min). As barras cinzas são relativas às células MCF-7 incubadas com clotrimazol 50 μ M por 30 min. Os valores são a média \pm erro



5.7. Western Blot das subfrações HT, S1, P1, S2 e P2

Após avaliar a distribuição intracelular da atividade das enzimas fosfofrutocinase e aldolase em cultura de células MCF-7, tratadas com o clotrimazol, resolvemos identificar se havia mudanças na localização da enzima fosfofrutocinase com o citoesqueleto (actina), decorrentes do uso do fármaco, através de Western Blot. A Figura 9 mostra o resultado do Western Blot das subfrações HT, S1, P1, S2 e P2 (controle e tratado com clotrimazol) que foram identificadas com anticorpos anti-actina e anti-fosfofrutocinase, respectivamente. Ao lado de cada marcação estão os padrões purificados (PP) de cada uma das proteínas.

As bandas das subfrações obtidas (identificação da PFK e Actina) foram quantificadas por densitometria e os resultados foram expressos na forma da divisão das subfrações solúveis (S1 e S2) pelas subfrações sedimentadas (P1 e P2), obtendo-se as relações S1/P1 e S2/P2. Os resultados das relações podem ser observados na Figura 10. Nota-se que após o tratamento com 50µM de clotrimazol, há um aumento significativo das relações S1/P1 e S2/P2 para PFK, demonstrando que há variações no conteúdo de fosfofrutocinase dessas subfrações, embora não tenham sido encontradas diferenças significativas nessas relações para actina (* $P < 0,05$, *Teste t de Student* não pareado).

Figura 9. Western Blot das subfrações HT, S1, P1, S2 e P2 (controle e clotrimazol) identificadas através de anticorpos anti-actina e anti-fosfofrutocinase, respectivamente. Ao lado de cada marcação estão os padrões purificados de cada uma das proteínas. Foram utilizadas 50µg de proteína obtidas do Fracionamento subcelular, como descrito em Material e Métodos.

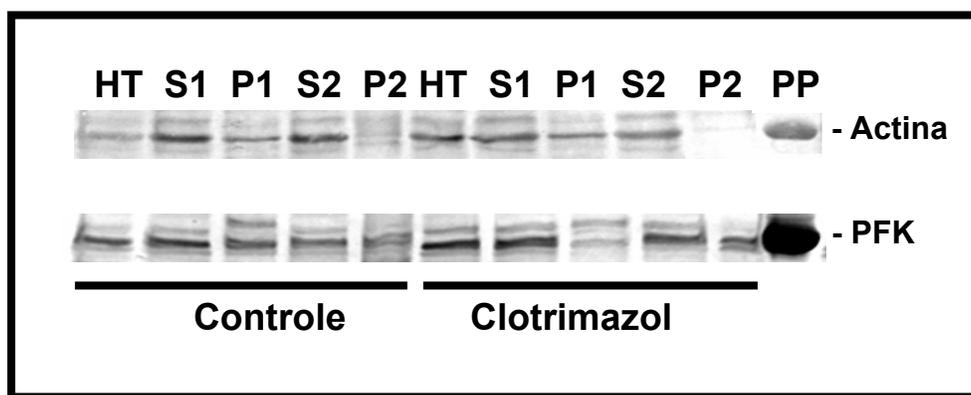
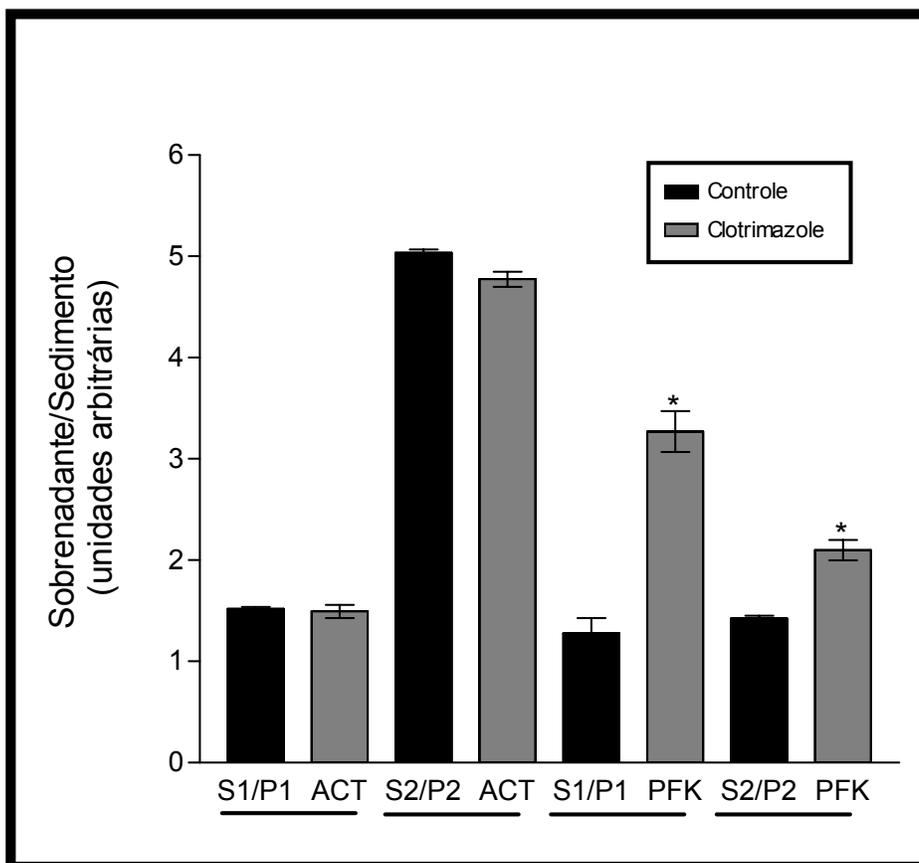


Figura 10. Relação Sobrenadante/ Sedimento (S1/P1 e S2/P2) para actina e PFK. As bandas das subfrações (PFK e Actina) foram quantificadas por densitometria utilizando o software Scion Image (Scion Co, Frederick, Maryland, USA) e os resultados foram expressos na forma da divisão das subfrações solúveis (S1 e S2) pelas subfrações sedimentadas (P1 e P2), obtendo-se as relações S1/P1 e S2/P2 (* P<0,05, Teste t de Student não pareado).



5.8. Imunocitoquímica: Co-localização da enzima PFK e Actina

Após a realização do Western Blot, ainda na tentativa de identificar se havia mudanças na interação da enzima fosfofrutocinase com o citoesqueleto (actina), realizamos a co-localização da enzima PFK (localizada com anticorpo conjugado a FITC) e da actina F (localizada com anticorpo conjugado a Faloidina-TRITC) em células MCF-7 tratadas com clotrimazol e DMSO, de acordo com a metodologia descrita no item 4.13. As células foram analisadas por microscopia de imunofluorescência e os resultados são mostrados na Figura 11, Painéis A, B, C e D. Esta figura mostra a marcação para actina F e PFK nos controles (Painel A e B, respectivamente) e após 180 minutos de incubação com clotrimazol 50 μ M (Painel C e D, respectivamente).

A sobreposição das fluorescências do TRITC e FITC (Figura 12, Painéis A, B, C, D e E) foram analisadas pela Correlação de Pearson e os resultados das incubações por diferentes tempos (30, 60, 120 e 180 minutos) com o clotrimazol são apresentados na Figura 13. A Correlação de Pearson representa a capacidade de sobreposição de duas marcações diferentes para uma mesma célula, em que as imagens produzidas pelas marcações serão co-localizadas e transformadas em um índice de correlação que pode variar de 1 (quando as imagens se sobrepõem completamente) a -1 (em que as imagens não se sobrepõem). Nota-se que há uma diminuição significativa da Correlação de Pearson (unidades arbitrárias) após o tratamento das células com o clotrimazol por 120 e 180 minutos ($P < 0,01$, ANOVA bicaudal), sugerindo que este fármaco induz a dissociação da PFK em relação a actina constituinte do citoesqueleto.

Figura 11. Co-localização da enzima PFK e actina-f em células MCF-7. Células MCF-7 (controle) foram incubadas com DMSO 0,5% por 180 min., como mostram os painéis A e B, respectivamente. Nos painéis C e D são mostradas as células que foram tratadas com clotrimazol 50 μ M por 180 min. As células foram então marcadas conforme descrito em Material e Métodos, sendo a localização da PFK obtida através da conjugação do anticorpo anti-PFK ao FITC e da actina-f obtida através da conjugação do anticorpo anti-actina-f ao TRITC. As marcações foram analisadas por microscopia de imunofluorescência, em que a actina-f (TRITC) emite uma fluorescência vermelha (Painéis A e C) e a PFK (FITC) emite uma fluorescência verde (Painéis B e D).

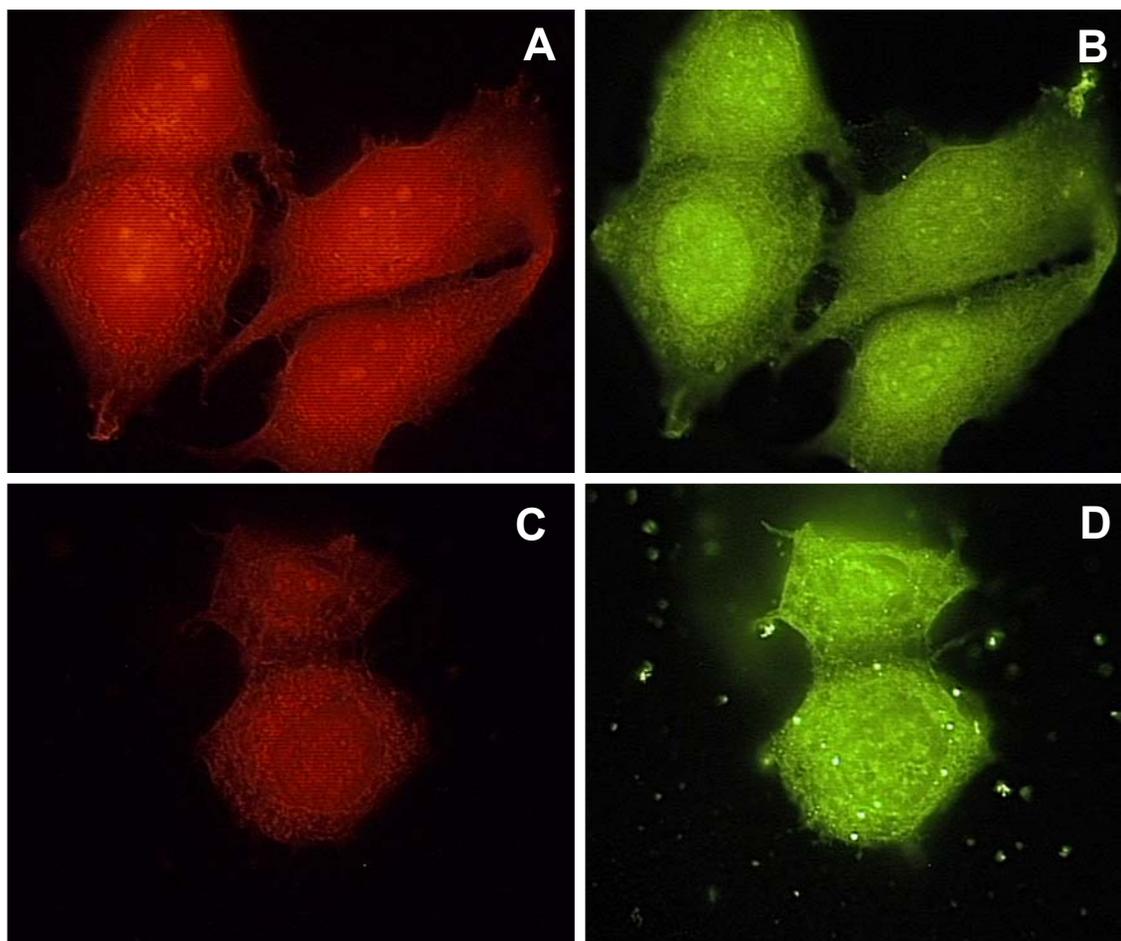


Figura 12. Sobreposição das fluorescências do TRITC (actina) e FITC (PFK) em células MCF-7, tratadas com DMSO e clotrimazol por diferentes tempos. No painel A são mostradas as células tratadas com DMSO 0,5% por 180 min. Nos painéis B, C, D e E são mostradas as células tratadas com clotrimazol 50 μ M por 30, 60, 120 e 180 min., respectivamente.

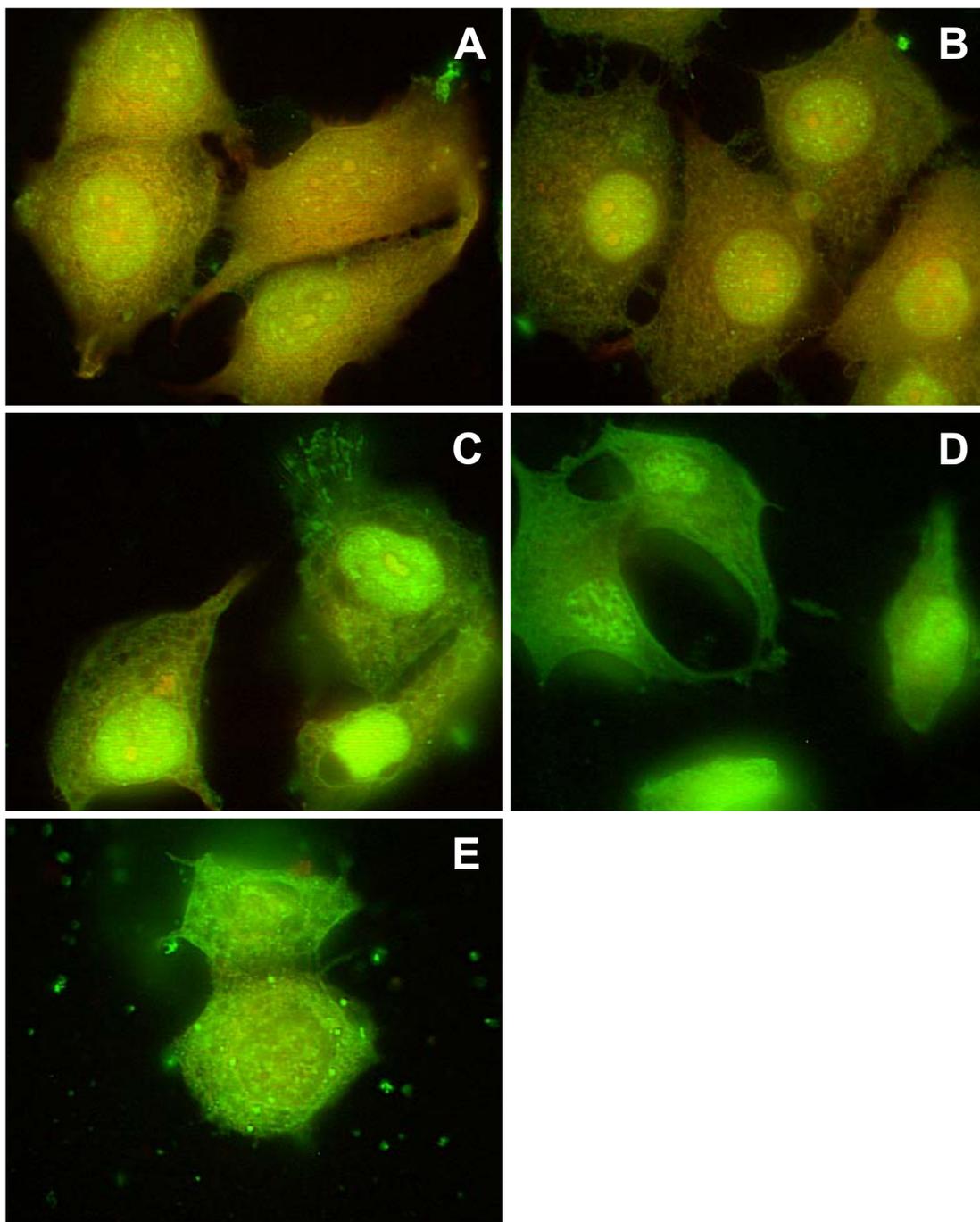
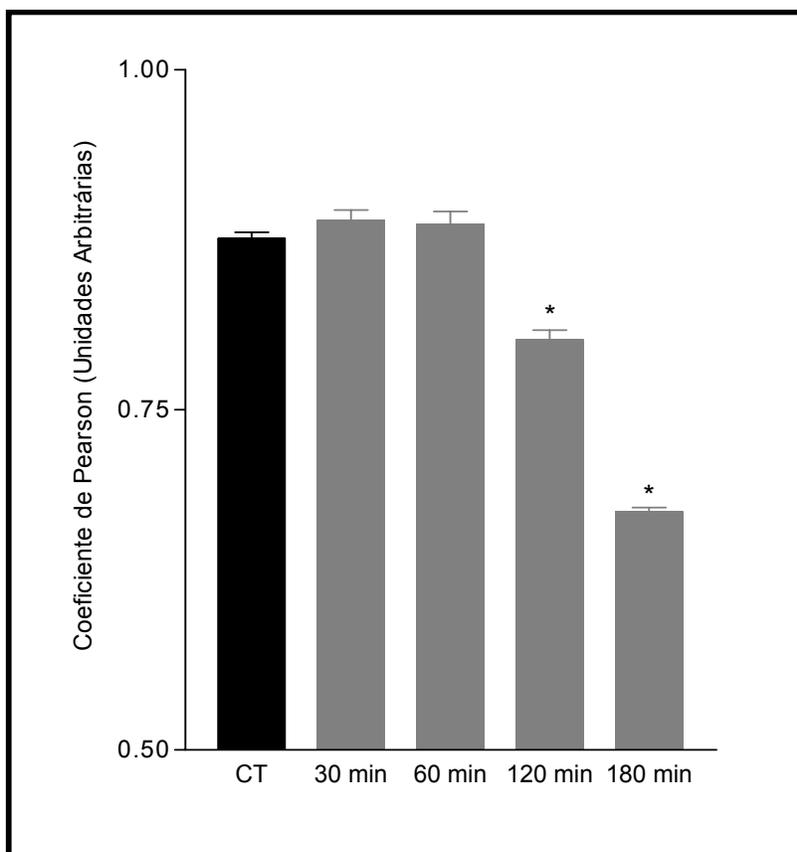


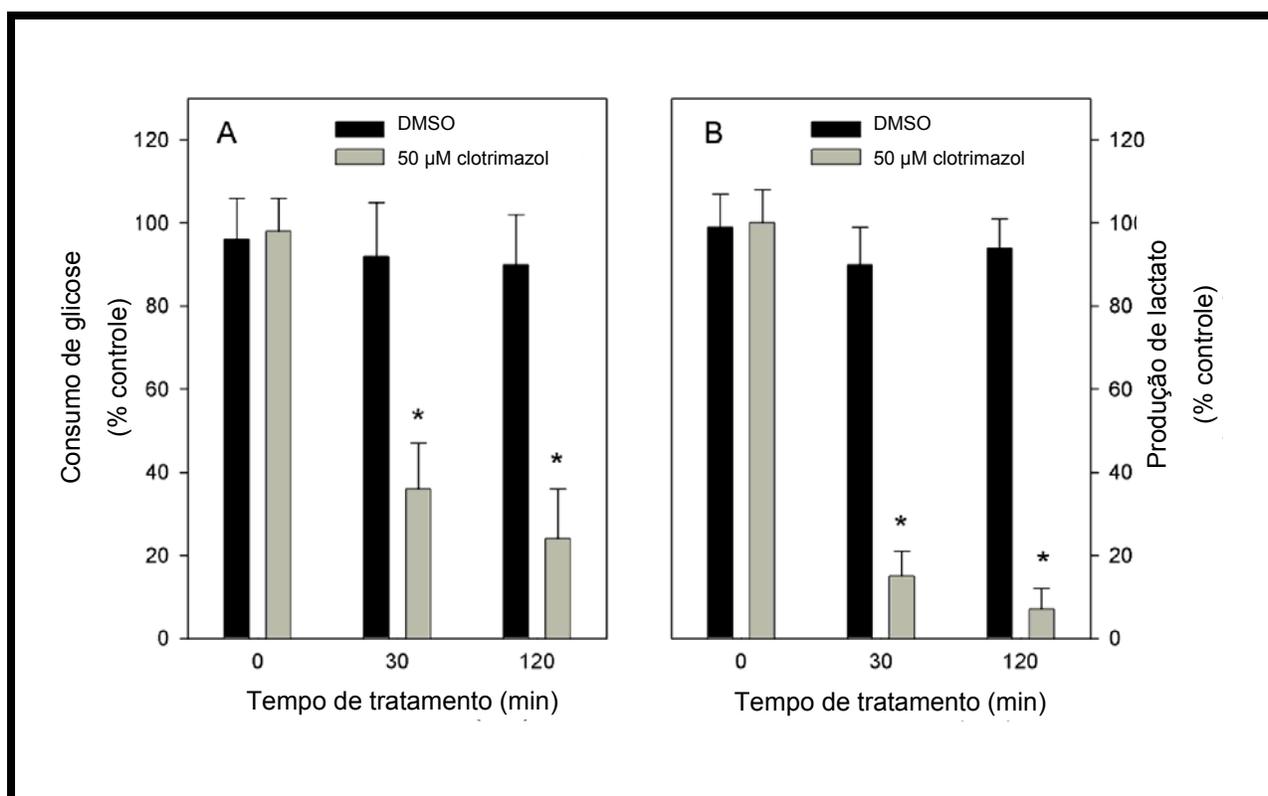
Figura 13. Correlação de Pearson da sobreposição das marcações para actina-f e PFK em células MCF-7. Células MCF-7 foram incubadas com DMSO 0,5% por 180 min. ou clotrimazol 50 μ M por 30, 60, 120 e 180 min (Figura 12, painéis A, B, C, D e E, respectivamente) e marcadas como descrito em Material e Métodos. A Correlação de Pearson da sobreposição das fluorescências foi analisada como descrito em Material e Métodos. Os valores são a média \pm erro padrão de, ao menos, três experimentos (* $P < 0,01$, ANOVA bicaudal).



5.9. Dosagem do consumo de glicose e produção de lactato

Uma vez que a dissociação da PFK do citoesqueleto está associada à uma diminuição da via glicolítica (PENSO e BEITNER, 2002 b), resolvemos medir a taxa do consumo de glicose e produção de lactato pelas células tratadas ou não com clotrimazol 50 μ M por 30 e 120 minutos. O clotrimazol promoveu uma diminuição de ambas as taxas (glicose e lactato), nas células tratadas com o clotrimazol por 30 e 120 minutos, quando comparado com o controle DMSO 0,5% (Figura 14). As células tratadas com DMSO mantiveram as mesmas taxas de consumo de glicose (Painel A) e produção de lactato (Painel B) após 30 e 120 minutos de tratamento (Figura 14, barras pretas). Entretanto, as células tratadas com o clotrimazol apresentaram uma redução a 36 ± 11 e $24 \pm 12\%$ no consumo de glicose (Figura 14A, barras cinza) e 15 ± 6 e $7 \pm 5\%$ na produção de lactato (Figura 14B, barras cinza) após 30 e 120 minutos de tratamento, respectivamente ($P < 0,05$, ANOVA bicaudal). As diferenças entre os grupos tratados com o clotrimazol por 30 e 120 minutos não foram estatisticamente significativas para o consumo de glicose e produção de lactato ($P > 0,05$, ANOVA bicaudal, Pós-teste de Student-Newman-Keus).

Figura 14. Dosagem do consumo de glicose e produção de lactato pelas células MCF-7. Células MCF-7 foram incubadas por diferentes períodos, indicados na abcissa, em presença de DMSO 0,5% (barras negras) ou clotrimazol 50 μ M (barras cinzas) como descrito em Material e Métodos. O consumo de glicose (Painel A) e a formação de lactato (Painel B) são representados como a percentagem \pm erro padrão das células controle (sem nenhum tipo de tratamento). As taxas absolutas foram $2,4 \pm 0,2$ nmol/ (h x 10^5 células) e $1,1 \pm 0,1$ nmol/ (h x 10^5 células) para o consumo de glicose e formação de lactato, respectivamente (* $P < 0,05$, ANOVA bicaudal).



6. Discussão

Os resultados apresentados neste trabalho demonstram que o derivado imidazólico, clotrimazol, induziu uma diminuição significativa da viabilidade das células de carcinoma mamário humano da linhagem MCF-7, alterando sua morfologia e funções celulares normais. Nossos resultados demonstram que o clotrimazol induziu a dissociação da PFK e aldolase da actina constituinte do citoesqueleto, em células MCF-7, submetidas ao tratamento com o fármaco (Figuras 6, 7 e 8). Concernente a esses resultados, Penso e Beitner (2002a, 2002b) já haviam demonstrado que o clotrimazol induziu a dissociação dessas enzimas em outras linhagens celulares cancerígenas. Esses autores haviam demonstrado que o clotrimazol seria capaz de diminuir o fluxo glicolítico através da dissociação das enzimas glicolíticas, além da diminuição de dois ativadores da mesma via, glicose-1,6-bisfosfato e frutose-1,6-bisfosfato (PENSO e BEITNER, 2002b). Nosso grupo já havia demonstrado que a ligação da enzima PFK ao citoesqueleto é uma importante via de regulação da ativação da glicólise via hormônios (ALVES e SOLA-PENNA, 2003; SILVA *et. al.*, 2004) e em tecidos cancerígenos (EL-BACHA e SOLA-PENNA, 2003). No presente trabalho, nossas observações nos permitiram sugerir que a glicólise, nas células MCF-7, é inibida pelo uso do clotrimazol, uma vez que a mais importante enzima regulatória da glicólise, a PFK, está desassociada do citoesqueleto (Figuras 6 e 8).

Essa dissociação também é observada através de imunocitoquímica (Figuras 11, 12 e 13). No entanto, através dessa metodologia, só é possível identificar essa dissociação após 120 minutos de incubação com clotrimazol 50 μ M. Isso é perfeitamente compreensível devido à diferente acurácia exibida pelos dois métodos, sendo que a determinação da atividade enzimática por Sistema Acoplado-Espectrofotometria é um método muito mais preciso, como já foi demonstrado anteriormente (ALVES e SOLA-PENNA, 2003; EL-BACHA e SOLA-PENNA, 2003). Na verdade, os experimentos apresentados nas Figuras 6, 7 e 8 foram realizados por períodos mais longos de incubação com o clotrimazol (Resultados não mostrados). No entanto, nesses ensaios, 30 minutos foram suficientes para que se atingisse o efeito máximo desse fármaco. Esses resultados também foram observados ao se medir a taxa do consumo de glicose e produção de lactato (Figuras 14 (A) e 14 (B), respectivamente).

Esses experimentos revelaram que 30 minutos de tratamento com o clotrimazol foram suficientes para se atingir o efeito máximo do fármaco sobre a glicólise.

A dissociação das enzimas glicolíticas em relação ao citoesqueleto, também pôde ser observada através de Western Blot das subfrações das células tratadas com o clotrimazol. Ao observar as Figuras 9 e 10, notamos que o fármaco induziu a dissociação da PFK do citoesqueleto das células MCF-7, uma vez que houve um aumento do conteúdo enzimático nas subfrações S1 e S2 (Sobrenadantes), em detrimento das subfrações P1 e P2 (Sedimentos), fato este caracterizado pelo aumento das relações S1/P1 e S2/P2. Com isso, chegou-se à conclusão que a PFK que estava ligada a actina (antes do tratamento com o clotrimazol), passou a pertencer à fração solúvel e, portanto, dissociada da actina constituinte do citoesqueleto (após o tratamento com o fármaco). Não foram notadas alterações significativas do conteúdo de actina total.

Ao observar as Figuras 6, 7 e 8, notamos que houve uma diminuição significativa das atividades das enzimas PFK e aldolase nas subfrações P2, enquanto nas outras subfrações (HT, S1, S2 e P1) não houveram alterações dignas de nota. Realmente, esse dois fatos se complementam, uma vez que Somero e Hand (1990) descreveram que a enzima PFK tem sua atividade máxima quando está associada aos filamentos de actina constituintes do citoesqueleto. A aldolase tem sua atividade máxima quando está ligada a actina ou a PFK associada a actina (RAIS e col., 2000; WALSH e col., 1977; ARNOLD e PETTE, 1970). Logo, se o clotrimazol causa uma perturbação na organização do citoesqueleto, é muito lógico se pensar que ele irá modificar o padrão de ligação da PFK e aldolase a actina, comprometendo a capacidade funcional dessas enzimas em realizar suas funções durante a glicólise. De posse de todos esses dados, podemos sugerir o mecanismo de ação do clotrimazol. O fármaco estaria perturbando a organização do citoesqueleto e, conseqüentemente, alterando a ligação e atividade da PFK e aldolase, modificando a atuação dessas enzimas durante a glicólise e, com isso, inibindo o fluxo glicolítico. Sabemos que a inibição da via glicolítica causa um decréscimo da síntese de ATP, que é a molécula responsável pela manutenção da maioria dos eventos intracelulares. Através deste mecanismo, o clotrimazol seria capaz de inibir o crescimento das células MCF-7 (Figuras 1 e 2) por bloquear a síntese de ATP intracelular, culminando com a morte das células de carcinoma mamário humano.

Corroborando com estas conclusões, alguns autores descrevem que ambos os mecanismos de morte celular (apoptose e necrose) têm sido associados a um decréscimo do fluxo da via glicolítica (PENSO e BEITNER, 2002 a; GONIN-GIRAUD e col., 2002; GARLAND e HALESTRAP, 1997). Além disso, estudos do metabolismo celular durante a apoptose em linhagens celulares dependentes de interleucina-3, reportaram que a ativação do fluxo glicolítico está relacionada à sobrevivência celular (HALESTRAP, 1997). A microscopia óptica por Coloração de Giemsa demonstrou que as células que receberam tratamento com o clotrimazol exibiram uma marcante condensação nuclear (Figura 2). Essas alterações morfológicas nucleares estão muitas vezes associadas à morte celular por apoptose (BURSCH, 2000). De qualquer forma, não podemos afirmar que ocorra apoptose, pelo menos nas condições experimentais realizadas (180 minutos de incubação com o clotrimazol, como descrito no item 4.7), uma vez que, após o tratamento com o fármaco e posterior tentativa de extração dos corpos apoptóticos, não foi encontrado nenhuma banda de fragmentação do DNA, marcador muito utilizado para se identificar morte celular por apoptose. De acordo com este resultado, não podemos afirmar que a condensação nuclear observada por microscopia óptica, nas células tratadas com o clotrimazol, seja relacionada à morte celular por apoptose. Porém, deve-se salientar que este foi um resultado preliminar, e, portanto, deve-se repetir este experimento, variando-se os tempos de incubação e as concentrações do fármaco usadas. Além disso, seria interessante utilizar outras técnicas para detecção da ocorrência de apoptose, tais como TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick End Labeling), ligação da anexina V e medição da atividade das caspases, como forma de confirmação da hipótese levantada, através de mais de uma metodologia.

Entretanto, ao se observar a Figura 1B, nota-se que há morte celular em apenas 30 minutos de incubação com 50 μ M do fármaco, e supõe-se que ocorra morte por necrose das células MCF-7, após o tratamento. Este fato já foi observado por outros autores que descrevem alterações ultra-estruturais por microscopia eletrônica de varredura, como por exemplo, alterações a forma celular e perda da integridade da membrana citoplasmática (PENSO e BEITNER, 2002a).

Por outro lado, as alterações morfológicas observadas após o tratamento das células MCF-7 com o clotrimazol, por microscopia óptica após coloração de Giemsa (Figura 2), microscopia óptica de Contraste Interferencial Diferencial (Figura 3) e microscopia eletrônica de

varredura (Figura 4) sugerem que essa substância altere a organização normal do citoesqueleto. Na verdade, as Figuras 11, 12 e 13 revelam que o tratamento com o clotrimazol induz a um rearranjo do citoesqueleto (actina). Esse fenômeno ocorre, provavelmente, pela despolimerização da actina após o tratamento das células MCF-7 com o clotrimazol. Alguns estudos demonstram que, mesmo eventos apoptóticos iniciais, são correlacionados com a despolimerização da actina F, em diversas linhagens celulares, inclusive carcinoma mamário humano (BURSCH, 2000). Além disso, tem sido demonstrado que a apoptose em células MCF-7, requer períodos maiores de tempo para ocorrer, quando comparado com o modelo de apoptose da linhagem celular HL60 (Kong Thoo e col., 2003). Esse fato pode explicar a falta de fragmentação após 3 horas de incubação com clotrimazol 50 μ M (Figura 5). Com base nesses resultados e observações, poderíamos sugerir que o clotrimazol esteja induzindo apoptose nas células MCF-7, além de necrose como já descrito acima.

O clotrimazol já foi proposto como um fármaco promissor no tratamento do câncer (PENSO e BEITNER, 2002a, 2002b). O mecanismo de ação dessa droga é atribuído à sua atividade como antagonista de calmodulina. Na verdade, os antagonistas de calmodulina são uma nova geração de fármacos com um largo espectro de aplicações (KONG THOO e col., 2003). Eles são efetivos no tratamento de queimaduras de pele e rachaduras produzidas pelo frio e atenuam as modificações da pele induzidas por radiação UV. São descritos também como fármacos promissores no tratamento de carcinoma de pulmão e melanoma (para maiores esclarecimentos ver BEITNER, 1998). A IC_{50} do clotrimazol encontrada em nossos experimentos não são iguais àquela encontrada para a atividade como antagonista de calmodulina desse fármaco, que é aproximadamente 20 μ M (Nós encontramos 80 μ M) (HEGEMANN e col., 1993; MAC NEIL e col., 1993). Esse fato não descarta completamente a possibilidade desse mecanismo de ação em nosso sistema. Na verdade, os efeitos do clotrimazol são compatíveis com algumas propriedades dos antagonistas de calmodulina como, por exemplo, a deslocalização das enzimas glicolíticas (PENSO e BEITNER, 2002a), a despolimerização da actina F (MANNHOLD e TIMMERMAN, 1992) e a indução de apoptose em células de carcinoma mamário de rato (PIAZZA e WALLACE, 1985). De qualquer forma, deve-se pesquisar mais profundamente esse mecanismo de ação do clotrimazol, para que se confirme nossa hipótese.

7. Conclusão

Concluimos com este trabalho que o clotrimazol atua como um agente inibidor da atividade da PFK, interferindo de alguma forma na ligação desta enzima aos filamentos de actina. Isto resulta na diminuição de sua atividade e, como consequência, há uma redução do fluxo glicolítico, gerando um decréscimo na síntese de ATP, contribuindo para a diminuição da viabilidade das células MCF-7 de carcinoma mamário humano. Este trabalho revela um diferente mecanismo de ação do antifúngico clotrimazol e abre uma nova área de pesquisa para a descoberta de novos fármacos antineoplásicos que funcionem como moduladores da via glicolítica, sendo o clotrimazol um promissor agente no tratamento do câncer de mama. Além disso, os resultados aqui apresentados sugerem que a avaliação da co-localização da PFK e actina-F pode ser empregada como um marcador da disfunção das células cancerígenas, que foram submetidas à ação de drogas anti-câncer. Desta forma, fornecemos uma nova aplicação da imunocitoquímica como uma ferramenta de avaliação terapêutica da ação de fármacos antineoplásicos, podendo, desta maneira, acompanhar a evolução do tratamento do paciente.

Referências Bibliográficas

Aktas H, Fluckiger R, Acost JA, Savage JM, Palakurthi SS, Halperin JA (1998) Depletion of intra cellular calcium stores, phosphorylation of eIF2 α , and sustained inhibition of translation initiation mediate the anticancer effects of clotrimazole. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 8280-8285.

Alves GG, Sola-Penna M (2003) Epinephrine modulates cellular distribution of muscle phosphofructokinase. *Mol. Genet. Metab.* 78: 302-306.

Arnold H, Pette D (1968) Binding of glycolytic enzymes to structure proteins of the muscle. *Eur. J. Biochem.* 6(2): 163-171.

Arnold H, Pette D (1970) Binding of aldolase and triosephosphate deshydrogenase to F-actin and modificatios of catalytic properties of aldolase. *Eur. J. Biochem.* 15: 360-366.

Baggeto LG (1992) Deviant Energetic Metabolism of Glycolytic Cancer Cells. *Biochimie* 74: 959-974.

Beckener ME, Stracke ML, Liotta LA, Schiffmann E (1990) Glycolysis as primary energy source in tumour cell chemotaxis. *Natl. Cancer Inst.*, 82(23): 1836-1840.

Beitner R (1993) Control of glycolytic enzymes through binding to cell structures and by glucose-1,6-bisphosphate under different conditions. The role of calcium and calmodulin. *Int. J. Biochem.* 25: 297-305.

Beitner R (1998) Calmodulin antagonists and cell energy metabolism in health and disease. *Mol. Genet. Metab.* 64: 161-168.

Ben-Ze'ev A (1985) The cytoskeleton in cancer cells. *Acta Biochim. Biophys.* 780: 197-212.

Ben-Ze'ev A (1986) Regulation of cytoskeletal protein synthesis in normal and cancer cells. *Cancer Rev.* 4: 91-116.

Berridge MJ (1993) Inositol trisphosphate and calcium signaling. *Nature* 361: 315-325.

Birrell GB, Hedberg KK, Habliston DL, Griffith OH (1990) Protein kinase C inhibitor H-7 alters the actin cytoskeleton of cultured cells. *J. Cel. Physiol.* 141: 74-84.

Bossche HV, Marichal P, Gorrens J, Coene MC, Willemses G, Bellens D, Roels I, Moercels H, Janssen PA (1989) Biochemical approaches to selective antifungal activity. Focus on azole antifungals. *Mycoses* 52: 32-35.

Brugnara C, Franceschi L, Alper SL (1997) The antifungal imidazole clotrimazole and its major *in vivo* metabolite are potent blockers of calcium-activated potassium channel in murine erythroleukemia cells. *J. Membr. Biol.* 157: 177-191.

Büchel KH, Draber W, Regel E, Plempel M (1972) Synthesis and properties of clotrimazole and other antimycotic 1- triphenylmethylimidazoles *Arznein. Forsch.* 22:1260- 1272.

Bursch W, Hochegger K, Török L, Marian A, Ellinger A, Hermann RS (2000) Autophagic and apoptotic types of programmed cell death exhibit different fates of cytoskeletal filaments. *J. Cell Sci.* 113: 1189-1198.

Chen-Zion M, Livnat T, Beitner R (1992a) Insulin rapidly stimulates binding of phosphofructokinase and aldolase to muscle cytoskeleton. *Int. J. Biochem.* 24(5):821-6.

Chen-Zion M, Bassukevitz Y, Beitner R (1992b) Sequence of Insulin Effects on Cytoskeletal and Cytosolic Phosphofructokinase, Mitochondrial Hexocinase, Glucose-1,6-bisphosphate and Fructose-2,6-bisphosphate Levels, and the Antagonistic Action of Calmodulin Inhibitors, in Diaphragm Muscle. *Int. J. Biochem.* 24(10): 1661-1667.

Clarke FM, Masters CJ (1975) On the association of glycolytic enzymes with structural proteins of skeletal muscle. *Acta Biochim. Biophys.* 381: 37-46.

Clarke FM, Morton DJ (1982) Glycolytic enzyme binding in fetal brain – the role of actin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 109(2): 388-393.

Clegg JS (1992) Cellular Infrastructure and Metabolic Organization. Em: *Current Topics in Cellular Regulation* Stadtman Er e Chock PB (eds) vol 33 pp 3-14 Academic Press, Inc. San Diego, CA, USA.

El-Bacha T, Sola-Penna M (2003) *Alterações no metabolismo de células neoplásicas. Em: Hormônios e Metabolismo: Integração e correlações clínicas*, Da Poian, A.T. e Carvalho-Alves, P.C. (eds), Atheneu, Rio de Janeiro: 319-322.

El-Bacha T, Freitas MS, Sola-Penna M (2003) Cellular distribution of phosphofrutokinase activity and implications to metabolic regulation in human breast cancer. *Mol. Genet. Metab.* 79: 294-299.

Freed BM, Lempert N, Lawrence DA (1989) The inhibitory effects of *N*-ethylmaleimide, colchicine and cytochalasins on human T-cell functions. *Int. J. Immunopharmacol.* 11: 459-465.

Friedman E, Verderame M, Winawer S, Pollack R (1984) Actin cytoskeletal organization loss in the benign-to-malignant tumor transition in cultured human colonic epithelial cells. *Cancer Res.* 44: 3040-3050.

Gabbiani G, Kocher O (1983) Cytocontractile and cytoskeletal elements in pathologic processes: pathogenetic and diagnostic value. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 107: 622-625.

Garland JM, Halestrap A (1997) Energy metabolism during apoptosis. Bcl-2 promotes survival in hematopoietic cells induced to apoptose by growth factor withdrawal by stabilizing a form of metabolic arrest. *J. Biol. Chem.* 272: 4680-88.

Giemsa G (1926) *Arch. Schiffs. Trop.*, 30: 334.

Glass-Marmor L, Penso J, Beitner R (1999) Ca⁺⁺ induced changes in energy metabolism and viability of melanoma cells. *Br. J. Cancer* 81(2): 219-224.

Gonin-Giraud S, Mathieu A-L, Diocou S, Tomkowiak M, Delorme G, Marvel J (2002) Decreased glycolytic metabolism contributes to but is not the inducer of apoptosis following IL-3-starvation. *Cell Death Differ.* 9: 1147-1157.

Greiner EF, Guppy M, Brand K (1994) Glucose is essential for proliferation and the glycolytic enzyme induction that provokes a transition to glycolytic energyproduction. *J. Biol. Chem.* 269(50): 31484-31490.

Hammond KD, Balinsky D (1978) Isozyme studies of several enzymes of carbohydrate metabolism in human adult and fetal tissues, tumor tissues, and cell cultures. *Cancer Res.* 38:1323-1328.

Hansen M, Pedersen AG (1986) Tumour markers in patients with lung cancer. *Chest* 89(4): 219S-224S.

Hegemann L, Toso SM, Lahijani KI, Webster GF, Uitto J (1993) Direct interaction of antifungal azole derivatives with calmodulin: a possible mechanism for their therapeutic activity. *J. Invest. Dermatol.* 100: 343-346.

Higashi T, Richards CS, Uyeda K (1979) The interaction of phosphofructokinase with erythrocyte membranes. *J. Biol. Chem.* 254: 9542.

Holandino C, Veiga VF, Rodrigues ML, Morales MM, Capella MAM, Alviano CS (2001) Direct current decreases cell viability but not P glycoprotein expression and function in human multidrug resistant leukaemic cell. *Bioelectromagnetics* 22: 470-478.

Holme TC (1990) Cancer cell structure: actin changes in tumour cell – possible mechanisms. *Eur. J. Surg. Oncol.* 16: 161-169.

Holme TC, Koestler TP, Crawford N (1987) Actin in B16 melanoma cells of differing metastatic potential: effects of trypsin and serum. *Exp. Cell Res.* 169: 442-452.

Hoogerheide JG, Wyka BE (1982) *Anal. Profiles Drugs Subs.* 11: 225-255.

Instituto Nacional de Câncer, Ministério da Saúde, Rio de Janeiro (Brasil): INCA, 2004. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa2005>>. Acesso em dezembro 2004.

Jackson P, Bellett AJD (1989) Relationship between organization of the actin cytoskeleton and the cell cycle in normal and adenovirus-infected rat cells. *J. Virol.* 63: 311-318.

Karniel M, Beitner R (2000) Local anesthetics induce a decrease in the levels of glucose-1,6-bisphosphate, fructose-1,6-bisphosphate, and ATP, and in the viability of melanoma cells. *Mol. Genet. Metab.* 69: 40-45.

Keller HU, Niggli V, Zimmermann A (1989) Diacylglycerols and PMA induce actin polymerization and distinct shape changes in lymphocytes: relation to fluid pinocytosis and locomotion. *J. Cell Sci.* 93: 457-465.

Kong Thoo LP, Dance AM, Bestwick C, Milne L (2003) The biological activities of new polyamine derivatives as potential therapeutic agents. *Biochem. Soc. Trans.* 31: 407-410.

Kopperschläger G, Kriegel T, Birkenmeier C (1995) Interaction of murine monoclonal subunits specific antibodies with Fosfructokinase-1 from *Sacharomyces cerevisiae*. *FEBS lett.* 363: 17-21.

Kuo HJ, Malencik DA, Liou RS, Anderson SR (1986) Factors affecting the activation of rabbit muscle phosphofructokinase by actin. *Biochemistry* 25: 1278.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-688.

Lehninger AI: Biochemistry. Worth Publishers Inc, New York, 1975, pp 417-441.

Lee C, Ferguson M, Chen LB (1989) Construction of the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 109: 2045-2055.

Liu RS, Anderson S (1980) Activation of rabbit muscle phosphofrutokinase by F-actin and reconstituted thin filaments. *Biochemstry* 19 (12) 2684-8.

Livnat T e col. (1995) Rapid stimulatory effect of insulin on biding of glycolytic enzymes to cytoskeleton of C-6 glial cells, and the antagonistic action of calmodulin inhibitors. *Endocrine* 3: 319-322.

Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell JE (2000) *Molecular Cell Biology*. W. H. Freeman and Company ed New York, New York, USA.

Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193(1) 265-275.

Luther MA, Lee JC (1986) The role of phosphorylation in the interaction of rabbit muscle phosphofrutokinase with F-actin. *J. Biol. Chem.* 261: 1753.

Mac Neil S, Dawson RA, Crocker G, Tucker WFG, Bittiner B, Singleton JG, Hunter T, Tierney DF (1993) Antiproliferation effects on keratynocytes of a range of clinically used drugs with calmodulin antagonist activity. *Br. J. Dermatol.* 128: 143-150.

Mannhold R, Timmerman H (1992) Putative therapeutic applications of calmodulin antagonists. *Pharm. Weekbl. Sci.* 14: 161-166.

Masters CJ, Reid S, Don M (1987) Glycolysis – new concepts in an old pathway. *Mol. Cell. Biochem.* 76: 3-14.

Meade RH (1926) III *Am. J. Hosp. Pharm.* 36: 1326.

Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol. Meth.* 65:55-63.

Nakashima RA, Paggi MG, Pedersen PL (1984) Contributions of glycolysis and oxidative phosphorylation to adenosine 5'-triphosphate production in AS-30D hepatoma cells. *Cancer Res.* 44: 5702-5706.

Nelson DL, Cox MM (2000) *Lenhinger Principles of biochemistry* 3 ed. Worth Publishers Inc, New York, 554-555.

Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Bigner SH, Davidson N, Baylin S, Devilee P, e col. (1989) Mutations in the p53 gene occurs in diverse human tumour types. *Nature* 342(6250):705-708.

- Okabe S, Hirokawa N (1990) Turnover of fluorescently labelled tubulin and actin in the axon. *Nature* 343(1): 479-482.
- Ornelles DA, Fey EG, Penman S (1986) Cytochalasin releases mRNA from the cytoskeletal framework and inhibits protein synthesis. *Mol. Cell Biol.* 6: 1650-1662.
- Ovádi J, Orosz F (1997) A new concept for control of glycolysis. Em: Channeling in intermediary metabolism. L Agiuns e Sherratt HSA (eds) Portland Press Research Monograph IX. Portland Press Ltd., London. pp 237-268.
- Parkin DM, Bray FI, Devesa SS (2001) Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur. J. Cancer* 37(8): 54-66.
- Parry DM, Pedersen PL (1983) Intracellular localization and properties of particulate hexokinase in the Novikoff ascites tumor. Evidence for an outer mitochondrial membrane location. *J. Biol. Chem.* 258 (18): 10904-10912.
- Penso J, Beitner R (1997) Clotrimazole and bifonazole detach from mitochondria of melanoma cells. *European Journal of Pharmacology* 342: 113-117.
- Penso J, Beitner R (2002a) Detachment of glycolytic enzymes from cytoskeleton of Lewis lung carcinoma and colon adenocarcinoma cells induced by clotrimazole and its correlation to cell viability and morphology. *Mol. Genet. Metab.* 76: 181-188.
- Penso J, Beitner R (2002b) Clotrimazole decreases glycolysis and the viability of lung carcinoma and colon adenocarcinoma *Eur. J. Pharmacol.* 451: 227-235, 2002b.
- Piazza GA, Wallace RW (1985) Calmodulin accelerates the rate of polymerization of human platelet actin and alters the structural characteristics of actin filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 1683-1687.
- Poglazov BF (1983) Actin and coordination of metabolic processes. *Biochem. Int.* 6: 163-171.
- Pollack R, Osborn M, Weber K (1975) Patterns of organization of actin and myosin in normal and transformed cultured cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 72: 994-998.
- Ponten J, Holmberg L, Trichopoulos D, Kallioniemi OP, Kvale G, Wallgren A, Taylor-Papadimitriou J (1990) Biology and natural history of breast cancer. *Int J Cancer Suppl.* 5:5-21.
- Rao KMK (1985) Phorbol esters and retinoids induce actin polymerization in human leukocytes. *Cancer Lett.* 28: 253-262.

Rao KMK, Cohen HJ (1991) Actin cytoskeletal network in aging and cancer. *Mut. Res.* 256: 139-148.

Raz A, Geiger B (1982) Altered organization of cell-substrate contacts and membrane-associated cytoskeleton in tumor cell variants exhibiting different metastatic capabilities. *Cancer Res.* 42: 5185-5190.

Rebillard M, Leibovitch S, Jullien M, Talha S, Harel L (1987) Early stimulation by EGF plus insulin of rRNA, c-fos, and actin mRNA expression: inhibition by cytochalasin D. *Exp. Cell Res.* 172: 432-438.

Reddy GPV (1994) Cell cycle: regulatory events in G1–S transition of mammalian cells *J. Cell. Biochem* 54, 379-386.

Roberts SJ, Somero GN (1987) Binding of phosphofructokinase to filamentous actin. *Biochemistry* 26(12):3437-42.

Sabine JR (1976) Metabolic Controls in Precancerous Liver. VII. Time Course of Loss of Dietary Feedback Control of Cholesterol Synthesis During Carcinogen Treatment. *Eur. J. Cancer* 12:299-303.

Sastrodihardjo S, Sasaki Y, Shina Y, Kanno Y (1987) Possible involvement of reorganization of actin filaments, induced by tumor-promoting phorbol esters, in changes in colony shape and enhancement of proliferation of cultured epithelial cells. *J. Cell. Physiol.* 132: 49-56.

Silva APP, Alves GG, Araújo AHB, Sola-Penna M (2004) Effects of insulin and actin on phosphofructokinase activity and cellular distribution in skeletal muscle. *An. Acad. Bras. Ciências* 76: 541-548.

Sobue K, Fujio Y, Kanda K (1988) Tumor promoter induces reorganization of actin filaments and caldesmon (fodrin or nonerythroid spectrin) in 3T3 cells *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 85: 482-486.

Takahashi H, Abe M, Sugawara T (1998) Clotrimazole, an imidazole antimycotic, is a potent inhibitor of angiogenesis. *Jpn. J. Cancer Res.* 89: 445-451.

Takasuka T, Ishibashi S, Ide T (1987) GC-7 cells are growth arrested by cytochalasin D at two different points in the cell cycle. *Exp. Cell Res.* 173: 287-293.

Takei S, Iseda T, Yokoyama M (2003) Inhibitory effect of clotrimazole on angiogenesis associated with bladder epithelium proliferation in rats. *Int. J. Urol.* 10: 78-85.

Tien Huy N, Takano R, Hara S, Kamei K (2004) Enhancement of Heme-induced membrane damage by the anti-malarial clotrimazole: The role of colloid osmotic forces. *Biol. Pharm. Bull.* 27(3): 361-365.

Tung PS, Fritz IB (1987) Morphogenetic restructuring and formation of basement membranes by Sertoli cells and testis peritubular cells in co-culture: inhibition of the morphogenetic cascade by cyclic AMP derivatives and by blocking direct cell contact. *Dev. Biol.* 120: 139-153.

Vértessy GB, Bánkfalvi D, Kovács J, Löv P, Lehotzky A, Ovádi J (1999) Pyruvate kinase as a microtubule destabilizing factor *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 254: 430–435.

Vora S, Halper JP, Knowles DM (1985) Alterations in the Activity and Isozymic Profile of Human PFK during malignant transformation *In vivo* and *In vitro*: Transformation-and progressions-linked discriminants of malignancy. *Cancer Res.* 45: 2993-3001.

Walsh TP, Clarke FM, Masters CJ (1977) Modification of the kinetic parameters of aldolase on binding to actin containing filaments of muscle. *Biochem. J.* 165: 165-167.

Wang E, Goldberg AR (1976) Changes in microfilament organization and surface topography upon transformation of chick embryo fibroblasts with Rous sarcoma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 73: 4065-4069.

Anexo I

Mauro Sola-Penna

From: Molecular Genetics and Metabolism [mgm@elsevier.com]
Sent: Monday, November 22, 2004 8:44 PM
To: maurosp@ufrj.br
Subject: MGM-04-180R1 - Final Decision

Ms. No.: MGM-04-180RI

Title: Clotrimazole decreases human breast cancer cells viability through alterations in cytoskeleton-associated glycolytic enzymes

Corresponding Author: Dr. Mauro Sola-penna

Authors: Débora D Meira; Mônica M Marinho-Carvalho; Cesar A Teixeira; Venício F Veiga; Andrea T Da Poian, Ph.D.; Carla Holandino, Ph.D.; Marta S Freitas, Ph.D.;

Dear Dr. Sola-Penna,

We are pleased to notify you that your manuscript, referenced above, has been accepted for publication in Molecular Genetics and Metabolism. We publish monthly and average 100 days from submission to publication. Our journal is also available online as part of Academic Press' ScienceDirect System. We have a color figure on each cover. You may want to indicate potential cover figures in future manuscripts. We are pleased to offer one free color figure per article in Molecular Genetics and Metabolism.

We are forwarding your manuscript to the publishing office today. Galley proofs will be sent to you as soon as they are ready.

Thank you for giving us the opportunity to publish your work. We look forward to receiving other manuscripts from your laboratory.

The September/October issue of Molecular Genetics and Metabolism will be distributed at the American Society of Human Genetics meeting in Toronto, during October, 2004.

With kind regards,

E. R. B. McCabe
Editor-in-Chief
Molecular Genetics and Metabolism

Molecular Genetics and Metabolism, Editorial Office
Elsevier
525 B Street, Suite 1900
San Diego, CA 92101-4495
USA
E-mail: mgm@elsevier.com