



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Centro de Ciências da Saúde
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

**ÁCIDO ACETILSALICÍLICO E ÁCIDO SALICÍLICO DIMINUEM O
METABOLISMO DA GLICOSE E A VIABILIDADE CELULAR
MODULANDO A ATIVIDADE E ESTRUTURA DA
FOSFOFRUTOCINASE-1**

Guilherme Autuori Spitz

Guilherme Autuori Spitz

ÁCIDO ACETILSALICÍLICO E ÁCIDO SALICÍLICO DIMINUEM O METABOLISMO
DA GLICOSE E A VIABILIDADE CELULAR MODULANDO A ATIVIDADE E
ESTRUTURA DA FOSFOFRUTOCINASE-1

v.1

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Prof. Patrícia Zancan

Orientador

Professora Adjunto do Departamento de Fármacos, Faculdade de Farmácia, UFRJ

Rio de Janeiro

2008

Ficha Catalográfica

SPITZ, Guilherme Autuori

Ácido acetilsalicílico e ácido salicílico diminuem o metabolismo da glicose e a viabilidade celular modulando a atividade e a estrutura da fosfofrutocinase-1.
Rio de Janeiro, UFRJ, Faculdade de Farmácia, CCS, 2008.

XX, 71 f

Tese – Mestrado em Ciências Farmacêuticas

1. Ácido acetilsalicílico. 2. Fosfofrutocinase-1. 3. Metabolismo. 4. Câncer.

I - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

II - Ácido acetilsalicílico e ácido salicílico diminuem o metabolismo da glicose e a viabilidade celular modulando a atividade e a estrutura da fosfofrutocinase-1.

FOLHA DE APROVAÇÃO

“Ácido acetilsalicílico e ácido salicílico diminuem o metabolismo da glicose e a viabilidade celular modulando a atividade e a estrutura da fosfofrutocinase-1.”

Guilherme Autuori Spitz

Dissertação submetida ao corpo docente da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Membros da Banca Examinadora:

Prof. Antônio Ferreira Pereira

Professor Associado do Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, UFRJ

Profa. Carla Holandino

Professora Adjunta do Departamento de Medicamentos, FF, UFRJ

Prof. José Roberto Meyer Fernandes

Professor Associado do Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ

Prof. Alexandre dos Santos Pyrrho

Professor Adjunto do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, FF, UFRJ

Profa. Maisa Luciana Santos de Souza

Professora Adjunta do Centro Federal de Educação Tecnológica de Química de Nilópolis - RJ – Cefeteq

Profa. Patricia Zancan

Professora Adjunta do Departamento de Fármacos, FF, UFRJ
Orientadora

Prof. Mauro Sola-Penna

Professor Associado do Departamento de Fármacos, FF, UFRJ
Co-Orientador

Rio de Janeiro, RJ, Brasil
Outubro, 2008



Este trabalho foi realizado no Laboratório de Oncobiologia Molecular – LabOMol – e no Laboratório de Enzimologia e Controle de Metabolismo – LabECoM – do Departamento de Fármacos, Faculdade de Farmácia, CCS/UFRJ, sob a Orientação da Professora Patrícia Zancan e co-orientação do Professor Mauro Sola-Penna na vigência dos auxílios financeiros concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Fundação Ari Frausino/Fundação Educacional Charles Darwin/ Programa de Oncobiologia (FAF/FECD/ICB/ONCO), Programa de Apoio ao desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT) e Programa de Núcleos de Excelência (PRONEX).

“You can fight
Without ever winning
But never ever win
Without a fight”

Resist
Rush

“Se você tem um sonho, você tem de protegê-lo.
As pessoas não podem fazer nada, elas querem te dizer o que você não pode fazer.
Você quer algo? Corra atrás. Ponto final”.

Chris Gardner (Em Busca da Felicidade)

*“Você é o coração do papai,
E sem o coração papai não vive!!”*

Pra você, Clara,
obrigado pelo seu sorriso, pelas suas risadas, pela sua amizade, pela sua paciência...

Dedico não só essa tese, mas tudo que faço, para você.
Te amo.

AGRADECIMENTOS

Agradecer nunca é uma tarefa fácil. Pode-se esquecer alguém, agradecer de menos, pois nessa caminhada muitas pessoas ajudaram sem perceberem e foram importantes de alguma maneira.

- Agradeço aos meus pais Néelson e Tânia por me ensinarem a ter uma cara só. Minhas irmãs Elke e Daniela, meus primos, tias e tios e sobrinhos que me ajudaram bastante dando toda a força para que eu completasse mais essa etapa. Obrigado por terem parado, ainda no começo, de perguntar sobre o que era minha pesquisa (não vão entender mesmo!!hahaha), mas confiavam que eu estava no caminho certo. Mãe, dá diploma, sim!!!!
- À Clarinha (o mundo pegando fogo, e ela só quer brincar. Simples. É bom ser criança) e Brunela que sempre me ajudaram nos momentos de desânimo, pelo carinho e paciência e para que eu tivesse calma para conseguir ir à frente, sabendo que minha filha estava sendo bem cuidada por uma mãe zelosa e prestativa.
- Ao meu amigo e padrinho de minha filha Arthur, sempre com seu jeito prático e simples de ver as coisas.
- Agradeço bastante minha orientadora e amiga Patrícia Zancan, me ajudou muuuuito no meu estudo, nos experimentos, teve paciência de monge comigo, puxando a orelha na hora certa, acreditando no projeto (eu avisei que eu ia dar lucro!). Nessa caminhada tiveram coisas que não dá nem pra agradecer. Aprendi também que realmente, no trabalho, o que conta é o suor, a ralação. Observei bastante isso. Repito: só observei (brincadeira). Obrigado pela força e pela amizade que com certeza vai durar pra sempre.
- Quando conheci o Mauro Sola Penna, ele até malhava. Já fazem alguns bons anos, mas desde então nossa amizade só aumentou. Seja pelos papos engraçados na mesa de bar ou nas discussões sobre assuntos sérios (assunto sério?! Que é isso?). Meu amigo, obrigado pela paciência, ajuda e por entender meu jeito de levar as coisas. Valeu mesmo mestre, grande abraço.
- Aos professores que me acompanharam durante o trabalho ajudando e sempre à disposição: Alexandre Pyrrho e Carla Holandino. Obrigado por passarem tranquilidade e por estarem na minha banca.
- Aos meu amigos do LabECoM pela enorme paciência que tiveram comigo nesses anos todos. Como conseguiram me aturar? Sou muito chato; percebe-se por esses agradecimentos. Sem vocês juro que não teria conseguido. Vocês foram minha motivação para ir trabalhar, pelas brincadeiras, pelas idéias para o trabalho <nenhuma> (“Entra na célula?”), pelos chopps (nunca me pagaram um). Então vamos aos nomes: Camila, Cristiane, Pedro, Mariah, Karina, Lilian, Isadora, Maisa e Antônio (da onde surgiu esse cara !!! Você é o mais figura. Valeu mesmo pelas piadas, cervejas e outras (∞) mentiras, quer dizer, histórias (a das escoteiras suecas perdidas na Ilha

Grande que você socorreu é a melhor). Aos meus companheiros de laboratório e profissão, ótimos profissionais: Daniel (pára de estudar, cara), ao casal Raquel e Tiago (chefe, obrigado pela força, pelo incentivo, pela companhia nas caronas, choraaaaaa), Wagner (conterrâneo, por que que eu abri a porta do laboratório naquele dia?... obrigado), Mônica (obrigado por me ajudar e por eu ter tido o prazer de ter trabalhado contigo, pela paciência, humildade, ótima professora, mas, olha aí, ainda estou arrependido de ter pago aquele liquidificador, R\$7....absurdo, melhor comprar um industrial).

- Agradeço ao samba, ao Zeca, Beth Carvalho, Moacyr Luz e o Samba do Trabalhador, Jorge Aragão, Bezerra da Silva, Arlindo, Jorge Ben Jor, Monobloco, Barão Vermelho, Plebe Rude, entre outros, assim como também ao heavy metal, ao rock, com Dream Theater, Iron Maiden, Allman Brothers, Lynyrd Skynyrd, Dr. Sin, Rush, Ozzy, Steve Vai e outros que me ajudar a ter fé na hora dos experimentos, na hora de dissipar minha raiva e impaciência (quem pega engarrafamento pro fundão vai concordar), assim como agradeço ao meu Ipod e ao inventor dos torrents (agora que me empolguei, segura), ao café, ao Cantinho do Leblon e seus garçons, aos bares do Rosas, ao meu carro, a cerveja de garrafa, aos Florais de Bach e nunca poderei esquecer de agradecer a lasanha congelada. Provavelmente eu almocei pra mais de 300kg ao longo desses anos.
- A coisa mais importante, das coisas menos importantes, porque ninguém cala esse nosso amor. Não poderia deixar de agradecer ao Time cujo símbolo é um anjo torto que tinha às costas o número bíblico da perfeição. Aquela estrela no peito é uma predestinação. E assim é, único, desde o seu escudo. “...Noventa e cinco, mais um ano de alegria, a sua estrela brilha,”.
- Agradeço aos jargões que aliviaram o ambiente, verdadeiras pérolas: “Você pra mim, é problema seu!”, “É por isso que eu sempre digo: eu não falo nada!”, “Na verdade, ... (pausa).”, “Tranquilidade bovina?”, “Choraaaaa...”, além de palavras de baixo calão, pronunciadas com uma boa entonação e sonoridade, e de muita importância quando algum experimento dava errado.

“Meus bons amigos, onde estão? Notícias de todos, quero saber...” Dizem que amigos se conta no dedo. E ainda sobra dedo. Vou te falar: eu tenho amigo pra caramba. E me orgulho disso. Colegas, eu tenho bastante. Amigos são muitos, alguns que no momento tenho pouco contato, outros que tenho contato até demais; uns malas, outros menos; uns escolheram o time certo, outros não; uns bem de vida, outros nem tanto; mas com certeza, amigos. Agradeço por vocês estarem com saúde, vivos, na luta, por terem personalidade, serem honestos, corretos, terem valores, gostarem de tomar uma cervejinha (se não bebe, meu amigo não é). Obrigado por, ao longo da vida, me ajudarem, me aconselharem, me darem motivos para rir, serem companhias agradáveis, pelos churrascos, pelas besteiras que fizemos juntos (éééé, nem tudo saiu perfeito, serviu pra refletir), seja na luta do dia-a-dia, nas brigas (no bom sentido) no colégio (no meu caso colégiosssss, um “s” pra cada estabelecimento, Friburgo, terra boa...), depois na faculdade, trabalhosssssssss. Obrigado a todos vocês que em algum momento da minha vida estiveram presentes mostrando que é possível, sim, ser feliz. E eu só sou porque tenho amigos. Então, essa tese é um tributo à amizade.

RESUMO

A observação comum de que as células cancerosas apresentam maiores taxas glicolíticas quando comparadas com células controle leva à proposta da glicólise como um alvo potencial para o desenvolvimento de agentes antitumorais. Drogas antiinflamatórias, tais como o ácido acetilsalicílico (AAS) e ácido salicílico (AS), apresentam propriedades antitumorais, induzindo a apoptose e alterando a utilização de glicose pelo tumor. O presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito direto do AAS e do AS sobre a glicólise, através da inibição da importante enzima reguladora desta via, a fosfofrutocinase-1 (PFK). Nós observamos que AAS e AS inibem a PFK purificada de uma maneira dose-dependente e que isso ocorre devido a modulação da estrutura quaternária da enzima. AAS e AS promovem a dissociação da enzima de tetrâmeros bastante ativos para a formação de dímeros inativos, um mecanismo regulador comum desta enzima. Os efeitos inibitórios do AAS e AS sobre a PFK são totalmente reversíveis, podendo ser prevenidos ou revertidos pela ligação da enzima aos filamentos de actina. Ambos os fármacos também são capazes de diminuir o consumo de glicose e a produção de lactato, em linhagem de células de carcinoma mamário humano MCF7, bem como a sua viabilidade, a qual diminuiu paralelamente à inibição da PFK nestas células. Além disso, AAS e SA diminuem a atividade da enzima em homogenato de músculo esquelético, em células de mioblastos C2C12 e em eritrócitos humanos, onde promovem uma alteração da sua localização celular. Desta forma, nós demonstramos a capacidade de AAS e AS de modular diretamente uma importante enzima reguladora intracelular e propomos que este é um dos mecanismos envolvidos com a atividade antitumoral destes fármacos.

ABSTRACT

The common observation that cancer cells present higher glycolytic rates when compared to control cells, leads to the proposal of glycolysis as a potential target for the development of anti-tumoral agents. Anti-inflammatory drugs, such as acetylsalicylic acid (ASA) and salicylic acid (SA), present anti-tumoral properties, inducing apoptosis and altering tumor glucose utilization. The present work aims at evaluating whether ASA could directly decrease cell glycolysis through inhibition of the major regulatory enzyme within this pathway, 6-phosphofructo-1-kinase (PFK). We show that ASA and SA inhibit purified PFK in a dose-dependent manner, and that this inhibition occurs due to the modulation of the enzyme quaternary structure. ASA and SA promote the dissociation of the enzyme active tetramers into quite inactive dimers, a common regulatory mechanism of this enzyme. The inhibitory effects of ASA and SA on PFK are fully reversible and can be prevented or reverted by the binding of the enzyme to actin filaments. Both drugs are also able to decrease glucose consumption by human breast cancer cell line MCF7, as well as its viability, which decrease parallelly to the inhibition of PFK on these cells. Besides, ASA and SA inhibit the enzyme activity in different systems as in muscle homogenates, C2C12 cells and in human erythrocytes where ASA alters the PFK localization. In the end, we demonstrate the ability of ASA and SA to directly modulate an important regulatory intracellular enzyme, and propose that this is one of their mechanisms promoting anti-tumoral effects.

LISTA DE SIGLAS

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Sulfato de amônio
^{32}P ATP	Adenosina 5'-trifosfato marcado radioativamente no fosfato γ
$^{32}\text{[Pi]}$	Fosfato marcado com isótopo radioativo de fósforo
AAS	Ácido acetilsalicílico
ADP	Adenosina 5' difosfato
AINEs	Antiinflamatórios não esteroidais
Akt	Proteína cinase B
AMP	Adenosina 5' monofosfato
AMPC	Adenosina 5' monofosfato cíclico
AS	Ácido salicílico
ATP	Adenosina 5' trifosfato
AVC	Acidente vascular cerebral
BAD	Proteína pró-apoptótica BAD
C2C12	Linhagem de células de mioblasto
Ca^{2+}	Íon cálcio
CaM	Calmodulina
CDB3	Banda 3 da membrana de eritrócito
CO₂	Dióxido de carbono
COX	Ciclooxigenase
CTZ	Clotrimazol
DAC	Doença arteriocoronariana
DMEN	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOWEX	Resina de troca iônica
DTT	Ditiotreitol

EDTA	Ácido etileno-diamino tetracético
F1,6P2	Frutose-1,6-bifosfato
F2,6P2	Frutose-2,6-bifosfato
F6P	Frutose-6-fosfato
G6P	Glicose-6-fosfato
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GLUT	Transportadores de glicose por difusão facilitada
H⁺	Íons hidrogênio
H₂O	Água
HCl	Ácido clorídrico
HK	Hexocinase
Hsp70	Proteínas de choque térmico
I_{0.5}	Constante de inibição
IGF	Fator de crescimento semelhante a insulina
IKKb	Ativador do Iκβ cinase b
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IRS	Substrato para o receptor de insulina
Jak	Janus cinase
K⁺	Íon potássio
K_{0,5}	Constante de afinidade para substrato
K_a	Constante de afinidade/associação
KF	Fluoreto de potássio
K_m	Constante de Michaelis-Menten
MCF-7	Linhagem celular de carcinoma mamário humano
MgCl₂	Cloreto de magnésio
MRC	Meio de reação comum
MRP1	Proteína associada a resistência à múltiplas drogas
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio

<i>n</i>	Índice de cooperatividade para ativação
NaCl	Cloreto de sódio
NAD⁺	Nicotinamida adenosina dinucleotídeo oxidada
NADH	Nicotinamida adenosina dinucleotídeo reduzida
NaF	Fluoreto de sódio
NF-κB	Fator nuclear kappa β
NH₄⁺	Íons amônio
OMS	Organização Mundial da Saúde
P450	Citocromo P450
PFK	Fosfofrutocinase-1
PFK-2	Fosfofrutocinase-2
PFKL	Isoforma hepática da PFK
PFKM	Isoforma muscular da PFK
PFKP	Isoforma plaquetária da PFK
PG	Prostaglandinas
PK	Piruvato cinase
pKa	Potencial a constante ácida ($-\log=K_a$)
PKA	Proteína cinase A
SW480	Linhagem celular de câncer de cólon retal humano
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
TXA₂	Tromboxana A ₂
UDP	Uridina-5'-difosfato

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA 1: TIPOS DE CÂNCER MAIS INCIDENTES NA POPULAÇÃO BRASILEIRA: ESTIMATIVA PARA O ANO DE 2008.	02
FIGURA 2: VIA GLICOLÍTICA: DA GLICOSE AO PIRUVATO.	10
FIGURA 3: REAÇÃO CATALISADA PELA FOSFOFRUTOCINASE-1.	11
FIGURA 4: ALTERAÇÃO DO EQUILÍBRIO OLIGOMÉRICO DA FOSFOFRUTOCINASE-1.	14
FIGURA 5: REGULAÇÃO E INTERAÇÃO DA FOSFOFRUTOCINASE-1 COM ELEMENTOS DO CITOESQUELETO.	16
FIGURA 6: SÍNTESE DO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO.	17
FIGURA 7: ACETILAÇÃO DO ÁCIDO SALICÍLICO PRODUZINDO O ÁCIDO ACETILSALICÍLICO.	18
FIGURA 8: ACETILAÇÃO DA CICLOOXIGENASE PELO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO.	20
FIGURA 9: EFEITOS DO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO NA ATIVIDADE CATALÍTICA DA PFK PURIFICADA.	32
FIGURA 10: CURVA DE TEMPO DA ATIVIDADE DA FOSFOFRUTOCINASE-1 NA AUSÊNCIA OU NA PRESENÇA DE 3 E 10 mM DE ÁCIDO ACETILSALICÍLICO.	33

- FIGURA 11:** CURVA DE ATIVIDADE ESPECÍFICA NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE 10 mM DE ÁCIDO ACETILSALICÍLICO. 34
- FIGURA 12:** EFEITOS DO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO E ÁCIDO SALICÍLICO NA RELAÇÃO ESTRUTURA/FUNÇÃO DA FOSFOFRUTOCINASE-1. 36
- FIGURA 13:** REVERSIBILIDADE DOS EFEITOS DO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO E ÁCIDO SALICÍLICO NA ATIVIDADE DA FOSFOFRUTOCINASE-1 PURIFICADA. 37
- FIGURA 14:** MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DA FOSFOFRUTOCINASE-1 POR ÁCIDO ACETILSALICÍLICO E ÁCIDO SALICÍLICO NA PRESENÇA DE F-ACTINA. 39
- FIGURA 15:** EFEITOS DO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO E ÁCIDO SALICÍLICO NA ATIVIDADE FOSFOFRUTOCINÁSICA DE HOMOGENEIZADO DE MÚSCULO ESQUELÉTICO DE CAMUNDONGOS. 41
- FIGURA 16:** EFEITOS DO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO SOBRE A ATIVIDADE DA FOSFOFRUTOCINASE-1 DE ERITRÓCITOS HUMANOS E SOBRE A SUA LOCALIZAÇÃO CELULAR. 42
- FIGURA 17:** EFEITOS DOS SALICILATOS NA ATIVIDADE DA FOSFOFRUTOCINASE-1: CURVAS TEMPO E DE DOSE NAS CÉLULAS C2C12. 44
- FIGURA 18:** EFEITOS DO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO E ÁCIDO SALICÍLICO NA VIABILIDADE DAS CÉLULAS MCF-7. 45

- FIGURA 19:** EFEITOS DO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO E ÁCIDO SALICÍLICO NO CONSUMO DE GLICOSE EM CÉLULAS MCF-7. 46
- FIGURA 20:** EFEITOS DO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO E ÁCIDO SALICÍLICO NA PRODUÇÃO DE LACTATO EM CÉLULAS MCF-7. 47
- FIGURA 21:** EFEITOS DO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO E ÁCIDO SALICÍLICO NA ATIVIDADE DA FOSFOFRUTOCINASE-1 DE CÉLULAS MCF-7. 48

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. CÂNCER	1
1.2. METABOLISMO DA GLICOSE	4
1.3. FOSFOFRUTOCINASE-1	11
1.3.1. REGULAÇÃO DA ATIVIDADE DA FOSFOFRUTOCINASE-1	12
1.4. SALICILATOS: ÁCIDO ACETILSALICÍLICO E ÁCIDO SALICÍLICO	17
1.4.1. EFEITOS DOS SALICILATOS NO METABOLISMO DE DIFERENTES LINHAGENS CELULARES	20
2. OBJETIVOS	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1. MATERIAL	24
3.2. PURIFICAÇÃO DA FOSFOFRUTOCINASE-1	24
3.3. HOMOGENEIZADO DE MÚSCULO ESQUELÉTICO DE CAMUNDONGOS	26
3.4. DOSAGEM DE PROTEÍNA	26
3.5. SÍNTESE DE ATP RADIOATIVO	26
3.6. ENSAIO RADIOMÉTRICO DA ATIVIDADE DA	27

FOSFOFRUTOCINASE-1	
3.7. ENSAIO ESPECTROFOTOMÉTRICO DA ATIVIDADE DA FOSFOFRUTOCINASE-1 (SISTEMA ACOPLADO)	28
3.8. INTERAÇÃO ENZIMA-CITOESQUELETO	28
3.9. CULTURA DE CÉLULAS, VIABILIDADE CELULAR, CONSUMO DE GLICOSE E PRODUÇÃO DE LACTATO	29
3.10. ENSAIO DE REVERSIBILIDADE ATRAVÉS DA RETIRADA DO FÁRMACO POR DIÁLISE	30
3.11. ENSAIO DE FLUORESCÊNCIA INTRÍNSECA	30
3.12. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	31
4. RESULTADOS	32
4.1. EFEITOS DOS SALICILATOS NA ATIVIDADE DA FOSFOFRUTOCINASE-1 PURIFICADA DE MÚSCULO ESQUELÉTICO DE COELHO	32
4.2. EFEITOS DOS SALICILATOS NA ESTRUTURA QUATERNÁRIA DA FOSFOFRUTOCINASE-1	35
4.3. EFEITOS DOS SALICILATOS NA ATIVIDADE DA FOSFOFRUTOCINASE-1 NA PRESENÇA DE ACTINA	38
4.4. EFEITOS DO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO E DO ÁCIDO SALICÍLICO NA ATIVIDADE DA FOSFOFRUTOCINASE-1 DE HOMOGENEIZADO DE MÚSCULO ESQUELÉTICO DE	40

CAMUNDONGO

4.5. EFEITOS DOS SALICILATOS NA ATIVIDADE DA FOSFOFRUTOCINASE-1 EM CÉLULAS MUSCULARES INTACTAS	43
4.6. EFEITOS DOS SALICILATOS NA VIABILIDADE CELULAR, CONSUMO DE GLICOSE, PRODUÇÃO DE LACTATO E ATIVIDADE DA FOSFOFRUTOCINASE-1 EM LINHAGENS DE CÉLULAS MCF 7	43
5. DISCUSSÃO	49
6. CONCLUSÕES	52
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
8. ANEXO 1	63

1. INTRODUÇÃO

1.1 – CÂNCER

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 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 de células que invadem outros tecidos e órgãos, adjacentes ou não (Organização Mundial da Saúde, 2008).

Estima-se que, em 2020, o número de casos novos anuais de câncer seja da ordem de 15 milhões, sendo que cerca de 60% desses novos casos ocorrerão em países em desenvolvimento (Instituto Nacional de Câncer, 2008).

O Brasil classifica-se entre os países com maior incidência de câncer em todo o mundo. As estimativas para o ano de 2008 apontam que ocorrerão 466.730 novos casos de câncer no Brasil (Instituto Nacional de Câncer, 2008), sendo que são esperados 231.860 novos casos para o sexo masculino e 234.870 para o sexo feminino. Estima-se que o câncer de pele, do tipo não melanoma (115 mil casos novos), será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de mama feminina (49 mil), próstata (49 mil), pulmão (27 mil), cólon e reto (27 mil), estômago (22 mil) e colo do útero (19 mil) (Figura 1). As regiões Sul e Sudeste apresentam as maiores taxas, enquanto que as regiões Norte e Nordeste mostram taxas mais baixas. As taxas da região Centro-Oeste apresentam um padrão intermediário (Instituto Nacional de Câncer, 2008).

Existem três modalidades terapêuticas principais para o câncer: cirurgia, radioterapia e

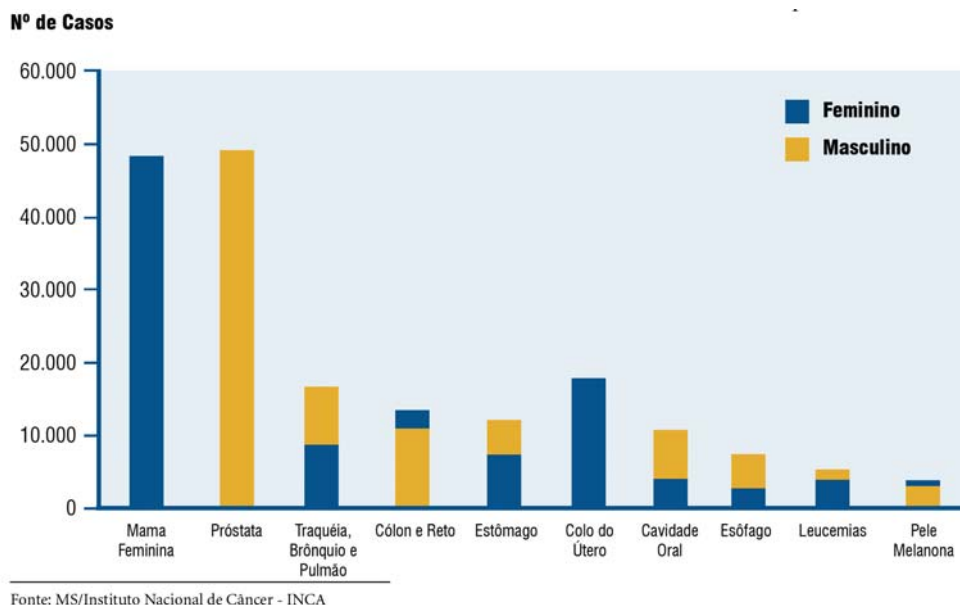


Figura 1 - Tipos de câncer mais incidentes na população brasileira: Estimativa para o ano de 2008. (INCA, 2008).

quimioterapia. Esta última tem sido, nos últimos anos, objeto de extensa investigação na busca de novos quimioterápicos cada vez mais ativos. A maior parte das drogas com atividade antitumoral originalmente derivavam de produtos naturais, sendo dois bons exemplos os alcalóides da Vinca (vinblastina e vincristina) e o Taxol (paclitaxel). No entanto, apesar do grande número de agentes antitumorais, a resistência específica de alguns tumores para determinados quimioterápicos, assim como o problema da resistência a múltiplas drogas, torna necessária a busca por novas substâncias antitumorais e/ou novas abordagens terapêuticas capazes de auxiliar o tratamento do câncer.

Nos dias atuais, o desenvolvimento de novas drogas e/ou estratégias para combater qualquer patologia é feito através da busca racional de substâncias químicas ou tratamentos capazes de agir especificamente sobre determinada via metabólica celular. A identificação de vias passíveis de serem controladas que sejam determinantes para o controle do crescimento de células tumorais, e que afetem minimamente outros tipos celulares, tornam-se de

fundamental importância no planejamento de novas estratégias terapêuticas para o combate e a prevenção do câncer (Penso e Beitner, 2002a).

Uma curiosa, mas comum, propriedade dos cânceres invasivos é o metabolismo alterado da glicose. Na maioria das células de mamíferos a glicólise é inibida pela presença de oxigênio, o qual permite que a mitocôndria oxide piruvato em CO_2 e H_2O . Esta inibição é chamada de ‘efeito Pasteur’ onde o fluxo de glicose é reduzido pela presença de oxigênio (Racker, 1974). Esta versatilidade metabólica de células de mamíferos é essencial para manutenção da produção de energia através de uma faixa de concentração de oxigênio. A conversão de glicose em ácido láctico na presença de oxigênio é conhecida como glicólise aeróbica ou o ‘efeito Warburg’. A glicólise aeróbica aumentada é somente observada em cânceres. Este fenômeno foi primeiro reportado por Warburg na década de 20 (Warburg, 1930), levando à hipótese de que o câncer resulta do bloqueio do metabolismo mitocondrial. Embora a hipótese de Warburg tenha sido descartada, as observações experimentais da glicólise aumentada em tumores mesmo na presença de oxigênio têm sido repetidamente verificadas (Semenza *et al.*, 2001, El-Bacha *et al.*, 2003; Gatenby e Gillies, 2004).

A glicólise, além de ser a principal via de degradação de carboidratos, pode alimentantar as vias de biossíntese de ácidos graxos, aminoácidos e colesterol, entre outras (El-Bacha *et al.*, 2003). A alta demanda de ATP e de precursores para o crescimento celular sugerem que o metabolismo alterado de glicose pelos tumores é mais do que uma simples adaptação a hipóxia (Gatenby e Gillies, 2004). A observação quase universal da glicólise aeróbica em cânceres humanos invasivos, sua persistência mesmo sob condições de normóxia e sua correlação com a agressividade do tumor indicam que o fenótipo glicolítico confere uma vantagem proliferativa significativa, durante a evolução somática do câncer e deve, portanto, ser um componente crucial do fenótipo maligno (Gatenby e Gillies, 2004). Desta forma, o

aumento na glicólise é um componente essencial para o fenótipo maligno e, portanto, um marco dos cânceres invasivos.

Os dados apresentados acima permitem sugerir que mecanismos capazes de controlar o fluxo glicolítico acelerado, característico de neoplasias, impedirão o crescimento tumoral (Langbein *et al.*, 2006). Uma vez que tecidos saudáveis não apresentam o ‘efeito Warburg’, e, portanto, são capazes de manter suas necessidades energéticas a partir da oxidação de outros substratos, o controle do fluxo glicolítico pelo uso de xenobióticos é uma potente estratégia terapêutica no controle de neoplasias.

Recentes análises epidemiológicas relataram que pacientes que fizeram uso de AAS por longo prazo apresentaram um decréscimo na incidência de câncer de cólon retal (Rao e Reddy, 2004; Rodriguez e Huerta-Alvarez, 2000; Zhab *et al.*, 2004). Além disso, um estudo publicado na revista Lancet em 2007, com o acompanhamento de mais de 5.000 indivíduos de maneira randomizada, proporcionou uma boa evidência de que pelo menos 300 mg/dia de ácido acetilsalicílico por cerca de 5 anos é eficaz na prevenção primária de câncer de cólon retal, com uma latência de 10 anos nos seus efeitos (Flossman *et al.*, 2007), sendo consistentes com os aparentes efeitos vistos em outros estudos observacionais (Kozuka *et al.*, 1975; Kelloff *et al.*, 2004; Weitz *et al.*, 2005; Levine e Ahnen, 2006).

1.2. METABOLISMO DA GLICOSE

Após a ingestão de alimentos que contenham carboidratos, os mesmos são metabolizados por várias enzimas ao longo do trato gastrointestinal. Após todo este processo, denominado de digestão, os carboidratos são degradados essencialmente em seus constituintes básicos, sendo os principais: glicose, frutose e galactose. A glicose é captada

pelos enterócitos e, em última análise, vai para a corrente sanguínea, onde pode ser captada por todas as células do organismo. Esta captação é feita através de dois mecanismos principais: (1) difusão simples e (2) difusão facilitada, acoplados a proteínas transportadoras. As proteínas que fazem esta captação são denominadas de uma forma geral de GLUT (transportadores de glicose – *Glucose transporter*). Cinco destes tipos de transportadores, conhecidos como GLUT 1, GLUT 2, GLUT 3, GLUT 4 e GLUT 5 já foram identificados e clonados. Estas proteínas transportadoras de hexose são similares quanto à sequência e estrutura, mas únicas quanto à distribuição tecidual (Olefsky, 1999). O GLUT 1 foi o primeiro transportador por difusão facilitada identificado estando presente em placenta, cérebro, rins, eritrócitos e cólon; também está presente em baixa quantidade no tecido adiposo e muscular. O GLUT 2 está presente, predominantemente, no fígado e nas células β pancreáticas, estando envolvido no mecanismo, regulado por glicose, que leva à secreção de insulina. O GLUT 3 é encontrado em múltiplos tecidos, incluindo cérebro, placenta e rins. O GLUT 5 é encontrado, predominantemente, no intestino delgado. Os GLUT 1, 3 e 5 são os principais transportadores envolvidos na captação basal de glicose (Bell *et al.*, 1990). GLUT 4 é o único transportador de glicose regulado por estímulo insulinêmico e por contração muscular, sendo encontrado, exclusivamente, nos músculos esquelético, cardíaco, e no tecido adiposo (Birnbaum, 1992; Murray *et al.*, 2003).

Independente do estímulo inicial, quando internalizada, a glicose é rapidamente fosforilada podendo ser direcionada para alguma via metabólica, como por exemplo: via das pentoses fosfato, via glicolítica, síntese de glicogênio, dentre outras (Nelson e Cox, 2000).

Células com demanda aumentada de energia, como em processos como mitose ou contração muscular, e células com elevadas taxas de síntese de proteínas, devem adaptar seu metabolismo para uma rápida e eficiente produção de energia. A glicólise é a principal via no fornecimento de energia à maioria das células, devido a sua capacidade de disponibilizar

adenosina 5'trifosfato (ATP) rapidamente e não depender do metabolismo oxidativo e, conseqüentemente, da presença de oxigênio, assumindo fundamental importância para a sobrevivência celular (Stanley e Connert, 1991).

A via glicolítica consiste de 2 fases separadas. A primeira é a fase preparatória, a qual requer energia na forma de ATP para ativar a molécula de glicose, através da sua fosforilação, para as reações oxidativas posteriores. A segunda fase é a fase de pagamento ou produtora de energia. Na primeira, 2 equivalentes de ATP são utilizados para converter a glicose em 2 moléculas de gliceraldeído-3-fosfato. Na segunda fase, o gliceraldeído-3-fosfato é degradado em piruvato, com a produção de 4 equivalentes de ATP e 2 equivalentes de nicotinamida adenosina dinucleotídeo reduzida (NADH) (Nelson e Cox, 2000).

A oxidação parcial da glicose pela via glicolítica pode ser sumarizada pela seguinte equação:



O NADH gerado durante a glicólise é utilizado, na síntese de ATP via fosforilação oxidativa, mitocondrialmente. Este processo produz 2 ou 3 equivalentes de ATP dependendo, respectivamente, das lançadeiras glicerol fosfato ou malato-aspartato, utilizadas para transportar os elétrons do NADH citoplasmático para dentro da mitocôndria. O rendimento líquido da oxidação de 1 mol de glicose em 2 moles de piruvato é, portanto, 6 ou 8 moles de ATP. A completa oxidação de 2 moles de piruvato, através do complexo multienzimático da piruvato desidrogenase, do ciclo dos ácidos tricarboxílicos e da cadeia de transporte de elétrons, produz um adicional de 30 moles de ATP; o rendimento total, portanto, é de 36 ou 38 moles de ATP obtidos pela oxidação completa de 1 mol de glicose em dióxido de carbono (CO₂) e água (H₂O) (Nelson e Cox, 2000).

Em processos envolvendo tantas etapas como a glicólise, algumas reações estão essencialmente em equilíbrio. Porém, o nível de atividade dessas reações depende das concentrações de seus substratos e de outras reações, as quais podem ser muito lentas ou não atingirem o equilíbrio entre substrato e produto, sendo, assim, limitadas pelas enzimas envolvidas (Nelson e Cox, 2000). Esta última forma de regulação do fluxo glicolítico é melhor exemplificado pelas reações catalisadas pela hexocinase, fosfofrutocinase-1 e piruvato cinase, conforme melhor descrito adiante.

A fosforilação da glicose, dependente de ATP, para formar glicose-6-fosfato é a primeira reação da glicólise. É catalisada por isoenzimas tecido-específicas conhecidas como hexocinases (HK) (Grossbard e Schimke, 1966). A glicocinase é a isoenzima ou forma da hexocinase encontrada em hepatócitos e células β pancreáticas, que apresenta uma alta constante Michaelis-Menten (K_m) para a glicose. A reação da hexocinase converte a glicose não iônica em um ânion que fica retido na célula, uma vez que as células não possuem os sistemas de transporte para açúcares fosforilados. Além disso, a glicose inerte é ativada em uma forma lábil capaz de ser metabolizada.

A segunda reação da glicólise é uma isomerização, na qual a glicose-6-fosfato (G6P) é convertida em frutose-6-fosfato. A enzima que catalisa esta reação é a fosfoglicoisomerase. Esta reação é livremente reversível em condições celulares normais.

A próxima reação da glicólise envolve a utilização de um segundo ATP para converter a frutose-6-fosfato em frutose-1,6-bifosfato. Esta reação é catalisada pela 6-fosfofruto-1-cinase ou fosfofrutocinase-1 (PFK). Esta reação não é facilmente reversível devido a sua grande energia livre positiva ($\Delta G'^{\circ} = 5,4$ kcal/mol) na direção reversa. Por outro lado, as unidades de frutose fluem facilmente na direção que favorece a gliconeogênese devido à presença da enzima hidrolítica frutose-1,6-bifosfatase. A atividade destas duas enzimas é altamente regulada, chegando ao ponto da PFK ser considerada a

enzima limitante da glicólise.

A aldolase catalisa a hidrólise da frutose-1,6-bifosfato em dois produtos de 3 carbonos cada: a diidroxiacetona fosfato e o gliceraldeído-3-fosfato. Estes dois produtos da reação da aldolase equilibram-se facilmente na reação catalisada pela triosefosfato isomerase. As reações subsequentes da glicólise utilizam o gliceraldeído-3-fosfato como substrato, assim a reação da aldolase é direcionada no sentido da glicólise pelo princípio de ação das massas, ou equilíbrio químico (Stryer, 1995).

A segunda fase do catabolismo da glicose é caracterizado pelas reações que geram energia pela produção de ATP e NADH. Na primeira destas reações, a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) catalisa a oxidação dependente de nicotinamida adenosina dinucleotídeo oxidada (NAD^+) do gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-bifosfoglicerato e NADH (Eto *et al.*, 1999). O fosfato de alta energia do 1,3-bifosfoglicerato é utilizado para formar ATP e 3-fosfoglicerato pela enzima fosfoglicerato cinase. Esta é a única reação da glicólise e da gliconeogênese que envolve ATP e ainda é reversível sob condições celulares normais. As reações restantes da glicólise têm como objetivo converter o fosfoacil éster de baixa energia do 3-fosfoglicerato em formas de alta energia e inserir o fosfato em ATP. O 3-fosfoglicerato é, primeiramente, convertido em 2-fosfoglicerato pela fosfoglicerato mutase, e a conversão deste em fosfoenolpiruvato é catalisada pela enolase.

A reação final da glicólise é catalisada pela piruvato cinase (PK), uma enzima altamente regulada. Nesta reação altamente exergônica, a adenosina 5'difosfato (ADP), juntamente com o fosfato de alta energia do fosfoenolpiruvato, é convertida em ATP. A perda do fosfato pelo fosfoenolpiruvato leva à produção do piruvato numa forma enol instável que é, espontaneamente, tautomerizado para uma forma ceto mais estável do piruvato. Esta reação contribui grandemente para a energia livre da hidrólise do fosfoenolpiruvato (Nelson e Cox, 2000).

As etapas da via glicolítica, bem como as estruturas dos intermediários, encontram-se sumarizadas na Figura 2.

Sob condições aeróbicas, o piruvato, na maioria das células, é metabolizado via ciclo dos ácidos tricarboxílicos. Contudo, sob condições anaeróbicas, é convertido em lactato pela enzima lactato desidrogenase. O lactato produzido é transportado para fora da célula, entrando na circulação sanguínea. A conversão de piruvato em lactato fornece à célula um mecanismo para a oxidação do NADH (produzido durante a reação da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) em NAD^+ , o que ocorre durante a reação catalisada pela lactato desidrogenase. Esta redução é necessária, uma vez que NAD^+ é um importante substrato para a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, sem o qual a glicólise irá cessar. Normalmente, durante a glicólise aeróbica, os elétrons do NADH citosólico são transferidos para os carreadores mitocondriais da fosforilação oxidativa gerando um *pool* contínuo de NAD^+ citosólico (Nelson e Cox, 2000).

Podemos considerar que a via glicolítica possui duas grandes funções: degradar a glicose para geração de ATP e fornecer elementos para a biossíntese de macromoléculas celulares. Nesse sentido, a velocidade da glicólise é regulada para atender a essas duas necessidades. As reações catalisadas pelas enzimas HK, PFK e PK acontecem com uma grande diminuição da energia livre. Isso se dá através de regulações alostéricas, por modificações covalentes ou pelos níveis de substratos (Nelson e Cox, 2000).

A regulação da HK, apesar de ser um ponto chave regulatório da glicólise, tendo fundamental importância, não é a principal etapa de controle, uma vez que grandes quantidades de glicose-6-fosfato, são derivadas da quebra do glicogênio (Cornish-Bowden e Cardenas, 1991). Da mesma forma, a regulação da PK é importante para a reversibilidade da glicólise (ativação da gliconeogênese) em situações onde o nível de ATP está alto (Doiron *et*

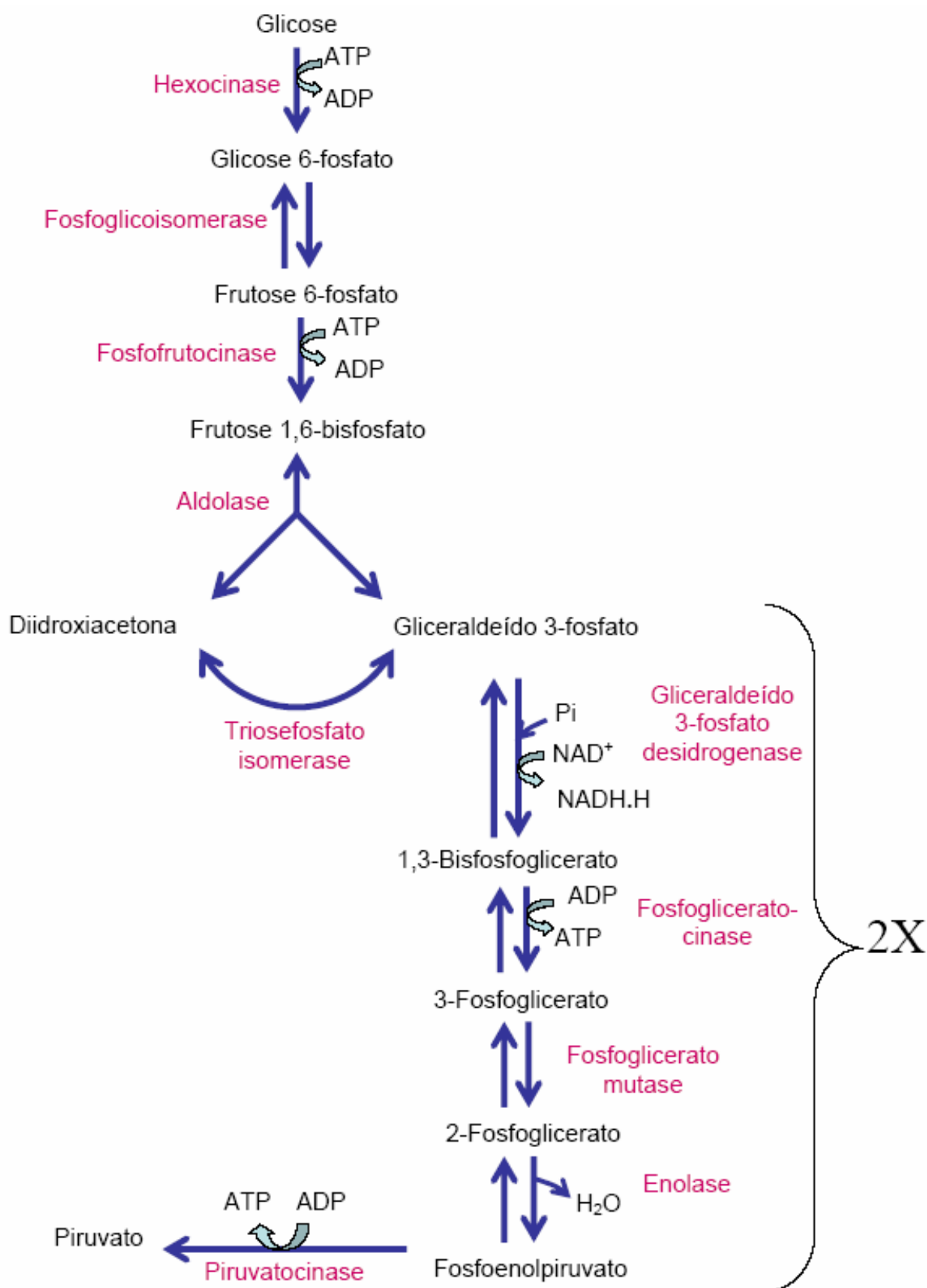


Figura 2 - Via Glicolítica: da glicose ao piruvato. Figura obtida no site www.icb.ufmg.br. Acessado em agosto de 2006.

al., 1996). Então, dentre as três enzimas regulatórias do fluxo glicolítico, a PFK é considerada o ponto chave da regulação do metabolismo glicolítico e a etapa que apresenta a maior complexidade de mecanismos regulatórios (Paassonneau e Lowry, 1962; Uyeda, 1979; Kemp e Foe, 1983).

1.3. FOSFOFRUTOCINASE-1

A fosfofrutocinase-1 (PFK, ATP:D-frutose-6-fosfato 1-fosfotransferase, EC 2.7.1.11) catalisa a transferência irreversível, em condições metabólicas normais, do grupo fosfato gama terminal do MgATP^{2-} para a frutose 6-fosfato, formando frutose 1,6-bisfosfato e ADP (Figura 3).

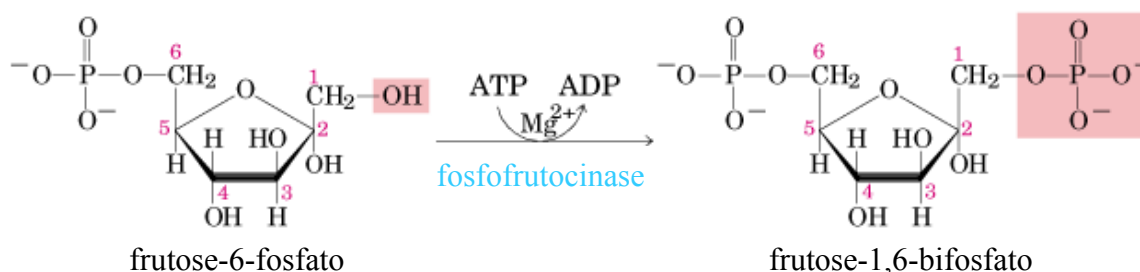


Figura 3 - Reação catalisada pela Fosfofrutocinase-1. Adaptado de Nelson e Cox (2000).

Em mamíferos, são descritas três isoformas de monômeros da PFK, com um peso molecular variando em torno de 85 kDa, capazes de formar homo e heteroligômeros (Uyeda, 1979; Kemp e Foe, 1983). A primeira indicação da existência de diferentes isoformas da PFK humana veio com a descoberta de uma doença relacionada à deficiência da isoforma muscular da PFK, a síndrome de Tarui ou glicogenólise tipo VII (Tarui *et al.*, 1965). A

atividade da PFK nestes pacientes era 2% do valor normal em músculo e 50% da atividade normal em eritrócitos.

Já foi estabelecida a existência de 3 *loci* estruturais para PFK: PFKM, PFKL e PFKP codificando distintas subunidades de PFK no músculo, no fígado e nas plaquetas, respectivamente (Vora e Francke, 1981). Dependendo do tecido, pode haver a expressão de um, dois, ou dos três genes. O produto destes genes pode associar-se de forma aleatória formando heteroligômeros ou homoligômeros. No caso particular do músculo esquelético, a isoforma encontrada da enzima é exclusivamente a PFKM (Vora e Francke, 1981).

1.3.1. – REGULAÇÃO DA ATIVIDADE DA FOSFOFRUTOCINASE-1

A atividade da PFK pode ser regulada por diversos ligantes alostéricos incluindo tanto efetores positivos, como frutose-2,6-bifosfato (F2,6BP), amônio (NH_4^+), ADP e adenosina 5' monofosfato (AMP), quanto efetores negativos, como citrato, ATP e íons de hidrogênio (H^+) (Uyeda, 1979; Kemp e Foe, 1983).

O ATP não é apenas um dos substratos para a PFK mas também é o principal produto da glicólise e cada subunidade da enzima apresenta 2 sítios de ligação ao ATP. Quando altos níveis deste nucleotídeo são atingidos, o ATP inibe a atividade fosfofrutocinásica através da sua ligação a um sítio alostérico inibitório. Esta ligação promove uma mudança conformacional na enzima, diminuindo a afinidade da PFK pela frutose-6-fosfato (Passonneau e Lowry, 1962), além de promover a dissociação dos tetrâmeros ativos da enzima em dímeros com menor atividade (Zancan *et al.*, 2007b; 2008). ADP e AMP também agem alostericamente, contrapondo-se a inibição da PFK pelo ATP. Além disso, o citrato, um intermediário da oxidação aeróbica do piruvato, é capaz de modular a atividade da PFK: altos níveis de citrato potencializam a inibição promovida pelo

ATP sobre a PFK (Passonneau e Lowry, 1962; Tornheim e Lowenstein, 1976).

Conhecido como um dos mais significativos moduladores positivos da PFK, a frutose-2,6-bifosfato regula, alostericamente, tanto a glicólise, quanto a gliconeogênese, embora ela não seja um intermediário nem da glicólise, nem da gliconeogênese (Van Schaftingen e Hers, 1980). A síntese de frutose-2,6-bifosfato é catalisada pela enzima bifuncional fosfofrutocinase-2 (PFK2)/frutose-2,6-bifosfatase (El-Maghrabi e Pilkis, 1984). Sobre a PFK, a F2,6BP é capaz de reverter os efeitos inibitórios do ATP (Hers e Van Schaftinger, 1982), promovendo a formação de tetrâmeros da enzima (Zancan *et al.*, 2007b; 2008).

Além disso, a PFK pode ser regulada através de fosforilação - promovida por diversas proteínas cinases, como por exemplo a proteína cinase A (PKA) - ou defosforilação (Luther e Lee, 1986; Kuo *et al.*, 1986, Alves e Sola-Penna, 2003). Esse mecanismo não somente é capaz de modular diretamente a atividade da enzima, mas também desempenha um papel importante na sua localização celular, fazendo com que a PFK possa interagir com diversas proteínas do citoesqueleto (Liou e Anderson, 1980; Roberts e Somero, 1987; Chen-Zion *et al.*, 1992; Andrés *et al.*, 1996; Silva *et al.*, 2004).

Adicionalmente aos moduladores acima descritos, o estado oligomérico da PFK representa um importante mecanismo de regulação da sua atividade (Figura 4). O equilíbrio entre formas diméricas (inativas) e tetraméricas (ativas) é consideravelmente afetado pela concentração da enzima, pH e temperatura, entre outros fatores (Bock e Frieden, 1974).

A importância fisiológica desse equilíbrio decorre da influência direta que a estrutura quaternária da PFK exerce sobre a sua atividade enzimática (Parmeggiani *et al.*, 1966; Paetkau e Lardy, 1967). Paralelamente, a ligação de diferentes formas oligoméricas da PFK a proteínas estruturais também pode influenciar este equilíbrio e, conseqüentemente, sua atividade (Parmeggiani *et al.*, 1966; Cai *et al.*, 1990). Como exemplo, pode-se citar que a

ligação das formas diméricas e monoméricas da PFK com tubulina e microtúbulos desloca o equilíbrio entre os oligômeros, resultando em uma diminuição significativa da sua atividade (Lehotzky *et al.*, 1993; Vértessy *et al.*, 1997).

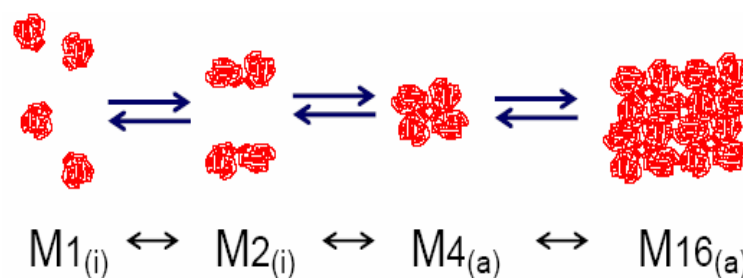


Figura 4 – Alteração do equilíbrio oligomérico da Fosfofrutocinase-1. O esquema representa o equilíbrio entre os diferentes oligômeros da PFK. Monômeros da PFK (M_1) são capazes de associar-se reversivelmente formando dímeros (M_2) e vice-versa (Uyeda, 1979). Os dímeros podem associar-se formando tetrâmeros (M_4) que, por sua vez, são capazes de associar-se formando hexadecâmeros (M_{16}). Neste esquema as letras *a* e *i* indicam a atividade catalítica da forma oligomérica, sendo (*a*) ativo e (*i*) inativo. Modelo esquemático desenhado no LabECoM.

Uma vez que a ligação da PFK ao citoesqueleto desempenha um papel importante tanto estruturalmente, quanto sobre sua atividade catalítica, torna-se necessário descrever um pouco mais esta interação e suas consequências. 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). Nas últimas décadas, diversos estudos têm relatado a capacidade das enzimas glicolíticas de se associarem reversivelmente a elementos estruturais da célula, como a actina filamentosa e microtúbulos (Liou e Anderson, 1980; Andrés *et al.*, 1996; Alves e Sola-Penna 2003; El-Bacha *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2004; Meira *et al.*, 2005), e também com proteínas de membrana plasmática, como o canal aniônico banda 3 (CDB3) presente na

membrana plasmática de eritrócitos (Kaul e Kohler, 1983; Campanella *et al.*, 2005; Zancan e Sola-Penna, 2005a e 2005b) e membranas de miócitos durante o infarto (Hazen *et al.*, 1994)

A associação da PFK com estas proteínas ocorre de forma muito dinâmica, sendo que sua associação com filamentos de actina é capaz de aumentar significativamente sua atividade enzimática (Liou e Anderson, 1980; Andrés *et al.*, 1996), além de estabilizar formas oligoméricas mais ativas (Roberts e Somero, 1987). Segundo estudos de Luther e Lee (1986) e Kuo *et al.*, (1986), a forma fosforilada da enzima tem uma maior afinidade pela actina que a forma defosforilada. Essa associação também pode ser favorecida por estímulo hormonal, uma vez que agonistas β -adrenérgicos podem favorecer a fosforilação de diversas proteínas, incluindo a PFK (Alves e Sola-Penna, 2003). A sinalização por insulina também é capaz de favorecer essa associação pelo mesmo mecanismo (Chen-Zion *et al.*, 1992; Silva *et al.*, 2004).

Além da capacidade de se ligar a proteínas do citoesqueleto, a PFK também pode associar-se a outras proteínas. Recentemente, o nosso grupo de trabalho mostrou que a ligação da calmodulina (CaM) ao sítio de alta afinidade da PFK muscular induz a dissociação da conformação tetramérica da enzima sem o comprometimento da atividade catalítica da mesma (Marinho-Carvalho *et al.*, 2006). Esse efeito estimulatório parece ocorrer sob condições específicas: condições inibitórias (como altas concentrações de ATP) são revertidas pela presença de CaM (Marinho-Carvalho *et al.*, 2008, dados submetidos para publicação).

A Figura 5 abaixo mostra o modelo esquemático da interação da PFK com elementos do citoesqueleto (neste caso, a actina filamentosa) e o modo como diferentes moduladores desta enzima alteram sua atividade.

Karadesheh e col., (1977), e posteriormente, o grupo do Professor Low (Low *et al.*, 1993; Low *et al.*, 1995; Campanella *et al.*, 2005) demonstraram que a PFK, assim como

outras enzimas glicolíticas, liga-se à superfície interna da membrana dos eritrócitos humanos e interage com a proteína banda 3. Jenkins *et al.* (1985) mostraram que a PFK perde sua atividade catalítica ao se ligar a CDB3. Esta inibição acontece uma vez que a banda 3, *in vitro*, desloca o equilíbrio entre as subunidades da PFK para a forma dimérica. A CDB3 se liga ao dímero com maior afinidade do que ao tetrâmero, provavelmente porque as interações com o dímero estão mais acessíveis espacialmente (Jenkins *et al.*, 1985). De fato, a associação das enzimas glicolíticas com a banda 3 leva a uma inibição reversível das enzimas e assim pode estar envolvida na regulação da glicólise nessas células (Messana *et al.*, 1996).

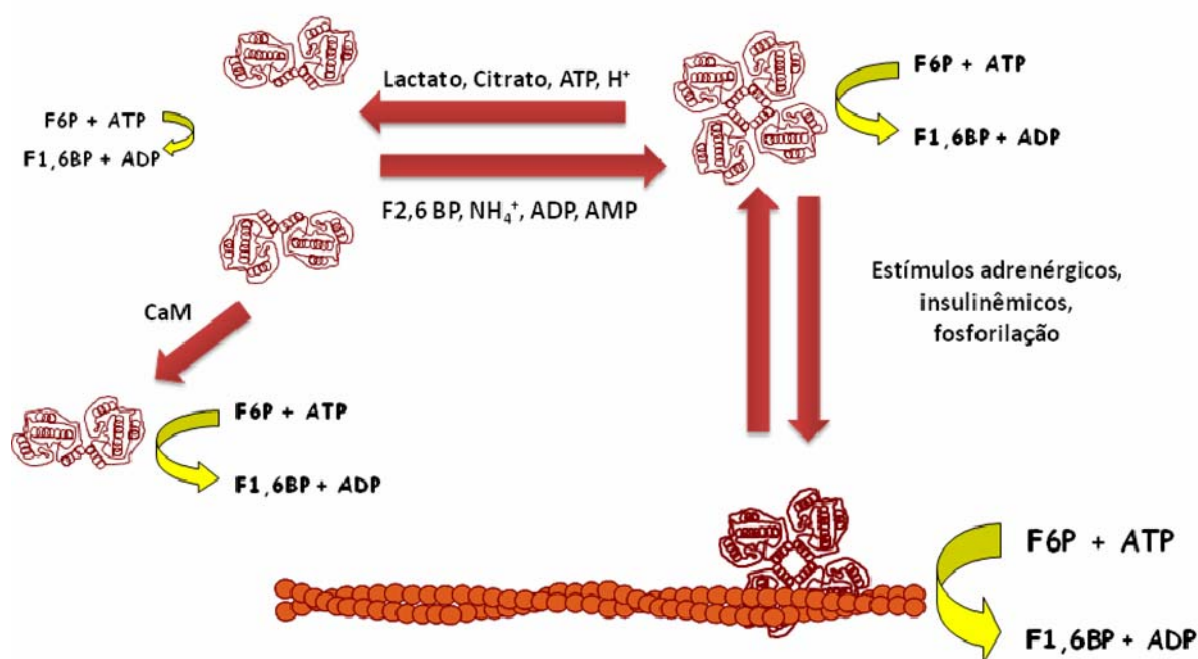


Figura 5 – Regulação e interação da Fosfofrutocinase-1 com elementos do citoesqueleto.

O modelo esquemático apresenta os diferentes estados oligoméricos da PFK sendo regulados pelos principais moduladores alostéricos da enzima e por sua associação aos filamentos de actina e a consequente alteração da sua atividade catalítica. Modelo esquemático proposto pelo LabECoM.

1.4. SALICILATOS: ÁCIDO ACETILSALICÍLICO E ÁCIDO SALICÍLICO

O ácido acetilsalicílico (AAS) é o fármaco mais usado no mundo, com seu consumo excedendo à 20.000 toneladas por ano e é assunto de vários artigos científicos (Vane e Botting, 2003; Jeffreys, 2004). A história do AAS remonta muitos anos com o início do uso de preparações de plantas que continham salicilato. Em 1874, a salicilina, derivada da casca do salgueiro branco, já era utilizada com êxito para reduzir a febre, a dor e a inflamação da febre reumática. No mesmo ano, a síntese orgânica e comercial do ácido salicílico (AS) foi formulada (Vane e Botting, 2003), como mostrado abaixo na Figura 6.

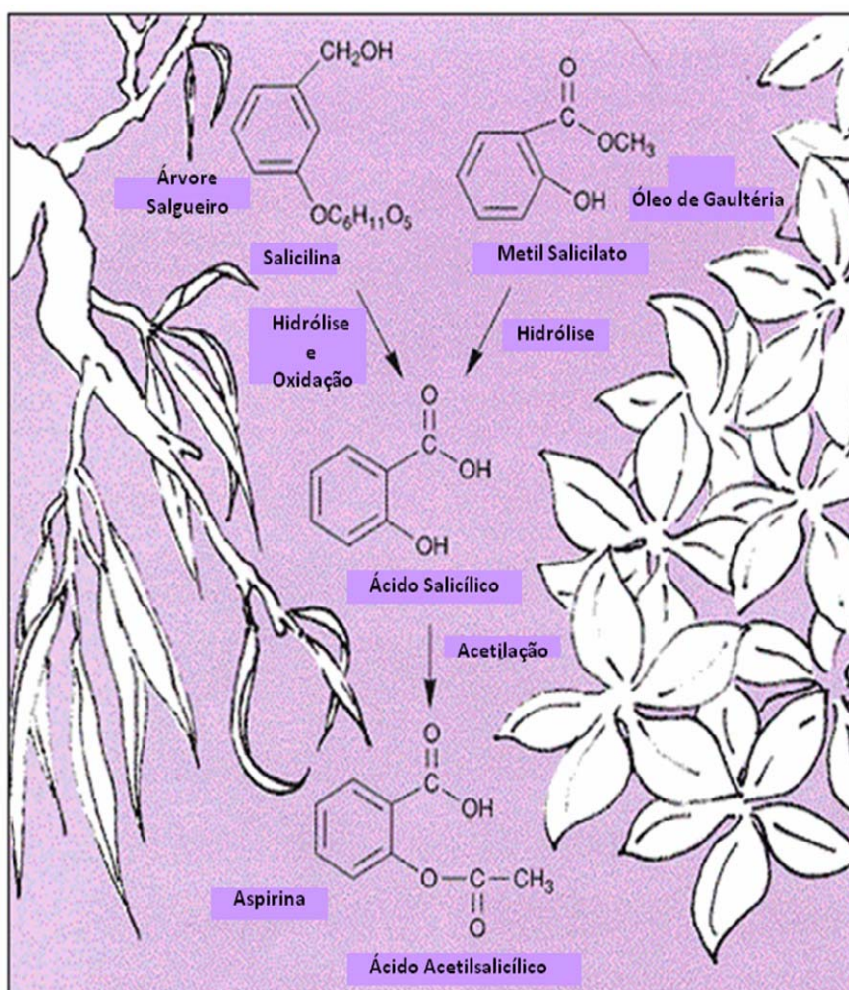


Figura 6 – Síntese do Ácido Acetilsalicílico.

Disponível em: <http://www.mdidea.com/products/herbextract/salicin/data.html>. Acessado em maio de 2007.

Posteriormente, com o sucesso do ácido salicílico, a indústria farmacêutica buscou um derivado de eficácia comparável ou superior, porém que trouxesse menos efeitos adversos, como dores no estômago. Então, achou-se o caminho para a acetilação do grupo hidroxila do anel benzênico do ácido salicílico, formando o ácido acetilsalicílico (Aspirina[®]), como mostrada na Figura 7.

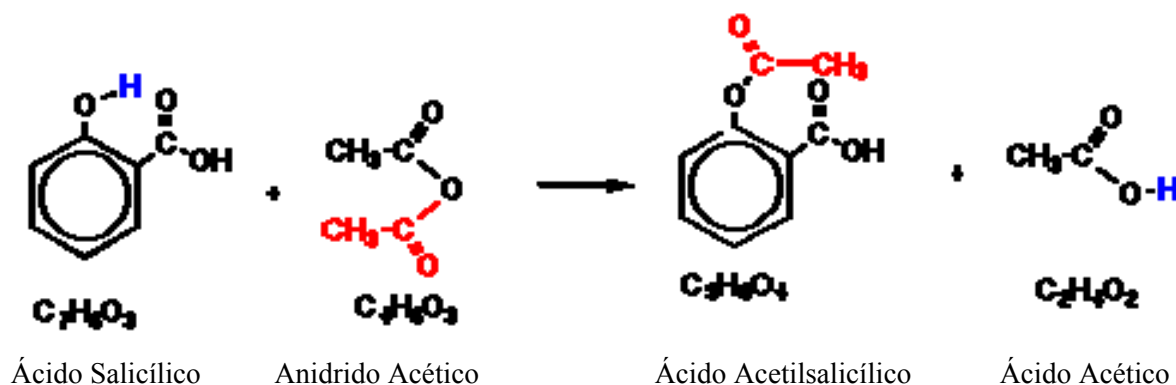


Figura 7 – Acetilação do ácido salicílico produzindo o ácido acetilsalicílico. O anidrido acético reage com o grupo hidroxil do ácido salicílico formando ácido acetilsalicílico. Figura obtida no site <http://www.reachoutmichigan.org/funexperiments/quick/csustan/aspirin.htm>. Acessada em outubro de 2008.

A biodisponibilidade oral dos comprimidos de AAS é de aproximadamente 40 a 50% acima da dose requerida. Contudo uma baixa biodisponibilidade foi reportada em algumas preparações, como comprimidos revestidos e microcápsulas. Segundo Caldwell e col., (1980), o AAS é rapidamente hidrolizado no trato gastrointestinal, sendo o ácido salicílico seu principal metabólito. O AS é posteriormente metabolizado em ácido salicílicúrico, ácido salicílic glucorônico e ácido genticólico. A concentração máxima do AAS no plasma ocorre 30 à 40 minutos após sua ingestão (Pedersen e FitzGerald, 1984) e este fármaco tem uma pequena meia-vida na circulação (15-20 minutos). É um ácido fraco com pKa de 3.5 (Nelson e Cox, 2000). A absorção requer a passagem pela membrana plasmática numa taxa que é determinada pela polaridade da molécula (Awtry e Loscalzo, 2000).

A biotransformação do AAS difere entre espécies e gêneros, sendo bem documentada, tanto em animais, quanto em humanos (Kehinde *et al.*, 2003). As principais vias metabólicas que levam à inativação e eliminação dos antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) são a oxidação por enzimas do citocromo P450, conjugação do glucuronido com a uridina-5'-difosfato (UDP)-glucuronosiltransferases (UGTs) e, em menor escala, a conjugação de sulfatos (sulfotransferases) (Ulrich *et al.*, 2006).

O AAS é um dos numerosos AINEs prescrito como analgésico, antipirético e agente antiinflamatório. Entre outros usos, incluem-se, o tratamento ou profilaxia dos estados hipercoagulantes das plaquetas, em pacientes com acidente vascular cerebral (AVC), na doença arteriocoronariana (DAC) e na trombose (Kehinde *et al.*, 2003). Antes de 1971 sabia-se pouco sobre o real mecanismo de ação de fármacos como o AAS, porém neste mesmo ano foi publicado na Nature o artigo “*Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs*” (Vane, 1971). Hoje, sabe-se que este fármaco é aproximadamente 50 a 100 vezes mais potente na inibição da ciclooxigenase-1 (COX-1), do que da ciclooxigenase (COX-2) (Cipollone *et al.*, 1997).

A absorção rápida do AAS mostra uma mensurável inibição da função plaquetária com 60 minutos (Patrono *et al.*, 1998; Jimenez *et al.*, 1992). Esses efeitos antiplaquetários estão associados a inibição da agregação plaquetária dependente do tromboxano A₂ (TXA₂) (Fitzgerald *et al.*, 1983). De fato, o que melhor caracteriza o conhecido mecanismo de ação do AAS é a sua capacidade de inativar irreversivelmente a atividade da enzima ciclooxigenase (COX) pela acetilação do resíduo de serina, como mostrado na Figura 8, levando ao bloqueio do sítio ativo da enzima pela inibição da síntese de prostaglandinas (PG) e tromboxanos (Nelson e Cox, 2000; Patrono *et al.*, 2004). Desta forma, o AAS é capaz de inibir as isoformas COX-1, COX-2 (Nelson e Cox, 2000) e COX-3 (Chandrasekharan *et al.*, 2002).

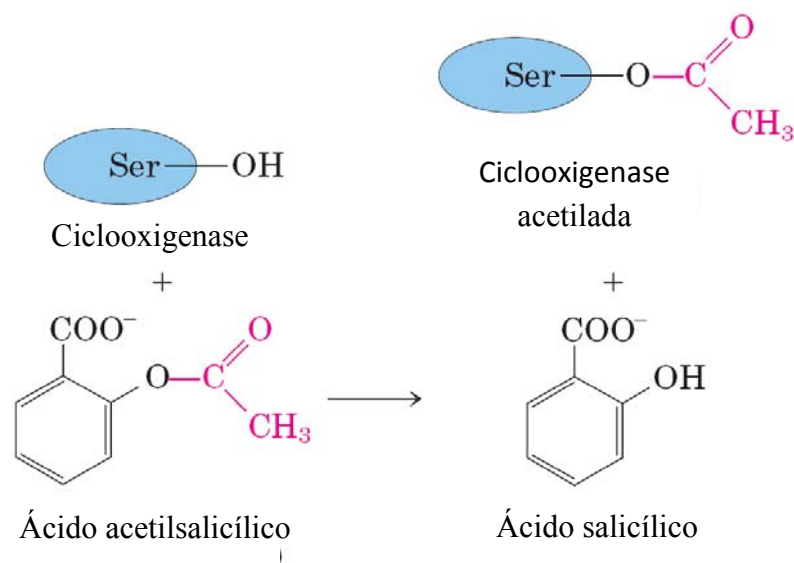


Figura 8 – Acetilação da ciclooxygenase pelo ácido acetilsalicílico. Nelson e Cox, 2000.

1.4.1. EFEITOS DOS SALICILATOS NO METABOLISMO DE DIFERENTES LINHAGENS CELULARES

Atualmente existe um grande interesse na ação dos salicilatos como agentes quimiopreventivos (Borthiwick *et al.*, 2006). O mecanismo molecular dos AINEs, especialmente dos salicilatos e seus efeitos quimiopreventivos ainda não são bem compreendidos, porém uma das explicações mais aceita baseia-se na redução da síntese de PG pela inibição da atividade da COX, sendo que a expressão de COX-2 já foi também associada com a progressão de tumores (Borthiwick *et al.*, 2006). Entretanto, algumas evidências sugerem que uma grande parte do potencial antiproliferativo do AAS não está correlacionado exclusivamente com a inibição da atividade da COX (Richter *et al.*, 2001; Borthiwick *et al.*, 2006). Contudo, a alta expressão de COX-2 em adenomas e carcinomas de cólon retal está associada com a alta densidade microvascular, embora esse mecanismo não esteja totalmente elucidado (Funk, 2001). Neste contexto, os salicilatos

apresentam um importante papel por suas propriedades antiangiogênicas, uma vez que o AS e AAS inibem a angiogênese em igualdade de potência. Isso seria consistente com a idéia de que esta inibição poderia ocorrer através de uma via independente de COX (Borthwick *et al.*, 2006).

Recentemente, pesquisadores investigaram o efeito do AAS na proliferação e apoptose de células SW480, uma linhagem celular de câncer de cólon retal humano que não expressa COX-2 (Lai *et al.*, 2008). Após tratamento por 72 horas com AAS em concentrações que variaram de 2,5 a 10 mM, foram observadas típicas alterações morfológicas da apoptose nestas células. Além disso, os autores mostraram que o AAS poderia inibir a expressão de Bcl-2 e aumentar a expressão de Bax que são proteínas que modulam a apoptose de maneira negativa e positiva, respectivamente, sendo que o declínio na taxa de Bcl-2/Bax contribuiu para a indução da apoptose (Lai *et al.*, 2008).

Petersen e col. (2005) mostraram que uma dose baixa de AAS protege as células contra o estresse oxidativo e induz a apoptose. Estes achados são significantes, particularmente, em linhagens de células epiteliais (Petersen *et al.*, 2005), ilustrando a evidência do potencial antioxidante do AAS. Outros estudos ainda sugerem que o fármaco possui propriedades antiproliferativas em diferentes linhagens de células, incluindo células de tumor de cólon retal humano (Bellosillo *et al.*, 1998; Din *et al.*, 2004), células de câncer gástrico (Wong *et al.*, 1999), células β de leucemia linfocítica crônica (Bellosillo *et al.*, 1998), linhagem de célula de leucemia mielóide (Klampfer *et al.*, 1999), células de músculo vascular liso (Marra *et al.*, 2000; Brooks *et al.*, 2003), células de adenocarcinoma de cólon (Shiff *et al.*, 1996), além de vários outros tipos de células (Mahdi *et al.*, 2006).

Entretanto, não há relatos na literatura acerca dos possíveis efeitos dos salicilatos sobre tumores mamários, muito embora sejam estes o segundo principal tipo de tumor em número de casos e em morte no mundo. Nesse sentido, estudos relacionando os efeitos de

salicilatos sobre o metabolismo de células derivadas de tumor mamário humano seriam importantes para sugerir possíveis utilizações dos AINEs na prevenção e no tratamento deste tipo de tumor.

2. OBJETIVOS

Considerando-se a relação evidenciada acima entre as alterações metabólicas relacionadas ao câncer e a enzima PFK e, ainda, a possibilidade de tratamento de alguns sintomas com o uso de AAS, esta dissertação apresenta como objetivos:

- Estudar os efeitos do AAS e do salicilato sobre a estrutura e a cinética da PFK purificada;
- Avaliar o comprometimento da atividade da enzima em homogeneizados de tecidos, eritrócitos humanos e na linhagem de células C2C12, tratados com AAS e AS;
- Avaliar os efeitos do AAS e do AS no consumo de glicose, na produção de lactato, na atividade da PFK e na sobrevivência de linhagem de células de carcinoma mamário MCF-7;
- Propor um mecanismo de ação celular para o AAS e o AS buscando correlacioná-lo às alterações metabólicas observadas em câncer.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

ATP, ADP e F6P foram obtidos da Sigma-Aldrich Brasil Ltda (São Paulo, SP, Brasil). ^{32}P i foi obtido do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (SP). AAS e AS, procedentes da Farmos, foram gentilmente cedidos pela Farmácia Universitária da Faculdade de Farmácia (UFRJ). Células de carcinoma mamário humano (MCF7) e de mioblastos (C2C12) foram obtidas do Banco de Células do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, UFRJ, Brasil. PFK purificada, homogeneizado de músculo de camundongo e eritrócitos humanos foram preparados como descrito abaixo. A f-actina foi gentilmente cedida pela Profa. Martha Sorenson (Laboratório de Química Fisiológica da Contração Muscular - UFRJ).

3.2. PURIFICAÇÃO DA FOSFOFRUTO CINASE-1

A PFK de músculo esquelético de coelho foi purificada segundo o protocolo proposto por Kemp (1975), adaptado do original descrito por Parmeggiani *et al.*, (1966).

Extração: O coelho foi sacrificado por deslocamento cervical, seguido de sangramento por corte dos vasos do pescoço, sendo os músculo da região dorsal e das patas traseiras removidos, limpos e mantidos em gelo. A massa muscular foi então processada em um moedor de carne até formar uma pasta que foi depois pesada e triturada em liquidificador com 3 volumes do tampão 1 (30 mM NaF, 4 mM EDTA e 1 mM ditiotreitól, pH 7,5) por 30 segundos para homogeneização. A mistura foi então centrifugada a 10.000 g, por 30 minutos,

em centrífuga refrigerada, a 4 °C. O sobrenadante foi filtrado através de gaze para a remoção dos resíduos lipídicos e o pH foi ajustado para 6,8 com adição de 1,5 M Tris (pH 8,8).

Precipitação com Isopropanol: A mistura foi mantida em banho de gelo com sal grosso mantendo a temperatura numa faixa entre -5°C e 0°C; foi adicionado álcool isopropílico gelado (1/5 do volume total do extrato), gota a gota, em constante agitação, por 20 minutos. O precipitado foi coletado por centrifugação a 10.000 g por 30 minutos, em centrífuga refrigerada a 4°C, e dissolvido em 1/15 da fração inicial em tampão 2 (0,1 M Tris-fosfato, 0,2 mM EDTA, pH 8,0). Esta suspensão foi dialisada por 20 horas contra o mesmo tampão para a remoção do isopropanol remanescente.

Tratamento Quente: A suspensão dialisada foi transferida para um becker e colocada em banho maria a 70°C. Sob agitação, a temperatura foi mantida entre 57 e 59°C por 3 minutos quando, então, foi retirada e condicionada em banho de gelo, também sob agitação, até atingir a temperatura de 5°C. A suspensão foi centrifugada por 20 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C. O sobrenadante foi reservado e o pellet foi ressuspense em tampão 2 e centrifugado novamente. O segundo sobrenadante foi adicionado ao primeiro.

Fracionamento por Sulfato de Amônio: Ao sobrenadante, mantido em banho de gelo sob agitação, foi adicionado sulfato de amônio sólido até atingir 38% de saturação (21,3 g / 100 mL da solução inicial). Após 30 minutos, o precipitado foi removido por centrifugação a 10.000 g , por 20 minutos, e ao sobrenadante foi adicionado sulfato de amônio até atingir 55% de saturação (30,8 g / 100 mL da solução inicial). O sedimento foi coletado por centrifugação a 10.000 g por 20 minutos e dissolvido em tampão 3 (50 mM glicerolfosfato, 2 mM EDTA e de 2 mM ATP, pH 7,2).

Cristalização: A solução foi dialisada em banho de gelo contra o tampão 3 adicionado de sulfato de amônio até 38% de saturação (21,3 g / 100 mL). Após 24 horas o tampão de diálise foi trocado pelo mesmo volume de tampão 3 adicionado de sulfato de amônio até 40% de saturação (22,6 g / 100 mL). A cristalização se inicia após aproximadamente uma semana. Depois da diálise, a suspensão foi centrifugada a 1.500 g por 10 minutos em centrífuga clínica a 4°C, e o precipitado foi dissolvido em tampão 3 e guardado em isopor com gelo dentro da geladeira.

3.3. HOMOGENEIZADO DE MÚSCULO ESQUELÉTICO DE CAMUNDONGO

Camundongos suíços machos (20 – 25 g) foram mortos por deslocamento cervical e os músculos da coxa foram rapidamente removidos e limpos para remoção dos tecidos conectivo e adiposo. Os músculos foram pesados e homogeneizados por 30s com Polytron (Brinkmann Instruments, Westbury, NY, USA) na presença de 3 volumes do Tampão de Homogeneização (pH 7,5) contendo 30 mM KF, 4 mM EDTA, 15 mM 2-mercaptoetanol e 250 mM Sacarose.

3.4. DOSAGEM DE PROTEÍNA

O teor de proteína presente nas amostras foi quantificado de acordo com Bradford, (1976) utilizando albumina sérica bovina como padrão.

3.5. SÍNTESE DE ATP RADIOATIVO

O [γ - ^{32}P] ATP foi preparado de acordo com Maia *et al.*, (1983). A síntese do [γ - ^{32}P]ATP acontece em um meio contendo 0.115 mM Tris-HCl (pH 9,0), 27,6 μM MgCl_2 , 13,8

μM DTT, $0,276 \mu\text{M}$ L- α -glicerofosfato, $1,15 \mu\text{M}$ β -NAD, $0,115 \mu\text{M}$ ADP e $2,3 \mu\text{M}$ Piruvato pela adição de $1 \text{ mL } ^{32}\text{P}$ e $40 \mu\text{L}$ de um coquetel enzimático de marcação. Esse coquetel de enzimas contém glicerol-3-fosfato desidrogenase, triose-fosfato isomerase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, 3-fosfoglicerato quinase e lactato desidrogenase. Durante 90 minutos esse meio de reação foi incubado em temperatura ambiente. Após este período, o ^{32}P livre foi retirado da mistura através de uma coluna DOWEX 1 x 10 Mesh ativada em 1 M de HCl. Em seguida o $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ formado foi aliqotado e avaliado através de contagem em cintilação líquida e depois mantido a -20°C .

3.6. ENSAIO RADIOMÉTRICO DA ATIVIDADE DA FOSFOFRUTOCINASE-1

A atividade da enzima foi avaliada de acordo com Sola-Penna *et al.*, (2002) com alterações introduzidas por Zancan e Sola-Penna (2005a e b). Os ensaios foram disparados com $5 \mu\text{g/mL}$ de proteína e realizados a 37°C em 1 mL de meio de reação, contendo 50 mM tris-HCl (pH 7,4), 5 mM MgCl_2 , 5 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 mM frutose-6-fosfato e $0,1 \text{ mM}$ $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ($4\mu\text{ci}/\mu\text{mol}$). A reação foi interrompida pela adição de 1 mL de carvão ativo suspenso em uma solução de HCl $0,1 \text{ N}$ e manitol $0,5 \text{ M}$ (25 g de carvão por litro de solução). A suspensão foi, então, centrifugada a 2.000 g por 10 min e a radioatividade presente em $0,4 \text{ mL}$ do sobrenadante foi mensurada em um contador de cintilação líquida. Controles para cada tubo foram submetidos às mesmas condições experimentais na ausência de frutose-6-fosfato. A atividade da PFK foi avaliada pela formação de $[1\text{-}^{32}\text{P}]\text{frutose-1,6-bifosfato}$ em função do tempo de reação.

A modulação da atividade fosfofrutocinásica pelo AAS foi mensurada em 1 minuto após a incubação da enzima na presença de diferentes concentrações do fármaco ($1 - 10 \text{ mM}$). Nos experimentos realizados em função do tempo de incubação ($3 - 60 \text{ minutos}$), foi usado 3

ou 10 mM de AAS e a reação foi interrompida pela adição de 1 mL de carvão ativo suspenso em uma solução de HCl 0,1 N e manitol 0,5 M. Nos experimentos de titulação de proteína (0,8 - 5 µg/mL) na presença do fármaco, a atividade da PFK foi mensurada seguindo o protocolo acima descrito.

3.7. ENSAIO ESPECTROFOTOMÉTRICO DA ATIVIDADE DA FOSFOFRUTOCINASE-1 (SISTEMA ACOPLADO)

Nestes ensaios a PFK purificada de músculo esquelético de coelho foi incubada por 1 hora a 37°C, na presença de diferentes concentrações de AAS ou AS (1 - 10 mM), na presença ou ausência de 1 mg/mL de f-actina. A atividade fosfofrutocinásica foi avaliada em um meio reacional contendo 1 mM frutose 6-P, 1 mM ATP, 5 mM NADH, 2 mU/mL aldolase, 2 mU/mL triosefosfato isomerase, 2 mU/mL α -glicerofosfato desidrogenase e 4 µg/mL de proteína, num volume final de 200 µL. A reação foi iniciada pela adição da proteína e a oxidação de NADH foi acompanhada pela medida do decréscimo na absorvância em 340 nm em um leitor de placas de 96 poços. Brancos foram realizados na ausência das enzimas do sistema acoplado descrito acima.

3.8. INTERAÇÃO ENZIMA-CITOESQUELETO

Eritrócitos humanos (40% do hematócrito) foram pré-incubados com diferentes concentrações de AAS durante 1 h em 37 °C. Após a incubação, os eritrócitos foram lisados com tampão hipotônico de lise gelado. Uma alíquota (0.1 mg/mL) foi retirada para o ensaio do hemolisado total. O hemolisado restante foi centrifugado em 90.000 g por 20 min. O precipitado, contendo as membranas das células majoritariamente, foi ressuspensão em

tampão. A atividade da PFK de eritrócitos presente no hemolisado total e na fração ligada na membrana das células foi avaliada através do método radiométrico.

3.9. CULTURA DE CÉLULAS, VIABILIDADE, CONSUMO DE GLICOSE E PRODUÇÃO DE LACTATO.

Células de carcinoma mamário humano MCF-7 e células de mioblastos C2C12 foram cultivadas em meio DMEN (Meio de Eagle modificado por Dulbecco) suplementado com 10% FBS (soro fetal bovino) até a confluência ser alcançada, como descrito por Holandino *et al.*, (2001).

O meio de cultura das células MCF-7 foi removido e foram acrescentadas no meio fresco, as concentrações de AAS e AS (0,5-10 mM), respectivamente. Os fármacos foram previamente dissolvidos no próprio meio de cultura e o pH foi ajustado para 7,4, descartando, assim, qualquer possibilidade de efeito do pH sobre as culturas. Após 24 h de incubação, para a verificação da viabilidade celular, as células foram usadas para fazer o ensaio de MTT, onde foram adicionados 5 mg/mL do reagente MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio) (Sigma-Aldrich Co. MA, E.U.A.). Após 3 horas na incubadora, o reagente foi removido e os cristais de formazan formados foram dissolvidos em 200 µl de DMSO (dimetilsulfóxido). Posteriormente, o conteúdo de formazan foi avaliado em um leitor placas de 96 poços fixado em 560 nm, subtraindo o *background* em 670 nm. Posteriormente, o meio de cultura com as células MCF-7 foi retirado e utilizado para avaliar o consumo de glicose e a produção de lactato como descrito por Leite *et al.*, (2007) e Meira *et al.*, (2005), onde foi calculado o conteúdo de glicose que permaneceu no meio de cultura usando o sistema acoplado de enzimas contendo glicose oxidase/catalase (Glucox 500, Doles Ltda, GO, Brasil). Já a produção de lactato foi avaliada calculando o conteúdo de lactato no meio de cultura

incubado na presença de lactato desidrogenase e NAD^+ , sendo mensurada a formação de NADH espectrofotometricamente em 340 nm.

As células C2C12 foram mantidas na presença de diferentes concentrações de AAS e AS (0,5-10 mM) por diferentes períodos (1, 12 e 24h). Após a incubação, o meio de cultura contendo o fármaco foi retirado e as células foram tratadas com tripsina, centrifugadas (3.000 rpm x 3 min) e ressuspensas para atingirem a concentração final de 1×10^6 cel/mL em tampão 10 mM fosfato de potássio (pH 7,4). Uma alíquota de 100 μL foi misturada com o meio de reação para para medir a atividade da PFK, por espectrofotometria.

3.10. ENSAIO DE REVERSIBILIDADE ATRAVÉS DA RETIRADA DO FÁRMACO POR DIÁLISE

A PFK purificada de músculo esquelético foi incubada com 1 mM ou 10 mM AAS ou AS durante 1 h à 37 °C. A mistura da reação foi, então, dialisada em tampão 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 5 mM MgCl_2 e 5 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ por 24 h à 4°C. A atividade residual da PFK foi mensurada pelo método espectrofotométrico.

3.11. ENSAIO DE FLUORESCÊNCIA INTRÍNSECA

As medições de fluorescência intrínseca foram feitas utilizando-se um fluorímetro JASCO 6300 (INC.MD. EUA), como descrito por Marinho-Carvalho *et al.*, (2006). As amostras foram excitadas no comprimento de onda de 280 nm em meio de reação contendo 100 mM Tris-HCl, nas concentrações especificadas em cada ensaio de PFK em diferentes concentrações de salicilatos. A emissão de fluorescência foi medida entre 300 e 400 nm, sendo o centro de massa (*c.m.*) calculado com base na fórmula:

$$c.m. = \frac{\sum \lambda \cdot I\lambda}{\sum I\lambda}$$

Onde : Σ = somatório

$I\lambda$ = intensidade de fluorescência em um dado comprimento de onda

λ = comprimento de onda

O cálculo de centro de massa é utilizado para avaliar o estado oligomérico da PFK, uma vez que a enzima dissociada apresenta os triptofanos mais expostos ao meio aquoso e, portanto, a fluorescência emitida por esses triptofanos é de menor energia. Por conseguinte, o centro de massa de uma população de tetrâmeros é menor do que o parâmetro medido em relação a uma população de dímeros, como descrito em algumas publicações recentes (Zancan *et al.*, 2007a; Leite *et al.*, 2007; Faber-Barata e Sola-Penna, 2005; Marinho-Carvalho *et al.*, 2006; Zancan *et al.*, 2007b; Zancan *et al.*, 2008).

3.12. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Análises estatísticas e regressões não-lineares foram feitas usando o programa SigmaPlot 10.0 integrado com o pacote SigmaStat 3.5 (Systat, CA, USA). Os valores $P \leq 0.05$ foram usados para considerar estatisticamente diferentes os valores médios.

4 RESULTADOS

4.1 EFEITOS DOS SALICILATOS NA ATIVIDADE DA FOSFOFRUTOCINASE-1 PURIFICADA DE MÚSCULO ESQUELÉTICO DE COELHO.

Inicialmente, foram testados os efeitos do AAS sobre a PFK purificada de músculo esquelético de coelho, através do ensaio radiométrico que avalia diretamente a atividade da PFK, dispensando o uso de enzimas auxiliares. Através desses ensaios observamos uma inibição da atividade da PFK de forma dependente da dose de AAS (Figura 9), apresentando um $I_{0,5}$ (concentração de substrato para a qual é atingida a metade da inibição máxima de uma dada reação enzimática) de $2,3 \pm 0,2$ mM. Embora esses ensaios tenham sido realizados sem pré-incubação da enzima com o fármaco, a inibição ocorre desde o primeiro momento de contato da PFK com o AAS, e o padrão de inibição é mantido durante, pelo menos, a primeira hora de reação, mostrando uma estabilidade do efeito inibitório (Figura 10).

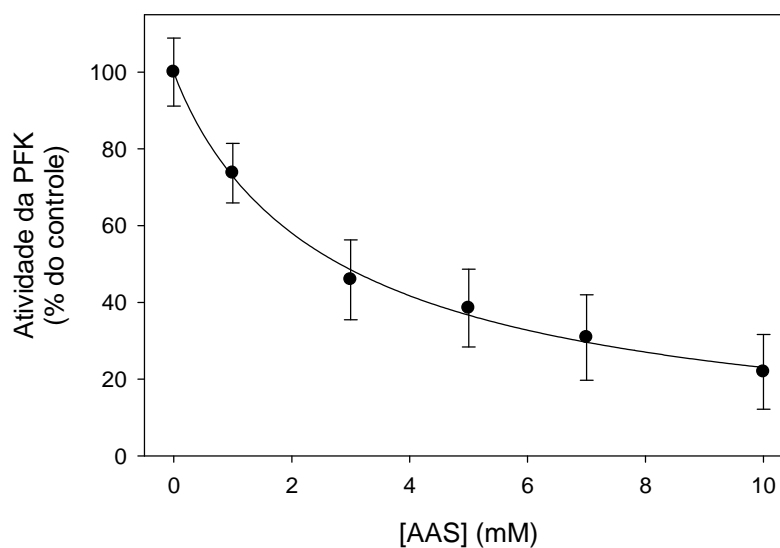


Figura 9 – Efeitos do ácido acetilsalicílico na atividade catalítica da PFK purificada. A atividade da PFK foi avaliada através do ensaio radiométrico. Os dados representam a média \pm erro-padrão de no mínimo 5 experimentos ($n \geq 5$).

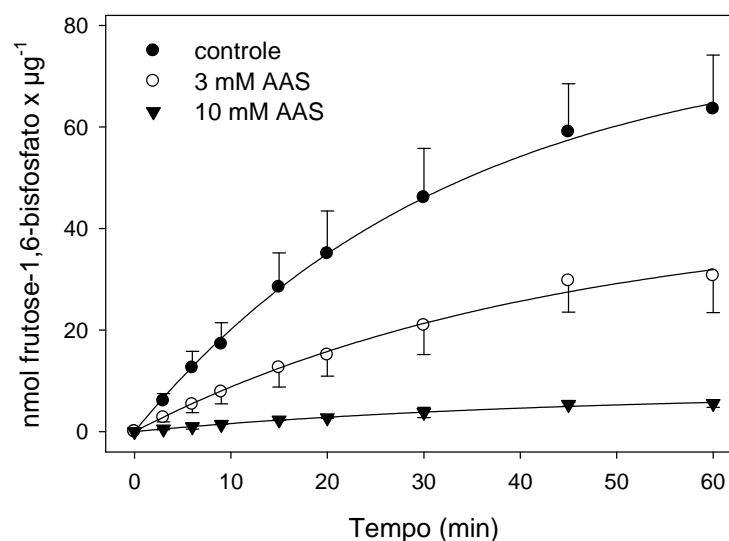


Figura 10 – Curva de tempo da Fosfofrutocinase-1 na ausência ou na presença de 3 e 10 mM de ácido acetilsalicílico. A atividade da PFK foi avaliada através do ensaio radiométrico. Os dados representam a média \pm erro-padrão de no mínimo 5 experimentos ($n \geq 5$).

Adicionalmente, o AAS é capaz de inibir a PFK numa ampla variação de concentrações da enzima, como pode ser visto na curva de titulação da enzima na ausência e na presença de 10 mM de AAS (Figura 11). Particularmente, esse tipo de curva foi anteriormente utilizado para avaliação do grau de oligomerização da PFK (Marinho-Carvalho *et al.*, 2006; Zancan *et al.*, 2008). Isso é possível graças à propriedade da PFK de apresentar uma baixa taxa catalítica na conformação dimérica e uma alta taxa catalítica na conformação tetramérica. Assim, uma vez que o estado oligomérico da enzima é direcionado pela sua concentração no meio (quanto mais concentrada, mais complexa a estrutura quaternária), pode-se observar um aumento da atividade específica da PFK com o aumento da concentração da enzima no meio. Isso nos permite calcular a constante de associação dos dímeros para a formação de tetrâmeros, ajustando os parâmetros da equação abaixo aos dados experimentais da Figura 11:

$$V = D + \frac{T \cdot [PFK]^n}{K_a + [PFK]^n}$$

onde V é a velocidade calculada para uma dada concentração de PFK ($[PFK]$), D é a velocidade predita para uma condição onde haveria 100 % de dímeros da enzima, T é a velocidade predita para uma condição onde haveria 100 % de tetrâmeros da enzima, K_a é a constante de associação entre dímeros para a formação de tetrâmeros, e representa a concentração de PFK necessária para a existência de 50 % da forma dimérica e 50 % da forma tetramérica e n é o índice de cooperatividade para esse fenômeno. Com o ajuste da equação aos dados apresentados na Figura 11, vemos que há um aumento da K_a de $5,0 \pm 0,6 \mu\text{g/mL}$ no controle para $36,2 \pm 2,1 \mu\text{g/mL}$ na presença de 10 mM de AAS. Esses dados indicam que o AAS pode estabilizar a enzima na forma dimérica, por apresentar uma maior constante de afinidade, representando um possível mecanismo para a inibição promovida pelo fármaco.

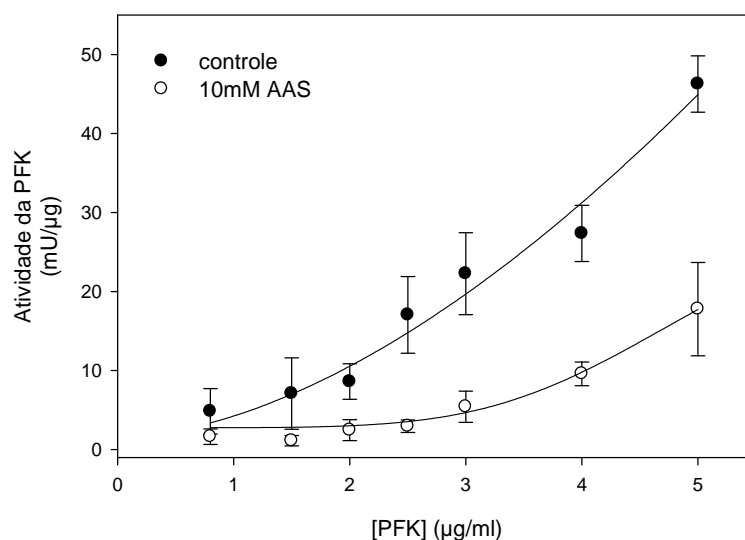


Figura 11 – Curva de atividade específica na ausência e na presença de 10 mM de ácido acetilsalicílico. A atividade da PFK foi avaliada através do ensaio radiométrico. Os dados representam a média \pm erro-padrão de no mínimo 5 experimentos independentes ($n \geq 5$).

4.2 EFEITOS DOS SALICILATOS NA ESTRUTURA QUATERNÁRIA DA FOSFOFRUTO CINASE-1

Com o intuito de avaliar os efeitos dos salicilatos na estrutura oligomérica da PFK, passamos a estudar o centro de massa do espectro de fluorescência intrínseca da PFK. Estudos publicados recentemente pelo nosso laboratório têm validado que tetrâmeros apresentam o centro de massa do espectro de fluorescência intrínseca mais deslocado para a região azul do espectro, de alta energia e baixo comprimento de onda, quando comparados com dímeros, devido a menor exposição dos triptofanos presentes na interface de interação entre os dímeros para a formação dos tetrâmeros (Marinho-Carvalho *et al.*, 2006; Leite *et al.*, 2007; Zancan *et al.*, 2007a e 2007b; Zancan *et al.*, 2008). Então, quando os dímeros são formados, pode-se observar uma pequena (2-4 nm em média) mudança no centro de massa para a região do vermelho (baixa energia, alto comprimento de onda).

Como mostrado na Figura 12A, AAS e AS promovem uma mudança do centro de massa do espectro de fluorescência intrínseca da PFK para a região do vermelho, que ocorre paralelamente a inibição da atividade da enzima, como observado na Figura 12 B. Esses resultados sugerem que os salicilatos estabilizam a conformação dimérica da PFK, inibindo a atividade da enzima, além de corroborarem com os resultados apresentados na Figura 11. Além disso, nesses experimentos o AS mostrou-se ligeiramente mais eficiente do que o AAS, sugerindo que os efeitos inibitórios do AAS não são dependentes da acetilação da PFK, uma vez que o AS, que não é capaz de acetilar proteínas, promoveu um efeito similar e mais potente do que o AAS.

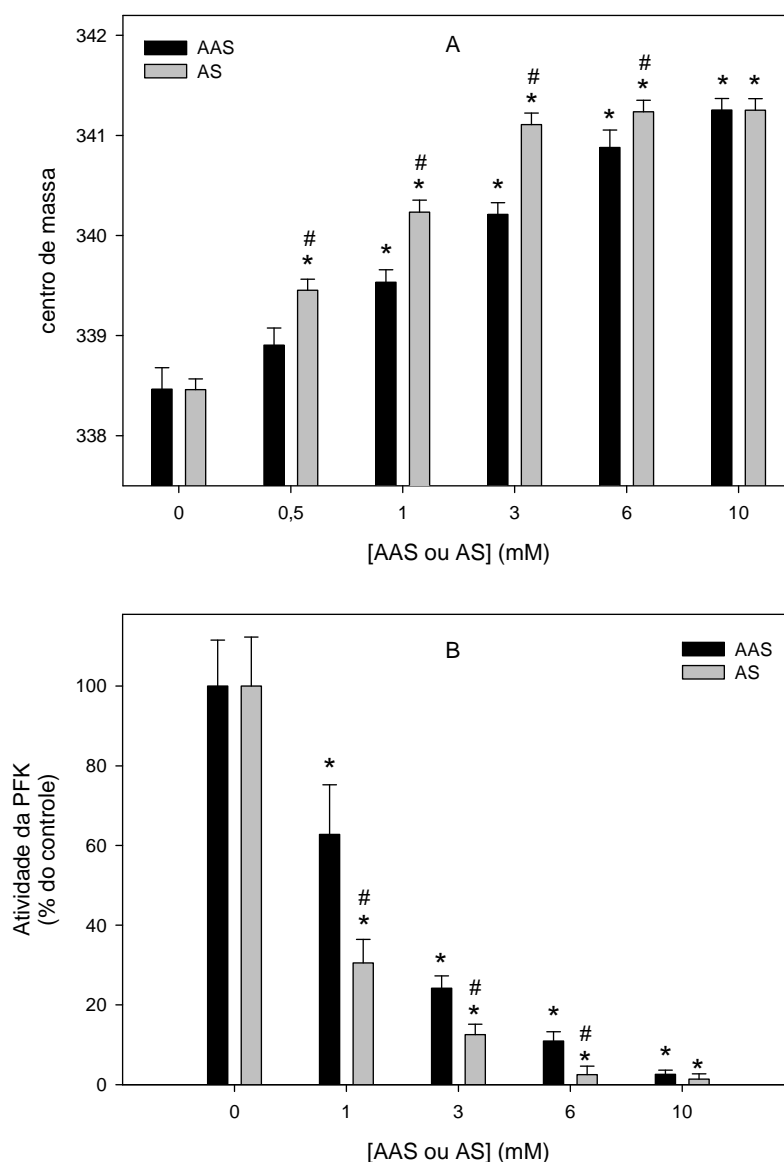


Figura 12 – Efeitos do ácido acetilsalicílico e ácido salicílico na relação estrutura/função da Fosfofrutocinase-1. PFK purificada foi incubada por 1 hora na presença das concentrações de AAS e AS indicadas em cada painel. A enzima tratada foi usada para avaliar a estrutura quaternária, calculando o centro de massa do espectro de fluorescência intrínseca (Painel A), e a atividade catalítica, através de ensaio espectrofotométrico (Painel B). Os dados representam a média \pm erro-padrão de no mínimo 4 experimentos independentes ($n \geq 4$). * $P < 0,05$ comparando com o controle, na ausência de fármacos. # $P < 0,05$ comparando a mesma concentração de AAS. O teste t de Student foi usado para avaliar as diferenças estatisticamente significativas entre os valores.

Para corroborar essa última conclusão, resolvemos testar a reversibilidade dos efeitos dos salicilatos sobre a atividade da PFK. Então, pré-incubamos a enzima na presença de duas concentrações de AAS e AS (1mM e 10mM) por 1 h e avaliamos a atividade catalítica da PFK imediatamente após a pré-incubação e depois da mistura ser dialisada por um período de 24 h à 4 °C para a retirada dos fármacos. Os experimentos mostraram que o efeito inibitório dos salicilatos foram revertidos após os componentes serem removidos através de diálise, já que a atividade da PFK não teve diferença significativa quando comparada com o controle (Figura 13).

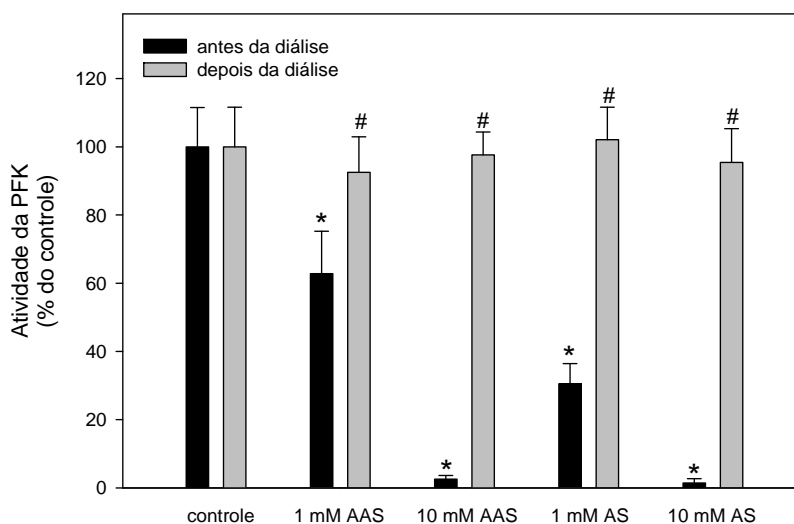


Figura 13 - Reversibilidade dos efeitos do ácido acetilsalicílico e ácido salicílico na atividade da Fosfofrutocinase-1 purificada. PFK purificada foi incubada por 1 hora na presença das concentrações de AAS e AS indicadas em cada painel. Após incubação, uma alíquota da amostra foram submetidas à diálise por 24 h para remover o fármaco. A atividade catalítica da PFK foi calculada imediatamente após o tratamento com os fármacos (antes da diálise) e após remoção (depois da diálise). Os dados representam a média \pm erro-padrão de no mínimo 5 experimentos independentes ($n \geq 5$). * $P < 0,05$ comparando com o controle, na ausência do fármaco. # $P < 0,05$ comparando a mesma condição, antes da diálise. O teste t de Student foi usado para avaliar as diferenças estatisticamente significativas entre os valores.

4.3 EFEITOS DOS SALICILATOS NA ATIVIDADE DA FOSFOFRUTOCINASE-1 NA PRESENÇA DE ACTINA.

Dentre todas as enzimas da via glicolítica que se associam ao citoesqueleto, a PFK é a enzima que se liga com maior afinidade à actina, o principal constituinte dos filamentos finos do músculo esquelético, sendo este um importante mecanismo regulatório desta enzima (Luther e Lee, 1986; Alves e Sola-Penna, 2003; Silva *et al.*, 2004). A ligação da PFK na f-actina aumenta a atividade da enzima e, conseqüentemente, a taxa glicolítica nas células, devido a estabilização da conformação tetramérica da enzima (Coelho *et al.*, 2007; Leite *et al.*, 2007; Alves e Sola-Penna, 2003).

Então, decidimos testar se a presença de f-actina poderia prevenir o efeito inibitório do AAS e AS sobre a PFK. Como observado, houve uma maior atividade da PFK na presença de 0,1 mg/mL de f-actina, comparado aos controles, e esta foi capaz de proteger totalmente a PFK contra os efeitos inibitórios do AAS (Figura 14 A) e AS (Figura 14 B). Estes resultados estabelecem que AAS e AS inibem a PFK através da indução da dissociação do estado conformacional ativo tetramérico da enzima para um estado menos ativo dimérico, e confirmam a reversibilidade dos efeitos dos fármacos.

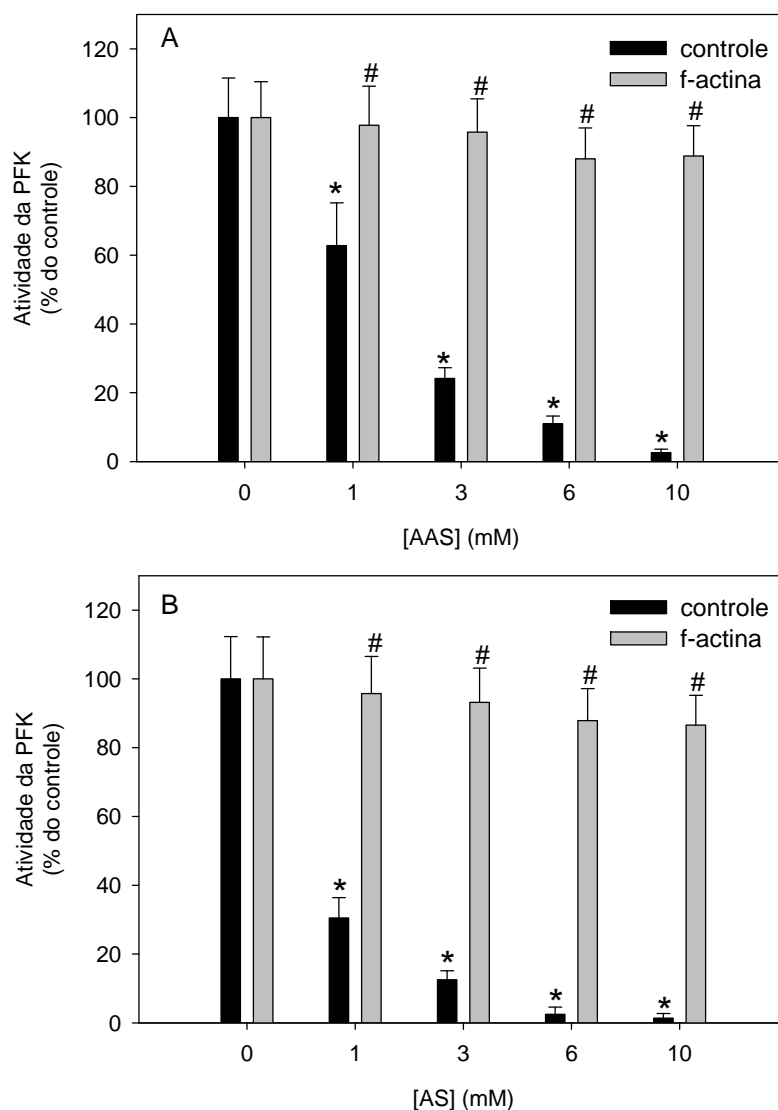


Figura 14 – Modulação da atividade da Fosfofrutocinase-1 por ácido acetilsalicílico e ácido salicílico na presença de f-actina. PFK purificada foi incubada por 1 h na presença das concentrações indicadas de AAS (Painel A) ou AS (Painel B), na ausência ou na presença de 0,1 mg/mL de f-actina. A atividade da PFK foi avaliada através do método radiométrico, como indicado no Material de Métodos. Dados representam a média \pm erro-padrão de no mínimo 3 experimentos independentes ($n \geq 3$). * $P < 0,05$ comparando com cada controle, na ausência dos fármacos. # $P < 0,05$ comparando a mesma concentração dos fármacos, na ausência de f-actina. O teste t de Student foi usado para avaliar as diferenças estatisticamente significativas entre os valores.

4.4 EFEITOS DO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO E DO ÁCIDO SALICÍLICO NA ATIVIDADE DA FOSFOFRUTOCINASE-1 DE HOMOGENEIZADO DE MÚSCULO ESQUELÉTICO DE CAMUNDONGO.

Com o intuito de investigar os efeitos do AAS e AS em um sistema experimental mais complexo, também foi avaliada a atividade da PFK em homogeneizado de músculo esquelético de camundongo, onde uma inibição da atividade da PFK, dependente da dose dos salicilatos, é observada (Figura 15). Nesses experimentos, comprovamos os dados anteriores de que, uma vez que ambos os fármacos foram capazes de inibir a atividade da PFK (sendo que o AS foi ligeiramente mais potente que o AAS), os efeitos inibitórios não dependem da acetilação promovida pelo AAS. Ainda, os dados em homogeneizado muscular, um tecido rico em f-actina, mostram que apesar da capacidade desta proteína estrutural (f-actina) de prevenir e reverter os efeitos dos fármacos sobre a PFK, ocorre a inibição nos sistemas celulares. Em algumas condições específicas onde a ligação entre a PFK e a f-actina é favorecida, como sob ação de alguns hormônios, como epinefrina e insulina, os efeitos dos fármacos seriam, provavelmente, atenuados ou mesmo impedidos. Entretanto, outros estudos seriam necessários para comprovar essa hipótese, o que não foi objetivo do presente trabalho. Por outro lado, uma vez que os fármacos modulam a estrutura quaternária da PFK e essa modulação é descrita como sendo capaz de afetar a ligação da PFK na f-actina, pode ser que a presença dos salicilatos esteja promovendo a dissociação entre a PFK e a f-actina através da estabilização dos dímeros da enzima.

Com o intuito de verificar a capacidade dos salicilatos em alterar a distribuição celular da PFK, decidimos estudar os efeitos dos fármacos na PFK de eritrócitos humanos. A atividade enzimática foi avaliada no total de células lisadas (Figura 16 A) e no citoesqueleto

celular, após a separação das membranas (Figura 16 B), sendo que pode ser observado que o AAS inibiu a atividade da PFK endógena de maneira dependente da dose (Figura 16 A), além

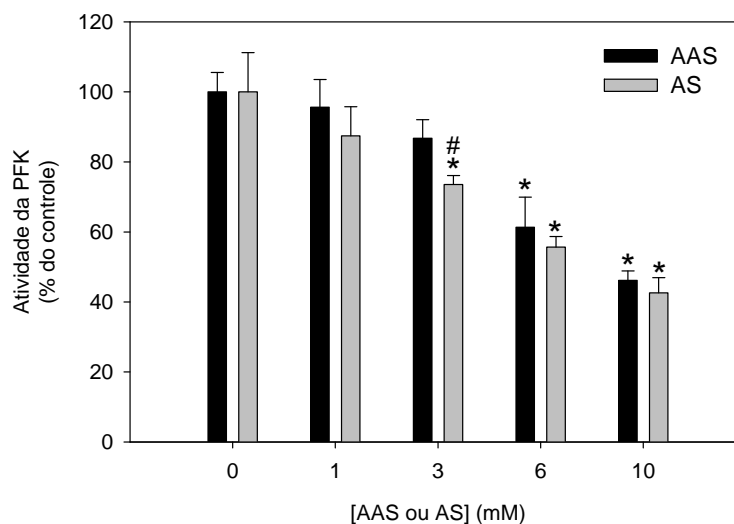


Figura 15 – Efeitos do ácido acetilsalicílico e ácido salicílico na atividade fosfofrutocinásica de homogeneizado de músculo esquelético de camundongos. Homogeneizado de músculo foram tratados por 1 h na presença dos fármacos e a atividade da PFK foi avaliada através de ensaio espectrofotométrico. Os dados representam a média \pm erro-padrão de no mínimo 4 experimentos independentes ($n \geq 4$). * $P < 0,05$ comparando com o controle, na ausência dos fármacos. # $P < 0,05$ comparando com a mesma concentração de AAS. O teste t de Student foi usado para avaliar as diferenças estatisticamente significativas entre os valores.

de promover uma tendência à ligação da enzima na membrana do eritrócito (Figura 16 B). Esta ligação tem sido mostrada como um importante mecanismo de regulação da PFK dentro dessas células e está correlacionada com a formação de dímeros (Zancan e Sola-Penna, 2005a; 2005b). De fato, os dados colhidos com AAS corroboram a hipótese de que a inibição induzida por AAS (Figura 16A) está diretamente correlacionada com a associação da PFK ao citoesqueleto membranar (Figura 16B).

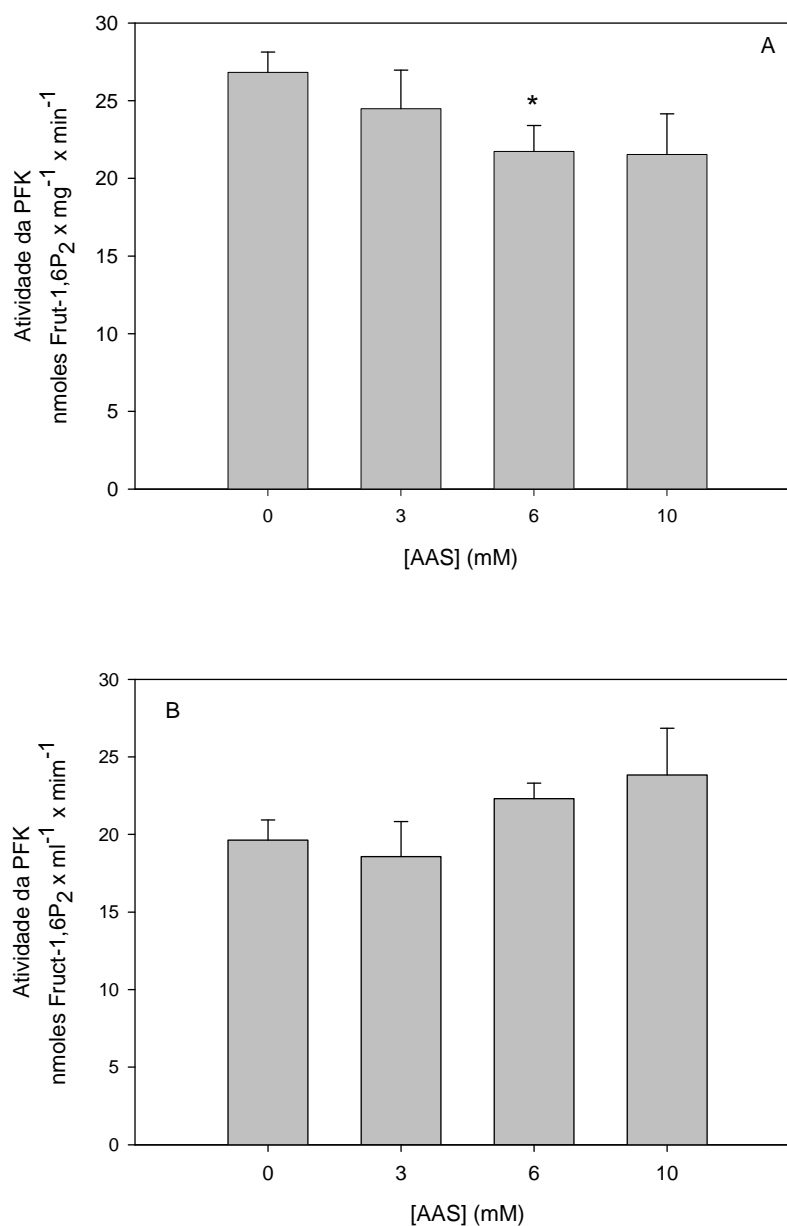


Figura 16 – Efeitos do ácido acetilsalicílico sobre a atividade da Fosfofrutocinase-1 de eritrócitos humanos e sobre a sua localização celular. A atividade da PFK foi avaliada através do ensaio radiométrico. Paineil A: atividade da PFK no hemolisado total. Paineil B: atividade da PFK na fração ligada à membrana. Dados representam a média \pm erro-padrão de no mínimo 4 experimentos independentes ($n \geq 4$). * $P < 0,05$ comparando com o controle, na ausência dos fármacos. O teste t de Student foi usado para avaliar as diferenças estatisticamente significativas entre os valores.

4.5 EFEITOS DOS SALICILATOS NA ATIVIDADE DA FOSFOFRUTOCINASE-1 EM CÉLULAS MUSCULARES INTACTAS.

Para avaliar os efeitos dos salicilatos na atividade da PFK em células musculares intactas foi usada a linhagem de células C2C12 tratadas por 1, 12 ou 24 h com diferentes concentrações de AAS ou AS. A Figura 17 mostra que ambos os fármacos são capazes de inibir a atividade da PFK nessas células, mesmo em tratamentos curtos (1 h), mostrando a eficiência da inibição. Mais uma vez AS mostrou-se ligeiramente mais eficiente que AAS, o que nesse caso pode ainda ser explicado pela maior capacidade de difusão do fármaco pela membrana plasmática.

4.6 EFEITOS DOS SALICILATOS NA VIABILIDADE CELULAR, CONSUMO DE GLICOSE, PRODUÇÃO DE LACTATO E ATIVIDADE DA FOSFOFRUTOCINASE-1 EM LINHAGENS DE CÉLULAS MCF-7.

Após investigarmos os efeitos dos salicilatos na atividade da PFK em diversos tecidos e devido aos reportados efeitos pró-apoptóticos do AAS em diversas linhagens celulares de câncer (Lai *et al.*, 2008; Garcia-Heredia *et al.*, 2008), fomos avaliar os efeitos do AAS e AS na viabilidade das células de carcinoma mamário humano (MCF 7), como mostrado na Figura 18.

Como pode ser observado na Figura 18, ambos os fármacos diminuem a viabilidade das células MCF 7 de modo dependente da dose, embora apresentem efetividades distintas, sendo o AS mais potente que o AAS na diminuição da viabilidade celular: 1 mM de AS diminuiu a viabilidade das células MCF 7 e os efeitos similares foram somente observados em 4 mM de

AAS. Essa diferença de eficácia permaneceu até 10 mM, quando ambos os componentes apresentaram efeitos similares.

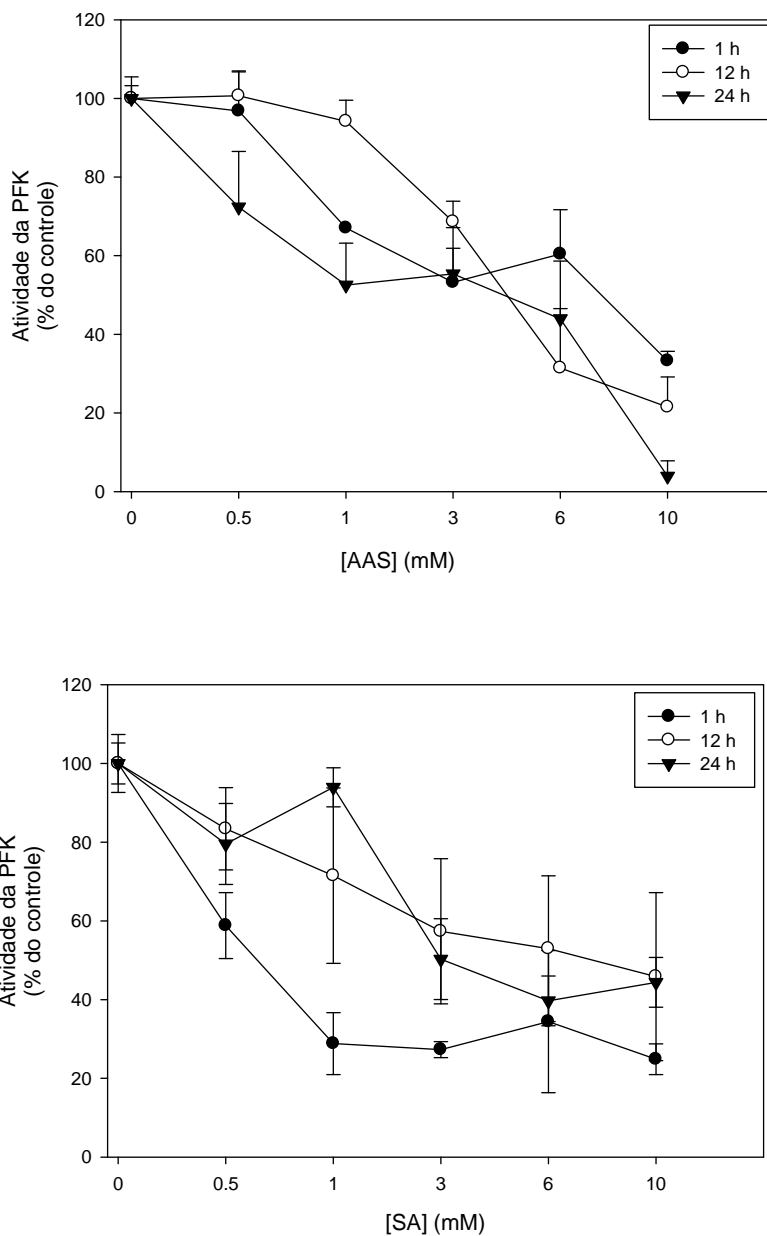


Figura 17 - Efeitos dos salicilatos na atividade da Fosfofrutocinase-1: curvas tempo e dose-dependentes das células C2C12. Células cresceram até sua confluência em meio DMEM. Após, uma alíquota do meio foi removida, e as respectivas concentrações de AAS e AS foram adicionados, onde as células foram incubadas por diferentes tempos sob essas condições, e a atividade da PFK foi avaliada pelo método espectrofotométrico. Os dados representam a média \pm erro-padrão de no mínimo 5 experimentos independentes ($n \geq 5$).

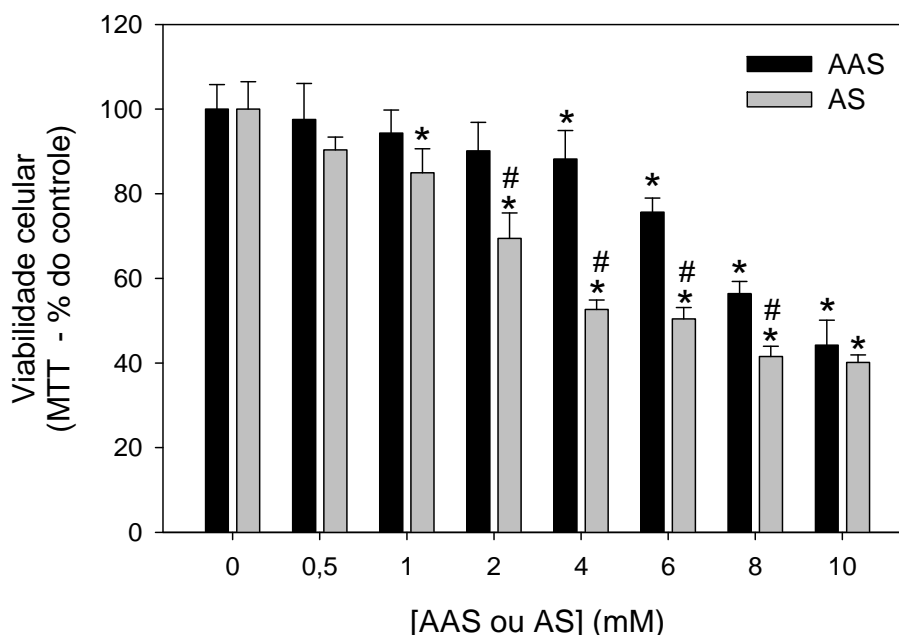


Figura 18 – Efeitos do ácido acetilsalicílico e ácido salicílico na viabilidade das células MCF 7. Células cresceram até sua confluência em meio DMEM. Após, uma alíquota do meio foi removida, e as respectivas concentrações de AAS e AS foram adicionados, onde as células foram incubadas por 24 h sob essas condições, e sua viabilidade celular avaliada. Os dados representam a média \pm erro-padrão de no mínimo 5 experimentos independentes ($n \geq 5$). * $P < 0,05$ comparando com o controle, na ausência dos fármacos. # $P < 0,05$ comparando com a mesma concentração de AAS. O teste t de Student foi usado para avaliar as diferenças estatisticamente significativas entre os valores.

Os efeitos do AAS e AS no consumo de glicose em células MCF 7 são observados em menor extensão (Figura 19) se comparados aos resultados obtidos nos ensaios de viabilidade celular, sendo que AS também é significativamente mais efetivo que o AAS ao inibir o consumo de glicose pelas células. Nesta figura, observamos uma diferença significativa entre os fármacos, somente até a concentração de 2 mM, e concentrações maiores, seja de AAS ou AS, as células MCF-7 apresentam uma diminuição do consumo de glicose equivalentes.

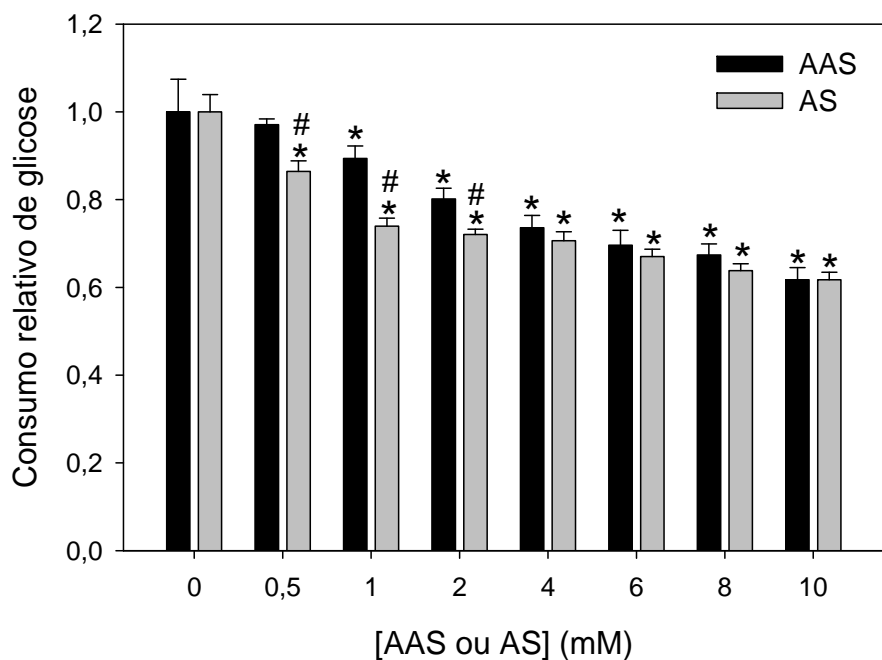


Figura 19 – Efeitos do ácido acetilsalicílico e ácido salicílico no consumo de glicose em células MCF 7. Células cresceram até sua confluência em meio DMEM. Após, uma alíquota do meio foi removida, e as respectivas concentrações de AAS e AS foram adicionadas, onde as células foram incubadas por 24 h sob essas condições, e o consumo de glicose avaliado. Os dados representam a média \pm erro-padrão de no mínimo 5 experimentos independentes ($n \geq 5$). * $P < 0,05$ comparando com o controle, na ausência dos fármacos. # $P < 0,05$ comparando com a mesma concentração de AAS. O teste t de Student foi usado para avaliar as diferenças estatisticamente significativas entre os valores.

Esses últimos resultados são reforçados pela capacidade dos fármacos de inibir a produção de lactato por essas células (Figura 20), sugerindo que além da captação de glicose, todo o fluxo glicolítico está inibido na presença dos fármacos.

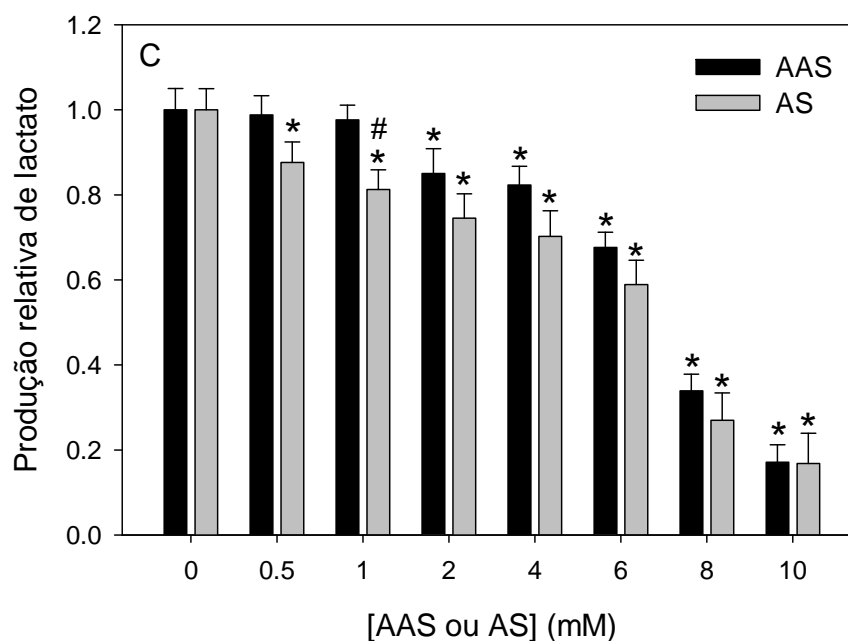


Figura 20 – Efeitos do ácido acetilsalicílico e ácido salicílico na produção de lactato em células MCF 7. Células cresceram até sua confluência em meio DMEM. Após, uma alíquota do meio foi removida, e as respectivas concentrações de AAS e AS foram adicionados, onde as células foram incubadas por 24 h sob essas condições, e o consumo de glicose avaliado. Os dados representam a média \pm erro-padrão de no mínimo 5 experimentos independentes ($n \geq 5$). * $P < 0,05$ comparando com o controle, na ausência dos fármacos. # $P < 0,05$ comparando com a mesma concentração de AAS. O teste t de Student foi usado para avaliar as diferenças estatisticamente significativas entre os valores.

Fomos, então, testar os efeitos do AAS e AS na atividade da PFK de células MCF 7, onde observa-se também uma inibição da atividade fosfofrutocinásica após as células MCF 7 serem incubadas na presença dos fármacos por 24 h (Figura 21). Nota-se que na concentração de 6 mM o AS foi mais eficaz na inibição da atividade da PFK do que o AAS (Figura 21).

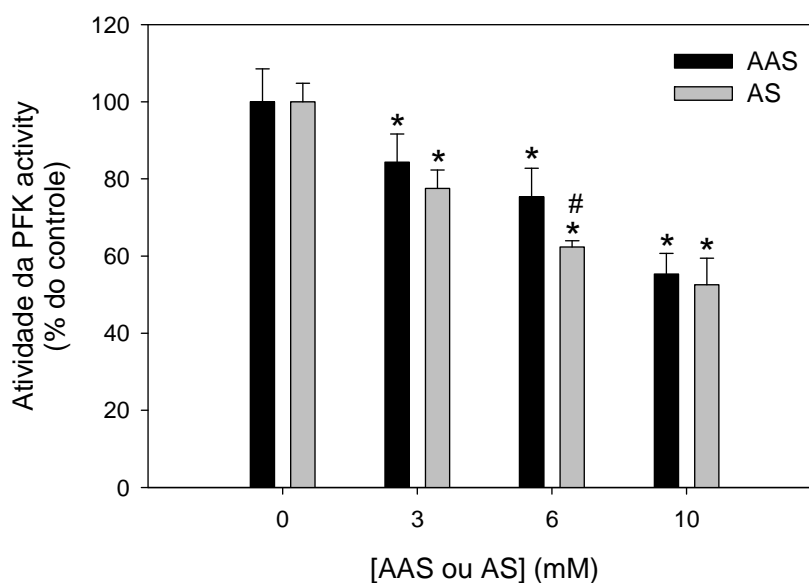


Figura 21 – Efeitos do ácido acetilsalicílico e ácido salicílico na atividade da Fosfofrutocinase-1 de células MCF 7. Células cresceram até sua confluência em meio DMEM. Após, uma alíquota do meio foi removida, e as respectivas concentrações de AAS e AS foram adicionados, onde as células foram incubadas por 24 h sob essas condições, e a atividade da PFK foi avaliada pelo método espectrofotométrico. Os dados representam a média \pm erro-padrão de no mínimo 5 experimentos independentes ($n \geq 5$). * $P < 0,05$ comparando com o controle, na ausência dos fármacos. # $P < 0,05$ comparando com a mesma concentração de AAS. O teste t de Student foi usado para avaliar as diferenças estatisticamente significativas entre os valores.

5 DISCUSSÃO

A relação entre câncer e metabolismo da glicose tem estado em evidência e tem tido uma grande importância devido, principalmente, a recentes e relevantes publicações (Gatenby e Gillies, 2004; Xu *et al.*, 2005; Ashrafian, 2006; Chesney, 2006; Pelicano *et al.*, 2006; Shaw, 2006; Clem *et al.*, 2008). Entretanto, o mecanismo pelo qual esses efeitos são descritos vem sendo re-examinados e muitas vezes se contrapõem aos mecanismos clássicos descritos anteriormente para a ação do AAS (Kim *et al.*, 2001; Yuan *et al.*, 2001; Lai *et al.*, 2008).

Já está clara a necessidade que os tumores usam a glicose como fonte principal de energia, assim como há grande correlação entre a taxa de utilização de glicose e a agressividade do tumor (Gatenby e Gillies, 2004; Ashrafian, 2006; Shaw, 2006). Em se tratando da via glicolítica, também há um consenso que a PFK é a enzima chave na sua regulação, provavelmente por ser a mais complexa enzima regulatória da via (Kemp, 1975; Uyeda, 1979). Seja por ligantes (fisiológicos ou não), proteínas ou fármacos, a maioria dos sinais que modula a PFK afeta seu equilíbrio oligomérico, o que influencia diretamente na sua atividade catalítica (Parmeggiani *et al.*, 1966; Paetkau e Lardy, 1967; Kemp e Gunasekera, 2002; Meira *et al.*, 2005; Marinho-Carvalho *et al.*, 2006; Coelho *et al.*, 2007; Leite *et al.*, 2007; Zancan *et al.*, 2007a e 2007b; Zancan *et al.*, 2008).

Além dos recentes achados sobre os efeitos do AAS na indução da apoptose em células tumorais (Garcia-Heredia *et al.*, 2008; Lai *et al.*, 2008), também foi demonstrado que a PFK é capaz de se ligar à proteína pró-apoptótica BAD, apresentando uma menor atividade, assim que a apoptose é iniciada, o que mostra a correlação direta com o controle da apoptose (Deng *et al.* 2008). A função da PFK neste processo ainda permanece desconhecida, porém propõe-se que um decréscimo da sua atividade diminuiria o fluxo glicolítico e o suprimento de ATP para a célula, fenômeno que ocorre juntamente com a apoptose (Deng *et al.*, 2008).

Os resultados das Figuras 18, 19, 20 e 21, mostram que AAS e AS diminuem a viabilidade, o consumo de glicose, a produção de lactato e a atividade da PFK em células MCF 7. Sabe-se que a atividade da PFK está exacerbada em tecidos (El-Bacha *et al.*, 2003) e em células tumorais (Meira *et al.*, 2005), sendo que já foi mostrado que outros fármacos são capazes de inibir tanto o crescimento de tumores quanto a atividade da PFK (Glass-Marmor e Beitner, 1999; Penso e Beitner, 2002a e 2002b; Meira *et al.*, 2005). Isto reforça o uso de AINEs, como o AAS, no tratamento do câncer (Garcia-Rodriguez e Huerta-Alvarez, 2001; Flossmann e Rothwell, 2007).

Os resultados também mostram que os salicilatos são capazes de inibir diretamente a PFK alterando sua estrutura quaternária através de um mecanismo comum a outros moduladores da enzima. Estes achados podem ser diretamente correlacionados aos efeitos pró-apoptóticos do AAS, desde que a modulação da estrutura quaternária, como visto pelos efeitos do AAS e AS na PFK, reconhecidamente alteram sua associação com outras proteínas (Marinho-Carvalho *et al.*, 2006; Coelho *et al.*, 2007; Leite *et al.*, 2007; Zancan *et al.*, 2007a e 2007b; Zancan *et al.*, 2008), e poderiam, também, modular a sua associação com BAD, conseqüentemente modulando a apoptose. Este mecanismo de inibição da atividade da PFK, seguido de morte celular por apoptose, já foi observado antes com o tratamento das células de carcinoma mamário humano MCF 7 com clotrimazol (Meira *et al.*, 2005).

O AAS e seu precursor AS também são capazes de inibir diretamente a atividade da PFK, desde a enzima purificada (Figura 9), onde não se tem outras proteínas que possam interferir na atividade catalítica da enzima, até em outros sistemas mais complexos, como homogeneizado de músculo (Figura 15), eritrócitos humanos (Figura 16 A) e diferentes linhagens de células, como C2C12 (Figura 17) e MCF 7 (Figura 21). Mostramos ainda que AS é mais eficaz do que AAS na inibição da atividade da PFK, provavelmente pela maior eficácia na alteração de sua estrutura quaternária, sendo que essa diferença de eficácia, que

também foi observada nos experimentos de reversibilidade da atividade da PFK após diálise (Figura 13) e na viabilidade e consumo de glicose das células tumorais (Figura 18 e 19), podem ser devido a maior solubilidade e difusão do AS frente ao AAS.

Alguns autores sugerem um mecanismo de ação do AAS e AS através de uma via independente de COX (Yuan *et al.*, 2001; Borthwick *et al.*, 2006; Fleischman *et al.*, 2008). Essa hipótese foi comprovada quando testamos os efeitos do AS, fármaco da família dos salicilatos que não possui o grupo acetil na sua composição. A partir dos resultados apresentados na Figura 9 pode-se sugerir que os efeitos do AAS sobre a PFK não são dependentes da acetilação, sendo mimetizados pelo AS. Porém, mesmo após esses resultados, decidimos testar os efeitos dos salicilatos na atividade da enzima após esta ser dialisada por 24 h. Como mostrado na Figura 13, não há diferença na atividade da enzima na presença de diferentes concentrações dos fármacos após a diálise, confirmando a reversibilidade dos efeitos inibitórios sobre a PFK.

Por fim, com base nos resultados apresentados nessa dissertação podemos inferir que a capacidade dos salicilatos de inibir a PFK, o consumo de glicose e a produção de lactato em células tumorais, pode estar diretamente associada a habilidade destes fármacos em induzir apoptose nessas células. Esses dados são reforçados pela diminuição da viabilidade destas células induzida pelos fármacos. Finalmente, o presente estudo esclarece um novo mecanismo de ação celular para os salicilatos: a inibição do metabolismo glicolítico através da sua ação sobre a PFK.

6 CONCLUSÕES

- AAS e AS inibem a atividade da PFK de modo reversível, deslocando a enzima para uma estrutura quaternária menos complexa sem alterar sua estrutura terciária;
- Os efeitos do AAS não são dependentes de acetilação sendo mimetizados pelo AS;
- AAS e AS inibem a PFK num sistema de células intactas tanto em células normais de mioblastos, quanto em células tumorais mamárias humanas;
- Os compostos alteram significativamente os parâmetros metabólicos das células MCF-7;
- Os salicilatos apresentam-se como possíveis fármacos antineoplásicos, uma vez que promovem a diminuição da viabilidade celular de linhagens tumorais.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, G.G., SOLA-PENNA, M. (2003) **Epinephrine modulates cellular distribution of muscle phosphofructokinase.** Mol. Genet. Metab. 78, 302-306.

ANDRÉS, V., CARRERAS, J., CUSSÓ, R. (1996) **Myofibril-bound muscle phosphofructokinase is less sensitive to inhibition by ATP than the free enzyme, but retains its sensitivity to stimulation by bisphosphorylated hexoses.** Int. J. Biochem. Cell. Biol. 28, 1179-1184.

ASHRAFIAN, H. (2006) **Cancer's sweet tooth: the Janus effect of glucose metabolism in tumorigenesis.** Lancet 367: 618-621

AWTRY, E.H., LOSCALZO, J. (2000) **Aspirin** Circulation. 101:1206-1218

BELL, G.I., KAYANO, T., BUSE, J. B., BURANT, C.F., TAKEDA, J., LIN, D., FUKUMOTO, H., SEINO, S. (1990) **Molecular biology of mammalian glucose transporters.** Diabetes Care 13: 198-208

BELLOSILLO, B., PIQUE, M., BARRAGAN, M., CASTANO, E., VILLAMOR, N., COLOMER, D., MONTSERRAT, E., PONS, G., GIL, J. (1998) **Aspirin and salicylate induce apoptosis and activation of caspases in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells.** Blood 92, 1406–1414.

BIRNBAUM, M.J. (1992) **The insulin-sensitive glucose transporter.** Int. Rev. Cytol. 137:239-297

BOCK, P.E., FRIEDEN C. (1974) **pH-induced cold lability of rabbit skeletal muscle phosphofructokinase.** Biochemistry. 13: 4191-4196.

BORTHWICK, G.M., SARAH JOHNSON, A. PARTINGTON, M. BURN, J., WILSON, R. AND ARTHUR, H. M. (2006) **Therapeutic levels of aspirin and salicylate directly inhibit a model of angiogenesis through a Cox-independent mechanism.** FASEB J. 20: 2009–2016.

BRADFORD, M.M. (1976) **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Anal. Biochem. 72, 248-254.

BROOKS, G., YU, X.M., WANG, Y., CRABBE, M.J., SHATTOCK, M.J., HARPER, J.V. (2003) **Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) inhibit vascular smooth muscle cell proliferation via differential effects on the cell cycle.** J. Pharm. Pharmacol. 55, 519–526.

CAI, G.Z., LEE, L.L.Y., LUTHER, M.A., LEE, J.C. (1990) **Regulation and quaternary structural changes in rabbit muscle phosphofructokinase.** *Biophys. Chem.* 37, 97-106.

CALDWELL, J., O`GORMAM. J., SMITH, R.L. (1980) **Inter-individual differences in the glycine conjugation of salicylic acid.** *Br J Clin Pharmacol* 9: 114-116.

CAMPANELLA, M.E., CHU H., LOW P.S. (2005) **Assembly and regulation of a glycolytic enzyme complex on the human erythrocyte membrane.** *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 102: 2402-2407.

CHANDRASEKHARAN, N.V., DAI, H., ROOS, K.L., EVANSON, N.K., TOMSIK, J., ELTON, T.S., SIMMONS, D.L. (2002) **COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression.** *Proc Natl Acad Sci (USA)* 99: 13926–31.

CHEN-ZION, M., BASSUKEVITZ, Y., BEITNER, R. (1992) **Sequence of insulin effects on cytoskeletal and cytosolic phosphofructokinase, mitochondrial hexokinase, glucose 1,6-bisphosphate and fructose 2,6-bisphosphate levels, and the antagonistic action of calmodulin inhibitors, in diaphragm muscle.** *Int. J. Biochem.* 24: 1661-1667.

CHESNEY, J. (2006) **6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase and tumor cell glycolysis.** *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 9: 535-539.

CIPOLLONE, F., PATRIGNANI, P., GRECO. A., PANARA, M.R., PADOVANO, R., CUCCURULLO, F., PATRONO, C., REBUZZI, A.G., LIUZZO, G., QUARANTA, G., MASERI, A. (1997) **Differential suppression of thromboxane biosynthesis by indobufen and aspirin in patients with unstable angina.** *Circulation* 96:1109–1116

CLEM, B., TELANG, S., CLEM, A., YALCIN, A., MEIER, J., SIMMONS, A., RASKU, M.A., ARUMUGAM, S., DEAN, W.L., EATON, J., LANE, A., TRENT, J.O., CHESNEY, J. (2008) **Small-molecule inhibition of 6-phosphofructo-2-kinase activity suppresses glycolytic flux and tumor growth.** *Mol Cancer Ther* 7: 110-120.

COELHO, W.S., COSTA, K.C., SOLA-PENNA, M. (2007) **Serotonin stimulates mouse skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase through tyrosine-phosphorylation of the enzyme altering its intracellular localization.** *Mol Genet Metab* 92: 364-370.

CORNISH-BOWDEN, A., CARDENAS, M.L. (1991) **Hexokinase and `Glucokinase in Liver Metabolism.** *Tibs* 16: 281-282.

DENG, H., YU, F., CHEN, J., ZHAO, Y., XIANG, J., LIN, A. (2008) **Phosphorylation of Bad at Thr-201 by JNK1 Promotes Glycolysis through Activation of Phosphofructokinase-1.** *Journal of Biological Chemistry* 283:20754-60.

DIN, F.V., DUNLOP, M.G., STARK, L.A. (2004) **Evidence for colorectal cancer cell specificity of aspirin effects on NF kappa B signaling and apoptosis.** Br. J. Cancer 91, 381–388.

DOIRON, B., CUIF, M.H., CHEN, R., KAHN, A. (1996) **Transcriptional glucose signaling through the glucose response element is mediated by the pentose phosphate pathway.** J. Biol. Chem. 271: 5321-5324

EL-BACHA, T., FREITAS, M.S., SOLA-PENNA, M. (2003) **Cellular distribution of phosphofructokinase activity and implications to metabolic regulation in human breast cancer.** Mol. Genet. Metabol. 79, 294-299.

EL-BACHA, T., MENEZES, M.M.T., SILVA, M.C.A., SOLA-PENNA, M., DA POIAN, A.T. (2004) **Mayaro virus infection alters glucose metabolism in cultured cells through activation of the enzyme 6-phosphofructo 1-kinase.** Mol. Cell. Biochem. 266, 191-198.

EL-MAGHRABI, M.R., PILKIS, S.J. (1984) **Rat liver 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase: A review of relationships between the two activities of the enzyme.** J. Cell. Biochem. 26: 1-17

ETO, K., SUGA, S., WAKUI, M., TSUBAMOTO, Y., TERAUCHI, Y., TAKA, J., AIZAWA, S., NODA, M., KIMURA, S., KASAI, H., KADOWAKIET, T. (1999) **NADH shuttle system regulates K_{ATP} channel dependent pathway and steps distal to cytosolic Ca^{2+} concentration elevation in glucose-induced insulin secretion.** J. Biol. Chem. 274: 25386–25392

FABER-BARATA, J., SOLA-PENNA, M.(2005) **Opposing effects of two osmolytes--trehalose and glycerol--on thermal inactivation of rabbit muscle 6-phosphofructo-1-kinase.** Mol Cell Biochem 269:203-7.

FITZGERALD G.A., OATES J.A., HAWIGER J., MAAS R.L., ROBERTS L.J. II, LAWSON, J.A., BRASH, A.R. (1983) **Endogenous biosynthesis of prostacyclin and thromboxane and platelet function during chronic administration of aspirin in man.** J Clin Invest. 71:676–688.

FLEISCHMAN, A., SHOELSON, S.E., BERNIER, R., GOLDFINE, A.B. (2008) **Salsalate Improves Glycemia and Inflammatory Parameters in Obese Young Adults.** Diabetes Care 31:289-294.

FLOSSMANN, E., ROTHWELL, P. M., ON BEHALF OF THE BRITISH DOCTORS ASPIRIN TRIAL AND THE UK-TIA ASPIRIN TRIAL (2007) **Effect of aspirin on long-term risk of colorectal cancer: consistent evidence from randomised and observational studies.** Lancet 369: 1603–13.

FUNK, C.D. (2001) **Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology.** Science 294: 1871–1875

GARCIA-HEREDIA, J., HERVAS, M., DE LA ROSA, M., NAVARRO, J. (2008) **Acetylsalicylic acid induces programmed cell death in Arabidopsis cell cultures.** Planta 228:89-97.

GARCIA-RODRIGUEZ, LA., HUERTA-ALVAREZ, C. (2001) **Reduced risk of colorectal cancer among longterm users of aspirin and non aspirin nonsteroidal antiinflammatory drugs.** Epidemiology 12:88-93.

GATENBY, R.A., GILLIES, R.J. (2004) **Why do cancers have high aerobic glycolysis?** Nature Reviews Cancer 4, 891-899.

GLASS-MARMOR, L., BEITNER, R., (1999) **Taxol (paclitaxel) induces a detachment of phosphofructokinase from cytoskeleton of melanoma cells and decreases the levels of glucose 1,6-bisphosphate, fructose 1,6-bisphosphate and ATP.** Eur.J.Pharmacol. 370: 195-199.

GROSSBARD, L. SCHIMKE, R.T. (1966) **Multiple hexokinases of rat tissues. Purification and comparison of soluble forms.** J. Biol. Chem. 241: 3546-3560

HAZEN, S.L., WOLF, M.J., FORD, D.A., GROSS, R.W. (1994). **The rapid and reversible association of phosphofructokinase with myocardial membranes during myocardial ischemia** FEBS Letters 339: 213-216.

HOLANDINO, C., VEIGA, V.F., RODRIGUES, M.L., MORALES, M.M., CAPELLA, M.A.M., ALVIANO, C.S. (2001) **Direct current decreases cell viability but not P glycoprotein expression and function in human multidrug resistant leukaemic cell.** Bioelectromagnetics 22: 470-478.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. COORDENAÇÃO DE PREVENÇÃO E VIGILÂNCIA DE CÂNCER, RIO DE JANEIRO, BRASIL (2008) **Estimativa 2008: Incidência de Câncer no Brasil.** Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/versaofinal.pdf>> Acessado em agosto de 2008.

JEFFREYS D. (2004) **Aspirin: The Story of a Wonder Drug.** BMJ v.329 pp1408.

JENKINS, J.D., KEZDY, F.J., STECK, T.L. (1985) **Mode of interaction of phosphofructokinase with the erythrocyte membrane.** J. Biol. Chem. 260, 10426-10433.

JIMENEZ AH, STUBBS ME, TOFLER GH, WINTHER K, WILLIAMS GH, MULLER JE. (1992) **Rapidity and duration of platelet suppression by enteric-coated aspirin in healthy young men.** Am J Cardiol.69:258 –262.

KARADSHEH, N.S., UYEDA, K. (1977) **Changes in allosteric properties of phosphofructokinase bound to erythrocyte membranes.** *J. Biol. Chem.* 252, 7418-7420.

KAUL R.K., KOHLER H. (1983) **Interaction of hemoglobin with band 3: a review.** *Klin Wochenschr.* 61: 831-837.

KEHINDE, E. O., SHIHAB ELDEEN, A., AYESHA, A., ANIM, J. T., MENON, A., AL-SULAIMAN, M. (2003) **Effect of castration on acetyl salicylic acid metabolism in rabbits.** *Urology* 61: 651–655.

KELLOFF, G.J., SCHILSKY, R.L., ALBERTS, D.S., DAY, R.W., GUYTON, K.Z., PEARCE, H.L., PECK, J.C., PHILLIPS, R., SIGMAN, C.C. (2004) **Colorectal adenomas: a prototype for the use of surrogate end points in the development of cancer prevention drugs.** *Clin Cancer Res*; 10: 3908–18.

KEMP, R.G. (1975) **Phosphofructokinase.** *Meth. Enzymol.* 42: 72-77.

KEMP, R.G., FOE, L.G. (1983) **Allosteric regulatory properties of muscle phosphofructokinase.** *Mol. Cell. Biochem.* 57, 147-154.

KEMP, R.G., GUNASEKERA, D. (2002) **Evolution of the allosteric ligand sites of mammalian phosphofructo-1-kinase.** *Biochemistry* 41: 9426-9430.

KIM, J. K., KIM, Y. J., FILLMORE, J. J., CHEN, Y., MOORE, I., LEE, J., YUAN, M., LI, Z. W., KARIN, M., PERRET, P., SHOELSON, S. E., AND SHULMAN, G. I. (2001) **The effect of salicylates on insulin sensitivity.** *J. Clin. Invest.* 108:437–446

KLAMPFER, L., CAMMENGA, J., WISNIEWSKI, H.G., NIMER, S.D. (1999) **Sodium salicylate activates caspases and induces apoptosis of myeloid leukemia cell lines.** *Blood.* 93, 2386–2394.

KOZUKA, S., NOGAKI, M., OZEKI, T., MASUMORI, S. (1975) **Premalignancy of the mucosal polyp in the large intestine: II. Estimation of the periods required for malignant transformation of mucosal polyps.** *Dis Colon Rectum*; 18: 494–500.

KUO, H.J., MALENCIK, D.A., LIU, R.S. ANDERSON, S.R. (1986) **Factors affecting the activation of rabbit muscle phosphofructokinase by actin.** *Biochemistry* 25, 1278-1286.

LAI, M.Y., HUANG, J.A., LIANG, Z.H., JIANG, H.X., TANG, G.D., (2008) **Mechanisms underlying aspirin-mediated growth inhibition and apoptosis induction of cyclooxygenase-2 negative colon cancer cell line SW480.** *World J Gastroenterol*; 14(26): 4227-4233.

LANGBEIN, S., ZERILLI, M., ZUR, HAUSEN, A. STAIGER, W., RENSCH-BOSCHERT, K., LUKAN, N., POPA, J., TERNULLO, M.P., STEIDLER, A., WEISS, C., GROBHOZ, R., WILLEKE, F., ALKEN, P., STASSI, G., SCHUBERT, P., COY, J.F.

(2006) **Expression of transketolase TKTL1 predicts colon and urothelial cancer patient survival: Warburg effect reinterpreted.** *Br. J. Cancer*, 94, 578-585.

LEHOTZKY, A., TELEGDI, M., LILIOM, K., OVÁDI, J. (1993) **Interaction of phosphofructokinase with tubulin and microtubules. Quantitative evaluation of the mutual effects.** *J. Biol.Chem.* 268, 10888-10894.

LEITE TC, DA SILVA D, COELHO RG, ZANCAN P, AND SOLA-PENNA M, (2007) **Lactate favors the dissociation of skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase tetramers down-regulating the enzyme and muscle glycolysis.** *Biochem.J.* 408: 123-130.

LEVINE, J.S., AHNEN, D.J. (2006) **Adenomatous polyps of the colon.** *N Engl J Med*; 355: 2551–57.

LIU, R.S., ANDERSON, S. (1980) **Activation of rabbit muscle phosphofructokinase by F-actin and reconstituted thin filaments.** *Biochemistry* 19, 2684-2688.

LOW, P.S., KIYATKIN, A., LI, Q., HARRISON, M.L. (1995) **Control of erythrocyte metabolism by redox-regulated tyrosine phosphatases and kinases.** *Protoplasma* 184: 196–202

LOW, P.S., RATHINAVELU, P., HARRISON, M.L. (1993) **Regulation of glycolysis via reversible enzyme binding to the membrane protein, band 3.** *J. Biol. Chem.* 268:14627-15631.

LUTHER, M.A., LEE, J.C. (1986) **The role of phosphorylation in the interaction of rabbit muscle phosphofructokinase with F-actin.** *J. Biol. Chem.* 261, 1753-1759.

MAHDI, J.G., MAHDI, A.J., MAHDI, A.J., BOWEN, I.D. (2006) **The historical analysis of aspirin discovery, its relation to the willow tree and antiproliferative and anticancer potential.** *Cell Prolif.* 39, 147–155

MAIA, J.C.C., GOMES, S.L., JULIANI, M.H. (1983) **Preparation of [α -³²P] and [γ -³²P]-nucleoside triphosphate, with high specific activity.** In C.M. Morel (Ed.) *Genes and antigens of parasites, a laboratory manual.* (pp. 146-157) Rio de Janeiro, RJ, Brazil, Fundação Oswaldo Cruz.

MARINHO-CARVALHO, M.M., ZANCAN P., SOLA-PENNA M., (2006) **Modulation of 6-phosphofructo-1-kinase oligomeric equilibrium by calmodulin: Formation of active dimmers.** *Molecular Genetics and Metabolism* 87 253–261.

MARINHO-CARVALHO, M., COSTA-MATTOS, P., SPITZ, G.A., ZANCAN, P., SOLA-PENNA, M. (2008) dados submetidos para publicação *FEBS Journal*.

MARRA, D.E., SIMONCINI, T., LIAO, J.K. (2000) **Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation by sodium salicylate mediated by upregulation of p21^{Waf1} and p27^{Kip1}**. *Circulation* 102, 2124–2130.

MEIRA, D.D., MARINHO-CARVALHO, M.M., TEIXEIRA, C.A., VEIGA, V.F., DA POIAN, A.T., HOLANDINO, C., FREITAS, M.S., SOLA-PENNA, M. (2005) **Clotrimazole decreases human breast cancer cells viability through alterations in cytoskeleton-associated glycolytic enzymes**. *Mol. Genet. Metab.* 84, 354-362.

MESSANA, I., ORLANDO, M., CASSIANO, L., PENNACCHIETTI, L., ZUPPI, C., CASTAGNOLA, M., GIARDINA, B. (1996) **Human erythrocyte metabolism is modulated by the O2-linked transition of hemoglobin**. *FEBS Lett.* 390: 25-28

MURRAY, R.H.; GRANNER, D.K.; MAYES, P.A.; RODWELL, V.M. (2003) **Harper's Illustrated Biochemistry**. The McGraw-Hill Companies pp.160 26a ed.

NELSON, D.L., COX, M.M. (2000) **Lehninger Principles of Biochemistry**. 3° ed., Worth Publishers, New York, NY

OLEFSKY, J. M. (1999) **Insulin-stimulated glucose transport**. *J. Biol. Chem.* 274 (4): 1863.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS) (2008) Disponível em: <http://www.who.int/topics/cancer/en/>. Acessado em outubro de 2008.

PAETKAU V., LARDY H.A. (1967) **Phosphofructokinase. Correlation of physical and enzymatic properties**. *J. Biol. Chem.* 242: 2035-2042.

PARMEGGIANI, A., LUFT, J., LOVE, D.S., KREBS, E.G. (1966) **Crystallization and properties of rabbit skeletal muscle phosphofructokinase**. *J. Biol. Chem.* 241, 4625-4637.

PASSONNEAU, J.V., LOWRY, O.H. (1962) **Phosphofructokinase and the Pasteur effect**. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 7: 10-15.

PATRONO, C., COLLAR, B., DALEN, J., FUSTER, V., GENT, M., HARKER, L., HIRSH, J., ROTH, G. (1998) **Platelet-active drugs: the relationships among dose, effectiveness, and side effects**. *Chest*; 114:470S– 488S.

PATRONO, C., COLLER, B. FITZGERALD, G.A., HIRSH, J., ROTH, G. (2004) **Platelet-Active Drugs: The Relationships Among Dose, Effectiveness, and Side Effects The Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy**. *Chest* 126:234S–264S.

PEDERSEN AK, FITZGERALD GA. (1984) **Dose-related kinetics of aspirin: presystemic acetylation of platelet cyclo-oxygenase**. *N Engl J Med* 311:1206–1211.

PELICANO, H., MARTIN, D.S., XU, R.H., HUANG, P. (2006) **Glycolysis inhibition for anticancer treatment**. *Oncogene* 25: 4633-4646.

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 cells.** Eur. J. Pharmacol. 451, 227-235.

PETERSEN, A., ZETTERBERG, M., SJOSTRAND, J., PALSSON, A.Z., KARLSSON, J.O. (2005) **Potential protective effects of NSAIDs/ASA in oxidatively stressed human lens epithelial cells and intact mouse lenses in culture.** Ophthalmic Res. 37, 318-327.

RACKER, E. (1974) **History of the Pasteur effect and its pathobiology.** Mol. Cell. Biochem. 5, 17-23.

RAO, C.V., REDDY, B.S. (2004) **NSAIDs and chemoprevention.** Curr. Cancer Drug Targets 4, 29-42.

RICHTER, M., WEISS, M., WEINBERGER, I., FURSTENBERGER, G., MARIAN, B. (2001) **Growth inhibition and induction of apoptosis in colorectal tumor cells by cyclooxygenase inhibitors.** Carcinogenesis 22: 17-25.

ROBERTS, S.N., SOMERO, G.N. (1987) **Binding of phosphofructokinase to filamentous actin.** Biochemistry 26, 3437-3442.

RODRIGUEZ, L.A.G., HUERTA-ALVAREZ, C. (2000) **Reduced incidence of colorectal adenoma among long-term users of nonsteroidal antiinflammatory drugs: a pooled analysis of published studies and a new population-based study.** Epidemiology 11, 376-381.

SEMENZA, G.L., ARTEMOV, D., BEDI, A., BHUJWALLA, Z., CHILES, K., FELDSER, D., LAUGHNER, E., RAVI, R., SIMONS, J., TAGHAVI, P., ZHONG, H. (2001) **The metabolism of tumors: 70 years later.** Novartis Found. Symp. 240, 251-260.

SHAW, R.J. (2006) **Glucose metabolism and cancer.** Current Opinion in Cell Biology 18: 598-608.

SHIFF, S.J., KOUTSOS, M.I., QIAO, L., RIGAS, B. (1996) **Nonsteroidal antiinflammatory drugs inhibit the proliferation of colon adenocarcinoma cells: effects on cell cycle and apoptosis.** Exp. Cell Res. 222, 179-188.

SILVA, A.P., ALVES, G.G., ARAÚJO, A.H.B., SOLA-PENNA, M. (2004) **Effects of insulin and actin on phosphofructokinase activity and cellular distribution in skeletal muscle.** Annals of the Brazilian Academy of Sciences 76(3): 541-548.

SOLA-PENNA, M., SANTOS, A.C., SEREJO, F., ALVES, G.G., EL-BACHA, T. FABER-BARATA, J., PEREIRA, M.F., DA POIAN, A.T., SORENSON, M. (2002) **A radioassay for phosphofructokinase-1 activity in cell extracts and purified enzyme.** J. Biochem. Biophys. Meth. 50, 129-140.

STANLEY, W.C., CONNETT, R.J. (1991) **Regulation of muscle carbohydrate metabolism during exercise.** Faseb J. 5, 2155-2159.

STRYER, L. (1995) **Biochemistry** 4^o ed. W.H. Freeman and Company, New York, NY.

TARUI S., OKUNO G., IKURA Y., TANAKA T., SUDA M., NISHIKAWA M. (1965) **Phosphofructokinase deficiency in skeletal muscle. A new type of glycogenosis.** Biochem. Biophys. Res. Commun. 19: 517-523.

TORNHEIM, K., LOWENSTEIN, J.M. (1976) **Control of phosphofructokinase from rat skeletal muscle. Effects of fructose diphosphate, AMP, ATP and citrate.** J. Biol. Chem. 251: 7322-7328

ULRICH, C.M., BIGLER, J., POTTER, J.D. (2006) **Non-steroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention: promise, perils and pharmacogenetics.** Nature Reviews Cancer v.6 130-140.

UYEDA, K. (1979) **Phosphofructokinase.** Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., v. 48, p. 193-244.

VAN SCHAFTINGEN, E.; HERS, H.G. (1980) **Synthesis of a stimulator of phosphofructokinase, most likely fructose 2,6-bisphosphate, from phosphoric acid and fructose 6-phosphoric acid.** Biochem. Biophys. Res. Commun. 96: 1524-1531

VANE, J.R. (1971) **Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs.** Nat. New Biol. 231: 232-352.

VANE, J.R., BOTTING, R.M. (2003) **The mechanism of action of aspirin.** Thrombosis Research 110: 255-258.

VÉRTESSY B.G., OROSZ F., KOVÁCSJ., OVÁDI J. (1997) **Alternative binding of two sequential glycolytic enzymes to microtubules. Molecular studies in the phosphofructokinase/aldolase/microtubule system.** J. Biol. Chem. 279: 25542-25546.

VORA S., FRANCKE U. (1981) **Assignment of the human gene for liver-type 6-phosphofructokinase isozyme (PFKL) to chromosome 21 by using somatic cell hybrids and monoclonal anti-L antibody.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:3738-3742.

WARBURG, O. (1930) **Ueber den stoffwechsel der tumoren.** Constable, London, UK.

WEITZ, J., KOCH, M., DEBUS, J., HOHLER, T., GALLE, P.R., BUCHLER, M.W. (2005) **Colorectal cancer.** Lancet ; 365: 153-65.

WONG, B.C.Y., ZHU, G.H., LAM, S.K. (1999) **Aspirin induced apoptosis in gastric cancer cells.** *Biomed. Pharmacother.* 53, 315–318.

XU, R.H., PELICANO, H., ZHOU, Y., CAREW, J.S., FENG, L., BHALLA, K.N., KEATING, M.J., HUANG, P. (2005) **Inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia.** *Cancer Res.* 65: 613-621.

YUAN, M, KONSTANTOPOULOS, N., LEE, J., HANSEN, L., LI, Z.W., KARIN, M., ET AL. (2001) **Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikk beta.** *Science* 293:1673-1677.

ZANCAN, P., SOLA-PENNA, M. (2005a) **Calcium influx: a possible role for insulin modulation of intracellular distribution and activity of 6-phosphofructo-1-kinase in human erythrocytes.** *Mol. Genet. Metab.*, 86: 392-400.

ZANCAN, P., SOLA-PENNA, M. (2005b) **Regulation of human erythrocyte metabolism by insulin: cellular distribution of 6-phosphofructo-1-kinase and its implication for red blood cell function.** *Mol. Genet. Metab.* 86: 401-411.

ZANCAN, P., ROSAS, A.O., MARCONDES, M.C., MARINHO-CARVALHO, M.M., SOLA-PENNA, M. (2007a) **Clotrimazole inhibits and modulates heterologous association of the key glycolytic enzyme 6-phosphofructo-1-kinase** *Biochem. Pharmacol.* 73;1520–1527.

ZANCAN, P., ALMEIDA, F.V., FABER-BARATA, J., DELLIAS, J.M., SOLA-PENNA, M., (2007b) **Fructose-2,6-bisphosphate counteracts guanidinium chloride-, thermal-, and ATP-induced dissociation of skeletal muscle key glycolytic enzyme 6-phosphofructo-1-kinase: A structural mechanism for PFK allosteric regulation.** *Arch.Biochem.Biophys.* 467: 275-282.

ZANCAN, P., MARINHO-CARVALHO, M.M., FABER-BARATA, J., DELLIAS, J.M., SOLA-PENNA, M. (2008) **ATP and fructose-2,6-bisphosphate regulate skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase by altering its quaternary structure.** *IUBMB.Life* 60: 526-533.

ZHAB, S., YEGNASUBRAMANIAN, V., NELSON, W.H., ISAACS, W.B., DE MARZO, A.M. (2004) **Cyclooxygenases in cancer: progress and perspective.** *Cancer Lett.* 215, 1–20.

8 ANEXO

Spitz, G.A.; Furtado, C.M.; Sola-Penna, M.; Zancan, P. *Acetylsalicylic acid and salicylic acid decrease tumor cell viability and glucose metabolism modulating 6-phosphofructo-1-kinase structure and activity*. *Biochemical Pharmacology*, *in press*, 2008.

available at www.sciencedirect.comjournal homepage: www.elsevier.com/locate/biochempharm

Acetylsalicylic acid and salicylic acid decrease tumor cell viability and glucose metabolism modulating 6-phosphofructo-1-kinase structure and activity

Guilherme A. Spitz, Cristiane M. Furtado, Mauro Sola-Penna, Patricia Zancan*

Laboratório de Oncobiologia Molecular (LabOMol) and Laboratório de Enzimologia e Controle do Metabolismo (LabECOM), Departamento de Fármacos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941-590, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 August 2008

Accepted 15 September 2008

Keywords:

Cancer

NSAID

Metabolism

Glycolysis

Phosphofructokinase

MCF-7

Viability

ABSTRACT

The common observation that cancer cells present higher glycolytic rates when compared to control cells leads to the proposal of glycolysis as a potential target for the development of anti-tumoral agents. Anti-inflammatory drugs, such as acetylsalicylic acid (ASA) and salicylic acid (SA), present anti-tumoral properties, inducing apoptosis and altering tumor glucose utilization. The present work aims at evaluating whether ASA could directly decrease cell glycolysis through inhibition of the major regulatory enzyme within this pathway, 6-phosphofructo-1-kinase (PFK). We show that ASA and SA inhibit purified PFK in a dose-dependent manner, and that this inhibition occurs due to the modulation of the enzyme quaternary structure. ASA and SA promote the dissociation of the enzyme active tetramers into quite inactive dimers, a common regulatory mechanism of this enzyme. The inhibitory effects of ASA and SA on PFK are fully reversible and can be prevented or reverted by the binding of the enzyme to the actin filaments. Both drugs are also able to decrease glucose consumption by human breast cancer cell line MCF-7, as well as its viability, which decrease parallelly to the inhibition of PFK on these cells. In the end, we demonstrate the ability of ASA and SA to directly modulate an important regulatory intracellular enzyme, and propose that this is one of their mechanisms promoting anti-tumoral effects.

© 2008 Published by Elsevier Inc.

1. Introduction

Cancer cells are highly dependent on glycolysis even under normoxia, in a phenomenon called “Warburg effect” [1]. Glycolytic inhibitors, depriving cancer cells for their energy supply, are under discussion for a new class of anticancer drugs [2–6]. It has been shown that classical anticancer drugs, such as vinblastine [7], vincristine [8] and paclitaxel [9], also modulate glycolytic enzymes activity and cellular distribution, contributing to their effects on tumor cells viability. Other drugs with potential anticancer activity, such as the antifungal

clotrimazole, have been demonstrated to decrease cancer cells viability through inhibition of glycolytic enzymes [3,10,11,4].

Acetylsalicylic acid (ASA), the acetylated derivative of salicylic acid (SA), is one of the leading non-steroidal anti-inflammatory drugs, which can behave as an apoptosis-inducing agent in animal cancer cells [12,13]. The anticancer action of ASA has been attributed to its effects on cyclooxygenases (COx) [13]. However, COx negative colon cancer cell line SW480 undergoes apoptosis upon ASA action, revealing that other mechanisms different from COx inhibition may also be triggered by ASA, resulting in cell apoptosis [14].

* Corresponding author. Tel.: +55 21 2260 9192x215.

E-mail address: pzancan@ufrj.br (P. Zancan).

Abbreviations: ASA, acetylsalicylic acid; SA, salicylic acid; PFK, 6-phosphofructo-1-kinase, phosphofructokinase.

0006-2952/\$ – see front matter © 2008 Published by Elsevier Inc.

doi:10.1016/j.bcp.2008.09.020

Recently, it has been demonstrated that apoptosis is closely related to glycolysis, since the pro-apoptotic protein BAD associates to hexokinase [15] and to 6-phosphofructo-1-kinase (PFK, phosphofructokinase) [16], playing a crucial role on these enzymes modulation by external signals. Conversely, anti-apoptotic signals that modulate BAD increase the glycolytic rate through BAD-mediated activation of PFK [16]. Moreover, inhibition of PFK activity in human breast cancer cell line MCF-7 decreases the cells viability inducing apoptosis [3]. The present study aims at evaluating the effects of ASA and SA on surviving, glucose consumption and PFK activity of tumor cells, as well as on the purified enzyme.

2. Materials and methods

2.1. Materials

ATP, ADP and F6P were purchased from Sigma–Aldrich Brasil Ltda (São Paulo, SP, Brazil). The human breast cancer cell line MCF-7 was obtained from Cell Bank of Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, UFRJ, Brazil, and maintained in Dubelcco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco, Invitrogen, USA) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS, Gibco, Invitrogen, USA). Other chemicals were of the highest purity available. $[^{32}\text{P}]\text{H}_2\text{PO}_4$ were purchased from Instituto de Pesquisa em Energia Nuclear (IPEN, Brazil) and were used to prepare $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ as described elsewhere [17]. PFK was purified from rabbit skeletal muscle according to Ref. [18], with the modification introduced by Ref. [19]. Muscle homogenates were prepared according to Ref. [20] and erythrocytes membrane according to Ref. [21]. All protein concentration determinations were performed according to Ref. [22].

2.2. Cell viability assay, glucose consumption and lactate production

MCF-7 cells were grown in DMEN medium supplemented with 10% FBS until confluence was achieved. The medium was removed and fresh medium containing the desired concentrations of ASA or SA was added and cells were returned to the incubator for 24 h. After this incubation, the medium was removed and used to evaluate the glucose consumption and lactate production, while the remaining cells were used for cell viability evaluation through MTT assay. Glucose consumption was performed as described previously [23,3], assessing the glucose content that remained in the culture media using a coupled enzyme system containing glucose oxidase/catalase (Glucos 500, Doles Ltda, GO, Brazil). Lactate production was evaluated as described previously [3] assessing the lactate content in the culture media incubating the media in the presence of lactate dehydrogenase and NAD^+ , and measuring the formation of NADH spectrophotometrically at 340 nm. As for MTT assay, cells were washed twice with PBS and 20 μl of 5 mg/ml MTT reagent (3,4,5-dimethylazol-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma–Aldrich Co., MA, USA) was added. After 3 h at the incubator, the reagent was removed and the formazan crystals formed were dissolved in 200 μl DMSO. Afterwards, the formazan content was evaluated in a

microplate reader set at 560 nm and subtracting the background at 670 nm.

2.3. Radioassay for PFK activity

PFK activity was assessed through the radiometric method developed by Sola-Penna et al. [24] with the modifications introduced by Zancan and Sola-Penna [25,26]. Briefly, PFK was assayed in a medium containing 50 mM Tris–HCl (pH 7.4), 5 mM MgCl_2 , 5 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 mM F6P, 1 mM $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ and, otherwise specified, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ purified PFK. Reaction was initiated by the addition of the enzyme and aliquots were withdrawn at increasing reaction times and transferred to tubes containing activated charcoal in 0.1 M HCl to interrupt the reaction and adsorb the unreacted $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. After centrifugation, $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ -adsorbed activated charcoal was pelleted, and aliquots of the supernatant containing $[1\text{-}^{32}\text{P}]\text{fructose-1,6-bisphosphate}$ (F1,6BP) were withdrawn and the radioactivity evaluated in a liquid scintillation counter. Blanks in the absence of F6P were run in parallel and subtracted from the data to correct the ATP hydrolysis. The amount of F1,6BP (nmol) measured in each condition was plotted against reaction time, and the linear coefficient of the curve was used to express PFK activity (mU).

2.4. Spectrophotometric assay for PFK activity

PFK activity was assayed as described previously [20] in a medium containing: 50 mM Tris–HCl (pH 7.4), 5 mM MgCl_2 , 5 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 mM fructose 6-P, 1 mM ATP, 0.5 mM NADH, 2 mU/ml aldolase, 2 mU/ml triosephosphate isomerase, 2 mU/ml α -glycerophosphate dehydrogenase and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of protein in a final volume of 200 μl . Other reagents used are indicated for each experiment. Reaction was started by the addition of protein and NADH oxidation was followed by measuring the decrease in absorbance at 340 nm in a microplate reader. Blanks in the absence of the coupled enzymes were performed to control non-specific NADH oxidation.

2.5. Intrinsic fluorescence measurements

PFK intrinsic fluorescence measurements were performed as described previously [27], in the same conditions described for the radioassay. Excitation wavelength was fixed at 280 nm and fluorescence emission was scanned from 300 to 400 nm. The center of mass of the intrinsic fluorescence spectra (c.m.) was calculated using:

$$\text{c.m.} = \frac{\sum \lambda I_\lambda}{\sum I_\lambda}$$

where λ is the wavelength and I_λ is the fluorescence intensity at a given λ . Center of mass is used to evaluate PFK oligomeric state, since the dissociated enzyme presents its tryptophans more exposed to the aqueous milieu and thus the fluorescence emitted by these tryptophans is of lower energy. Consequently, the center of mass of a population of tetramers is smaller than the parameter measured for a population of dimers, which has been confirmed in many recent publications [4,23,27–30].

2.6. Statistical analyses

Statistical analyses and non-linear regression were performed using the software SigmaPlot 10.0 integrated with SigmaStat 3.1 packages (Systat, CA, USA). Otherwise indicated, Student's t-test was used. P values ≤ 0.05 were used to consider statistically different mean values.

3. Results

Due to the reported apoptotic effects of ASA on some cancer cells [12,14], we decided to evaluate the effects of ASA, as well as its precursor SA, on the viability of human breast cancer cell line MCF-7. Both drugs decrease MCF-7 cells viability in a dose-dependent manner, in spite of presenting distinct effectiveness (Fig. 1A). It can be observed that SA is more potent than ASA decreasing cells viability, since 1 mM SA diminishes MCF-7 cells viability and similar effects are observed only with 4 mM ASA (Fig. 1A). Moreover, this difference in effectiveness remains up to 10 mM, when both compounds present similar effects on MCF-7 cells viability (Fig. 1A). These results are comparable to the effects of ASA and SA on MCF-7 glucose consumption, where, although, in a lesser extent, SA is also more effective than ASA inhibiting MCF-7 glucose consump-

tion (Fig. 1B). Here, differences between the two drugs are observed only up to 2 mM, since at higher concentrations both compounds present similar inhibitory effects on glucose consumption by the cells (Fig. 1B). Similar results are observed assessing lactate production (Fig. 1C), suggesting that the glycolytic flux is inhibited by the drugs. Furthermore, the major glycolytic regulatory enzyme, PFK, is also inhibited by ASA and SA when MCF-7 cells are incubated in the presence of the compounds and PFK activity is measured 24 h after incubation (Fig. 1D). Altogether, these results confirm that ASA and SA affect cancer cell viability and support evidences that they inhibit cell PFK as well as the whole glucose utilization.

Recently we have observed similar effects of those presented in Fig. 1 promoted by another compound, the antifungal clotrimazole, which also decreased MCF-7 cell viability, glucose utilization and PFK activity [3]. After that, we demonstrated that the effects of clotrimazole occurred through a direct action of the compound over PFK, altering its quaternary structure, intracellular distribution and catalytic activity [4]. This encouraged us to investigate the effects of ASA and SA directly on the purified PFK activity and quaternary structure. Initially, we evaluated the effects of ASA directly on PFK activity, assessed through the direct radio-metric method [24], which does not use auxiliary enzymes and

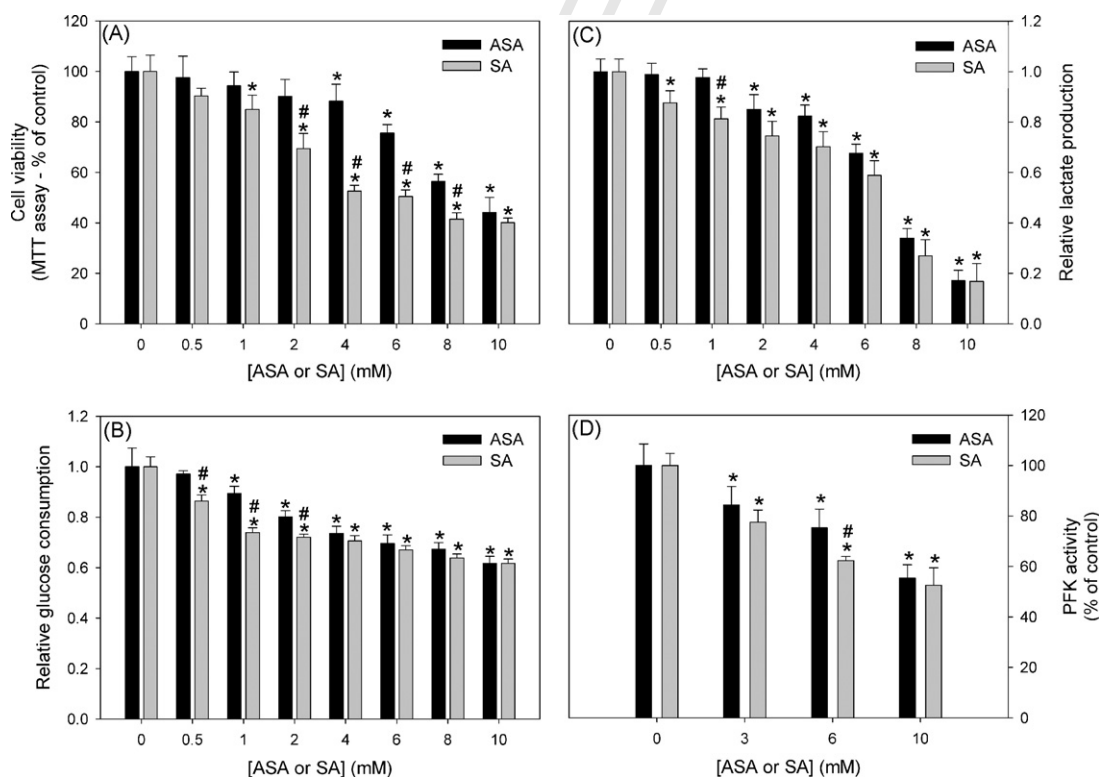


Fig. 1 – Effects of ASA and SA on MCF-7 cells viability, glucose consumption, lactate production and PFK activity. MCF-7 cells were grown to confluence in DMEM as indicated under Section 2. After that, the grown medium was removed and fresh medium containing the desired concentrations of ASA or SA was added and cells were incubated for 24 h under these conditions. Treated cells were used to evaluate viability (panel A), glucose consumption (panel B), lactate production (panel C) and PFK activity (panel D) as indicated under Section 2. For PFK activity, the spectrophotometric method was used. Plotted values are mean \pm standard errors of at least five independent experiments ($n \geq 5$). * $P < 0.05$ comparing to control, in the absence of drugs. # $P < 0.05$ comparing to the same concentrations of ASA. Student's t-test was used to evaluate statistically significant differences between the values.

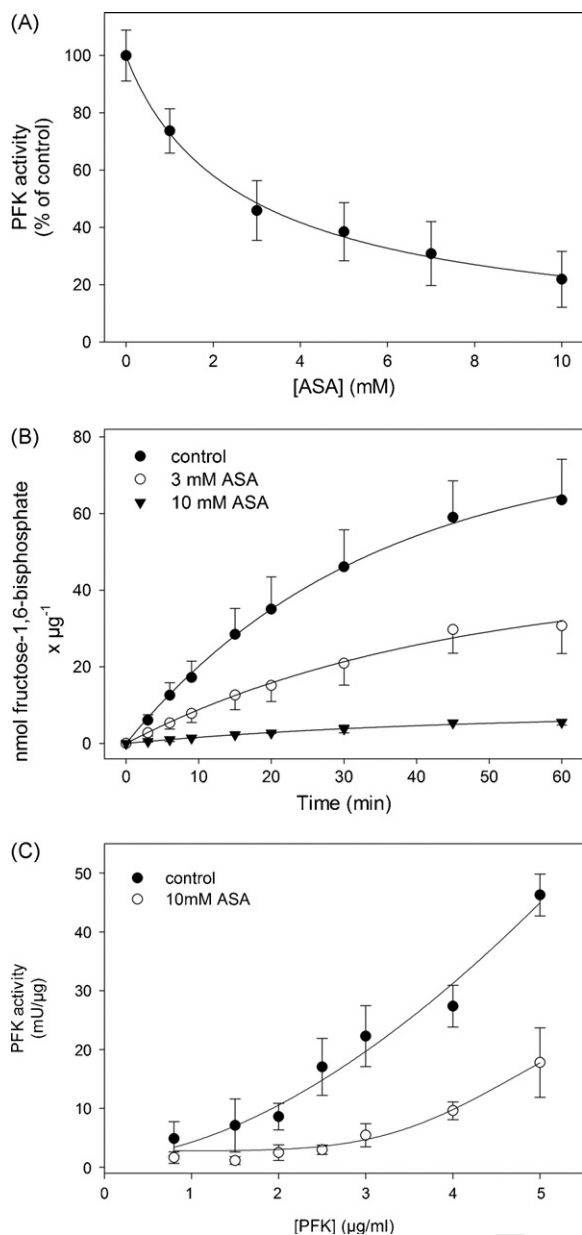


Fig. 2 – Effects of ASA on catalytic activity of purified PFK. Enzyme activity was evaluated as described under Section 2 through the radiometric assay, in the presence of the desired concentrations of ASA. Panel A: dose–response curve for the effects of ASA on PFK activity. Panel B: time course of PFK activity in the absence and in the presence of 3 mM and 10 mM ASA. Panel C: PFK titration curve of enzyme-specific activity in the absence and in the presence of 10 mM ASA. Plotted values are mean \pm standard errors of at least five independent experiments ($n \geq 5$).

allows the observation of the effects on PFK without interference of other proteins (Fig. 2). Similarly to the whole cell system, ASA inhibited purified PFK in a dose–response manner, presenting an $I_{0.5}$ of 2.3 ± 0.2 mM (Fig. 2A). Although these experiments were performed without pre-incubation of PFK with the drug, inhibition occurs since the first moment of

reaction, decreasing the rate of the products formation during all the recorded time (Fig. 2B). Moreover, ASA is able to inhibit PFK in a broad range of the enzyme concentrations (Fig. 2C). Particularly, enzyme concentration curves have been used as indicative of the oligomerization state of PFK in many recent publications [27,29,30]. This is possible due to the distinct catalytic rates of the major oligomeric conformations of PFK: the quite inactive dimers and the fully active tetramers [29,30]. Since the equilibrium between the oligomers is shifted to the more complex structures at higher concentrations of enzyme, it is observed that the specific activity of the enzyme increases when the tetramers are stabilized at high PFK concentrations. This have allowed us to predict the more stable structure calculating the transition between a conformation with lower specific activity (dimers) and high specific activity (tetramers) in a PFK concentration curve of the enzyme-specific activity [29,30], as presented in Fig. 2C. It can be seen that, in the presence of 10 mM ASA, the specific activity is not altered up to 3 $\mu\text{g/ml}$ PFK, differing from the control experiments, where specific activity augments gradually as PFK concentration increases (Fig. 2C). This is a strong indication that ASA is stabilizing the dimeric conformation of PFK, and so inhibiting the enzyme.

Aiming at evaluating the effects of ASA and SA on PFK oligomeric structure, we assessed the effects of the compounds on the center of mass of the intrinsic fluorescence spectra of PFK. We have validated that tetramers present this parameter more shifted to the blue region (higher energy, lower wavelength) of the spectrum, when compared to dimers, due to the lower exposition of the tryptophans presented in the interface of interaction between two dimers to form a tetramer [4,23,27,29,30]. Moreover, when dimers are formed, it can be observed a small (2–3 nm in average) shift of the center of mass to the red region (lower energy, higher wavelength). Here we show that ASA and SA promote a red-shift of the center of mass of intrinsic fluorescence spectra of PFK (Fig. 3A), which occurs parallelly to the inhibition of the enzyme activity (Fig. 3B), strongly suggesting that ASA and SA stabilize the dimeric conformation of PFK and thus inhibit the enzyme. These results corroborate the findings of Fig. 2C, reported above. Furthermore, in these experiments SA was also more efficient than ASA, corroborating the results presented in Fig. 1, and indicating that the inhibitory effects of the ASA are not dependent on the acetylation of PFK, since SA, that is not able to acetylate proteins, promotes similar and even more potent effects. This encouraged us to test the reversibility of the effects of ASA and SA on purified PFK. Fig. 4 shows the PFK activity of the enzyme pre-incubated for 1 h in the presence of 1 mM or 10 mM ASA and SA, and then assayed for catalytic activity immediately or after 24 h dialysis to remove the compounds. It is clear that after removal of ASA or SA, PFK recover the same activity as control, revealing that the inhibitory effects of ASA and SA are fully reversible.

The ability of PFK to interact with actin filaments (f-actin) within cell cytoskeleton has been recognized as an important issue of the enzyme regulatory mechanism, participating on the regulation of glycolysis by metabolites [23,25,27,29–32], drugs [3,4], hormones [33,20,34,26] and in diseases [2–4,32,35]. The interaction of PFK and f-actin promotes an increase in the enzyme-specific activity and thus in the whole glycolytic rate,

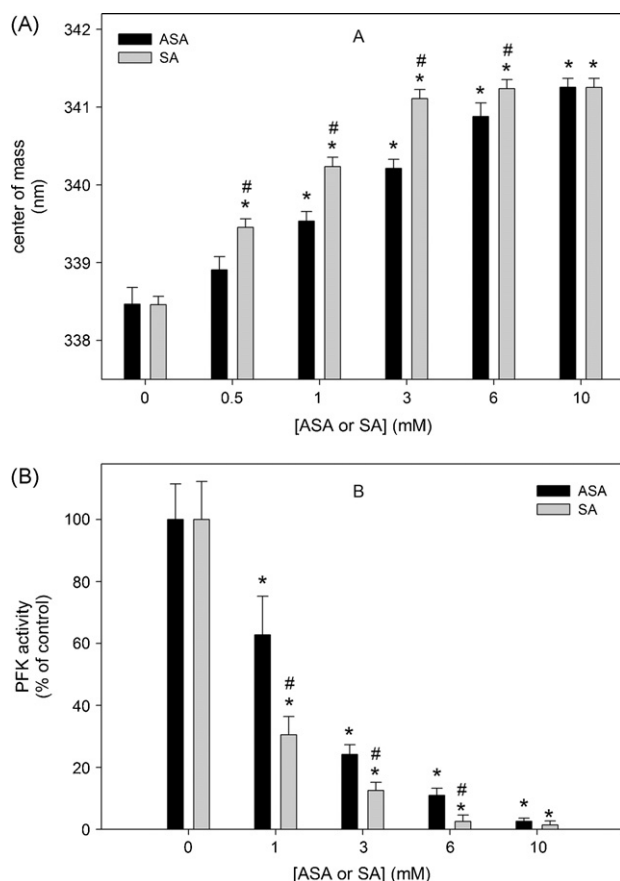


Fig. 3 – Effects of ASA and SA on PFK function-structure relationship. Purified PFK was incubated for 1 h in the presence of the concentrations of ASA or SA indicated in each panel. The treated enzyme was used to evaluate its quaternary structure, assessing the center of mass of the intrinsic fluorescence spectra (panel A), and the catalytic activity, through the spectrophotometric assay (panel B), as indicated under Section 2. Plotted values are mean \pm standard errors of at least four independent experiments ($n \geq 4$). * $P < 0.05$ comparing to control, in the absence of drugs. # $P < 0.05$ comparing to the same concentrations of ASA. Student's t-test was used to evaluate statistically significant differences between values.

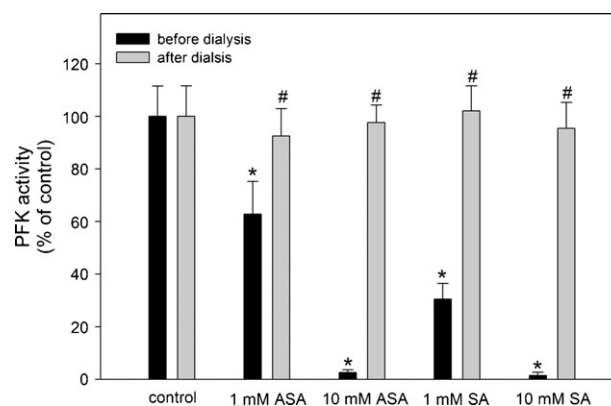


Fig. 4 – Reversibility of the effects of ASA and SA on purified PFK activity. Purified PFK was incubated for 1 h in the presence of the concentrations of ASA or SA indicated in each panel. After incubation, an aliquot of the samples were subjected to dialysis for 24 h to remove the drugs. PFK catalytic activity was assayed immediately after the treatment with the drugs (before dialysis) and after removal of the drugs (after dialysis). Plotted values are mean \pm standard errors of at least five independent experiments ($n \geq 5$). * $P < 0.05$ comparing to control, in the absence of drugs. # $P < 0.05$ comparing to the same condition, before the dialysis. Student's t-test was used to evaluate statistically significant differences between the values.

would the f-actin present in cells prevent the inhibitory effects of the drugs? At first sight, we could answer that the drugs inhibit PFK in f-actin containing cells, since we have already observed this inhibition in MCF-7 cells, where we have previously proved that PFK interacts with f-actin being activated [3]. Aiming to discard any doubts about the inhibitory properties of ASA and SA in a cell presenting high f-actin content, we tested the effects of the drugs on PFK activity of mouse skeletal muscle homogenates. These experiments reveal that both ASA and SA inhibit PFK activity in a dose-dependent manner, even in cellular systems containing high amounts of f-actin, such as skeletal muscle (Fig. 5C). Furthermore, we observed very similar effects of these compounds in intact human erythrocytes, which present low f-actin content (data not shown).

4. Discussion

The relationship between cancer and glucose metabolism has recovered its importance due to some relevant recent publications [36–41,6]. It is clear from the literature the necessity of tumors to use glucose as the major source of energy, as well as the close correlation between glucose usage and tumor aggressiveness [36,37,2]. Despite the necessity of finding some therapeutic selectivity without affecting normal cell, when searching for new drugs and strategies for cancer control, glycolysis has been proposed as a promising target for the development of new anti-tumoral drugs [38–41].

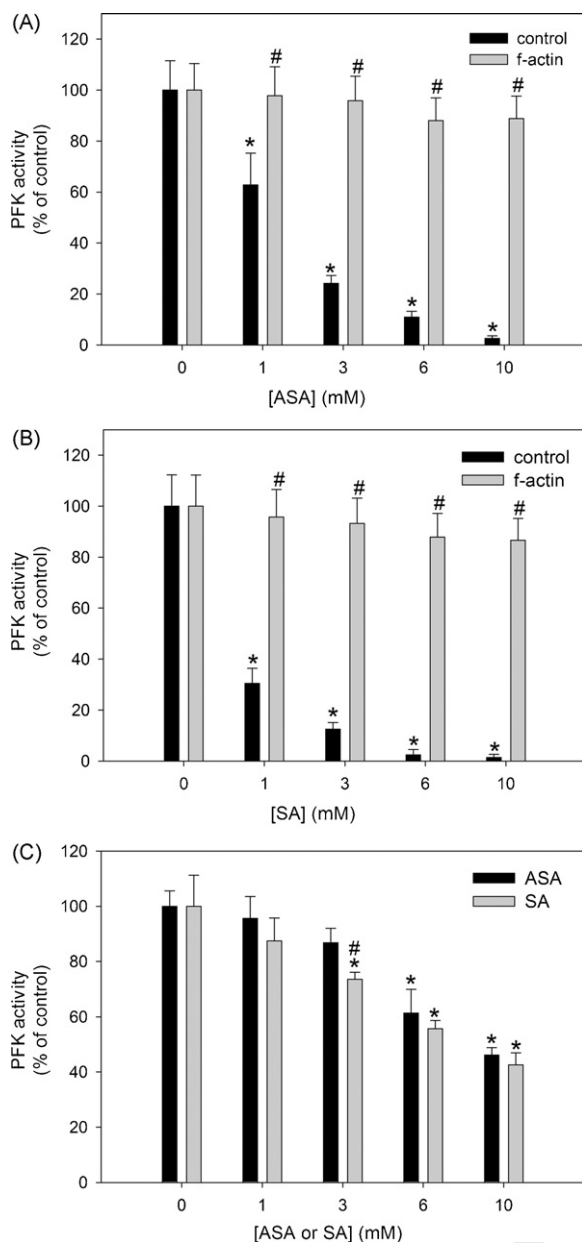


Fig. 5 – Modulation of PFK activity by ASA and SA in the presence of f-actin and of muscle homogenates. Purified PFK was incubated for 1 h in the presence of the concentrations of ASA (panel A) or SA (panel B) indicated, in the absence or in the presence of 0.1 mg/ml f-actin. PFK activity was evaluated through the radiometric method, as indicated under Section 2. Plotted values are mean \pm standard errors of at least three independent experiments ($n \geq 3$). * $P < 0.05$ comparing to each control, in the absence of drugs. # $P < 0.05$ comparing to the same concentrations of drugs in the absence of f-actin. Panel C: muscle homogenates were treated for 1 h in the presence of the drugs and PFK activity was evaluated through the spectrophotometric assay, as indicated under Section 2. Plotted values are mean \pm standard errors of at least four independent experiments ($n \geq 4$). * $P < 0.05$ comparing to control, in the absence of drugs. # $P < 0.05$ comparing to the same concentrations of ASA. Student's t-test was used to evaluate statistically significant differences between the values.

Within glycolytic pathway, there is a consensus that the key regulatory role is played by PFK, probably the most complex regulatory enzyme in this pathway [18,42–44]. PFK is regulated by a series of physiological and non-physiological ligands including metabolites [44,23,29,30], proteins [33,20,27,34,16] and drugs [3,4,9,11,45–47]. Apparently, most of these signals modulate PFK affecting the equilibrium between the two major oligomeric conformations of the enzyme: the quite inactive dimers and the fully active tetramers [4,20,23,27–30]. PFK activity is increased in tumor tissues [2] and cells [3], and some drugs able to decrease tumor cells growth also decrease PFK activity, two phenomena that are probably correlated [3,9–11,47]. More recently, it has been demonstrated that PFK is also directly correlated to the control of apoptosis, binding to the pro-apoptotic protein BAD, and causing its activity to decrease when apoptosis initiates [16]. The role of PFK on apoptosis is still unknown, but it is proposed that the decrease in its activity would diminish the glycolytic pathway and ATP supply to the cell, phenomena that occur simultaneously to apoptosis [16].

The recent finding that ASA induce apoptosis in tumor cell lines [14,12] reinforces the use to non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID), such as ASA, as a treatment for cancer [48–50]. In the present work, we demonstrate that ASA, as well as its precursor SA, decrease the human breast tumor cell line MCF-7 viability, diminishing its glucose consumption and PFK activity. Although PFK is very sensitive to pH changes, it is not the inhibitory mechanism observed here, since the drugs were diluted in buffered solutions and the final pH was monitored before the experiments. Moreover, we also show that the drugs are able to directly inhibit PFK, altering its quaternary structure through a mechanism common to other modulators of the enzyme. These findings might be directly correlated to the pro-apoptotic effects of ASA, since modulation of PFK quaternary structure (such as the effects of ASA and SA on PFK) recognizably alters its association to other proteins [20,23,27,4,29,30], and can also modulate its association to BAD modulating apoptosis. It would not be the first time that it is observed that inhibition of PFK is followed by cell death through apoptosis, as it was observed upon treatment of MCF-7 with clotrimazole [3]. Despite being speculative, it sounds reasonable to correlate the inhibitory effects of ASA on PFK with its anti-tumoral and pro-apoptotic activities, and certainly a lot of studies and efforts must be done before proving this hypothesis. On the other hand, the anti-tumoral properties of ASA could not be ignored, and it is strongly supported by a recent clinical study where it was demonstrated that breast cancer risk dramatically decreases with chronic use of ASA [51]. In this trial, it was established that volunteers receiving low doses of ASA (~100 mg/day) did not experience a reduction in breast cancer risk, supporting that high doses of the drug are required for this property [51]. The concentrations used in the present study are very high, when compared to plasma concentrations achieved upon oral administration of ASA or SA (<0.1 mM) [52]. However, it is very difficult to determine the cellular concentration of the drugs, since they can accumulate in the cytosol at concentrations higher than those found in plasma [52]. Therefore, we cannot infer whether the concentrations used here are achieved or not under therapeutic conditions, nor if these

drugs could be used as preventive drugs. Nevertheless, several studies evaluating the effects of ASA on cellular viability, apoptosis and other properties have used the same concentrations found in the present study, reinforcing our results [1,14,12,53,54].

Furthermore, our results show that SA is more effective than ASA inhibiting PFK in purified system (Figs. 2 and 3), muscle homogenate (Fig. 5), in MCF-7 cells (Fig. 1), as well as in intact human erythrocytes (data not shown). This difference in effectiveness is also observed on the ability to modulate PFK quaternary structure (Fig. 4), as well as in decreasing tumor cells glucose consumption and viability (Fig. 1). This might be due to the higher solubility of SA over ASA. This corroborates our hypothesis that the effects of these compounds occur (non-exclusively, but partially) over PFK that, being an intracellular enzyme, is more susceptible to be affected by small and soluble compounds that easily diffuse within the cytosol. Finally, we can propose that not just ASA could be used as an anti-tumoral agent, but also SA.

Acknowledgements

Grateful thanks are due to Rafael Machado for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Fundação Ary Frauzino/Fundação Educacional Charles Darwin (FAF/FECD Programa de Oncobiologia), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Programa de Núcleos de Excelência (PRONEX).

REFERENCES

- Cuesta E, Boada J, Perales JC, Roig T, Bermudez J. Aspirin inhibits NF- κ B activation in a glycolysis-depleted lung epithelial cell line. *Eur J Pharmacol* 2005;517: 158-64.
- El-Bacha T, de Freitas MS, Sola-Penna M. Cellular distribution of phosphofructokinase activity and implications to metabolic regulation in human breast cancer. *Mol Genet Metab* 2003;79:294-9.
- Meira DD, Marinho-Carvalho MM, Teixeira CA, Veiga VF, Da Poian AT, Holandino C, et al. Clotrimazole decreases human breast cancer cells viability through alterations in cytoskeleton-associated glycolytic enzymes. *Mol Genet Metab* 2005;84:354-62.
- Zancan P, Rosas AO, Marcondes MC, Marinho-Carvalho MM, Sola-Penna M. Clotrimazole inhibits and modulates heterologous association of the key glycolytic enzyme 6-phosphofructo-1-kinase. *Biochem Pharmacol* 2007;73:1520-7.
- Meier-Ruge WA, Bruder E. Current concepts of enzyme histochemistry in modern pathology. *Pathobiology* 2008;75:233-43.
- Shaw RJ. Glucose metabolism and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 2006;18:598-608.
- Vertessy BG, Kovacs J, Low P, Lehotzky A, Molnar A, Orosz F, et al. Characterization of microtubule-phosphofructokinase complex: specific effects of MgATP and vinblastine. *Biochemistry* 1997;36: 2051-62.
- Orosz F, Vertessy BG, Salerno C, Crifo C, Capuozzo E, Ovadi J. The interaction of a new anti-tumour drug, KAR-2 with calmodulin. *Br J Pharmacol* 1997;121:955-62.
- Glass-Marmor L, Beitner R. Taxol (paclitaxel) induces a detachment of phosphofructokinase from cytoskeleton of melanoma cells and decreases the levels of glucose 1,6-bisphosphate, fructose 1,6-bisphosphate and ATP. *Eur J Pharmacol* 1999;370:195-9.
- Penso J, Beitner R. 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* 2002;76:181-8.
- Penso J, Beitner R. Clotrimazole decreases glycolysis and the viability of lung carcinoma and colon adenocarcinoma cells. *Eur J Pharmacol* 2002;451:227-35.
- Garcia-Heredia J, Hervas M, De la Rosa M, Navarro J. Acetylsalicylic acid induces programmed cell death in Arabidopsis cell cultures. *Planta* 2008;228:89-97.
- Loll PJ, Picot D, Garavito RM. The structural basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin H₂ synthase. *Nat Struct Biol* 1995;2:637-43.
- Lai MY, Huang JA, Liang ZH, Jiang HX, Tang GD. Mechanisms underlying aspirin-mediated growth inhibition and apoptosis induction of cyclooxygenase-2 negative colon cancer cell line SW480. *World J Gastroenterol* 2008;14:4227-33.
- Daniel NN, Gramm CF, Scorrano L, Zhang CY, Krauss S, Ranger AM, et al. BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis. *Nature* 2003;424:952-6.
- Deng H, Yu F, Chen J, Zhao Y, Xiang J, Lin A. Phosphorylation of Bad at Thr-201 by JNK1 promotes glycolysis through activation of phosphofructokinase-1. *J Biol Chem* 2008;283:20754-60.
- Maia, JCC, Gomes, SL, Juliani, MH. Preparation of [α -³²P] and [β -³²P]-nucleoside triphosphate, with high specific activity; first edition. 1983: 146-157.
- Kemp RG. Phosphofructokinase from rabbit skeletal muscle. *Methods Enzymol* 1975;42:71-7.
- Kuo HJ, Malencik DA, Liou RS, Anderson SR. Factors affecting the activation of rabbit muscle phosphofructokinase by actin. *Biochemistry* 1986;25: 1278-86.
- Coelho WS, Costa KC, Sola-Penna M. Serotonin stimulates mouse skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase through tyrosine-phosphorylation of the enzyme altering its intracellular localization. *Mol Genet Metab* 2007;92:364-70.
- Alves GG, Lima LM, Favero-Retto MP, Lemos AP, Peres-Sampaio CE, Meyer-Fernandes JR, et al. p-Nitrophenylphosphatase activity catalyzed by plasma membrane (Ca²⁺ + Mg²⁺)-ATPase: correlation with structural changes modulated by glycerol and Ca²⁺. *Biosci Rep* 2001;21:25-32.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
- Leite TC, Da Silva D, Coelho RG, Zancan P, Sola-Penna M. Lactate favours the dissociation of skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase tetramers down-regulating the enzyme and muscle glycolysis. *Biochem J* 2007;408:123-30.
- Sola-Penna M, dos Santos AC, Alves GG, El-Bacha T, Faber-Barata J, Pereira MF, et al. A radioassay for phosphofructokinase-1 activity in cell extracts and purified enzyme. *J Biochem Biophys Methods* 2002;50:129-40.
- Zancan P, Sola-Penna M. Calcium influx: a possible role for insulin modulation of intracellular distribution and activity of 6-phosphofructo-1-kinase in human erythrocytes. *Mol Genet Metab* 2005;86:392-400.

- 481 [26] Zancan P, Sola-Penna M. Regulation of human erythrocyte
482 metabolism by insulin: cellular distribution of 6-
483 phosphofructo-1-kinase and its implication for red blood
484 cell function. *Mol Genet Metab* 2005;86:401–11.
- 485 [27] Marinho-Carvalho MM, Zancan P, Sola-Penna M.
486 Modulation of 6-phosphofructo-1-kinase oligomeric
487 equilibrium by calmodulin: formation of active dimers. *Mol*
488 *Genet Metab* 2006;87:253–61.
- 489 [28] Faber-Barata J, Sola-Penna M. Opposing effects of two
490 osmolytes—trehalose and glycerol—on thermal
491 inactivation of rabbit muscle 6-phosphofructo-1-kinase.
492 *Mol Cell Biochem* 2005;269:203–7.
- 493 [29] Zancan P, Almeida FV, Faber-Barata J, Dellias JM, Sola-
494 Penna M. Fructose-2,6-bisphosphate counteracts
495 guanidinium chloride-, thermal-, and ATP-induced
496 dissociation of skeletal muscle key glycolytic enzyme 6-
497 phosphofructo-1-kinase: a structural mechanism for PFK
498 allosteric regulation. *Arch Biochem Biophys* 2007;467:
499 275–82.
- 500 [30] Zancan P, Marinho-Carvalho MM, Faber-Barata J, Dellias JM,
501 Sola-Penna M. ATP and fructose-2,6-bisphosphate regulate
502 skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase by altering its
503 quaternary structure. *IUBMB Life* 2008;60:526–33.
- 504 [31] Alves GG, Marinho-Carvalho MM, Atella GC, Silva-Neto MA,
505 Sola-Penna M. Allosteric regulation of 6-phosphofructo-1-
506 kinase activity of fat body and flight muscle from the
507 bloodsucking bug *Rhodnius prolixus*. *An Acad Bras Cienc*
508 2007;79:53–62.
- 509 [32] Sola-Penna M. Metabolic regulation by lactate. *IUBMB Life*
510 2008;60:605–8.
- 511 [33] Alves GG, Sola-Penna M. Epinephrine modulates cellular
512 distribution of muscle phosphofructokinase. *Mol Genet*
513 *Metab* 2003;78:302–6.
- 514 [34] Silva AP, Alves GG, Araujo AH, Sola-Penna M. Effects of
515 insulin and actin on phosphofructokinase activity and
516 cellular distribution in skeletal muscle. *An Acad Bras Cienc*
517 2004;76:541–8.
- 518 [35] El-Bacha T, Menezes MM, Azevedo e Silva MC, Sola-Penna
519 M, Da Poian AT. Mayaro virus infection alters glucose
520 metabolism in cultured cells through activation of the
521 enzyme 6-phosphofructo 1-kinase. *Mol Cell Biochem*
522 2004;266:191–8.
- 523 [36] Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic
524 glycolysis? *Nat Rev Cancer* 2004;4:891–9.
- 525 [37] Ashrafian H. Cancer's sweet tooth: the Janus effect of
526 glucose metabolism in tumorigenesis. *Lancet* 2006;367:
527 618–21.
- 528 [38] Chesney J. 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-
529 bisphosphatase and tumor cell glycolysis. *Curr Opin Clin*
530 *Nutr Metab Care* 2006;9:535–9.
- 531 [39] Clem B, Telang S, Clem A, Yalcin A, Meier J, Simmons A,
532 et al. Small-molecule inhibition of 6-phosphofructo-2-
533 kinase activity suppresses glycolytic flux and tumor
534 growth. *Mol Cancer Ther* 2008;7:110–20.
- [40] Pelicano H, Martin DS, Xu RH, Huang P. Glycolysis
inhibition for anticancer treatment. *Oncogene*
2006;25:4633–46. 535
536
537
- [41] Xu RH, Pelicano H, Zhou Y, Carew JS, Feng L, Bhalla KN,
et al. Inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy
to overcome drug resistance associated with mitochondrial
respiratory defect and hypoxia. *Cancer Res* 2005;65:
613–21. 538
539
540
541
542
- [42] Uyeda K. Phosphofructokinase. *Adv Enzymol Relat Areas*
Mol Biol 1979;48:193–244. 543
544
- [43] Hers HG, Van Schaftingen E. Fructose 2,6-bisphosphate 2
years after its discovery. *Biochem J* 1982;206:1–12. 545
546
- [44] Kemp RG, Gunasekera D. Evolution of the allosteric ligand
sites of mammalian phosphofructo-1-kinase. *Biochemistry*
2002;41:9426–30. 547
548
549
- [45] Glass-Marmor L, Beitner R. Detachment of glycolytic
enzymes from cytoskeleton of melanoma cells induced
by calmodulin antagonists. *Eur J Pharmacol* 1997;328:
241–8. 550
551
552
553
- [46] Karniel M, Beitner R. 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* 2000;69:40–5. 554
555
556
557
- [47] Schwartz D, Beitner R. Detachment of the glycolytic
enzymes, phosphofructokinase and aldolase, from
cytoskeleton of melanoma cells, induced by local
anesthetics. *Mol Genet Metab* 2000;69:159–64. 558
559
560
561
- [48] Reddy BS, Rao CV, Rivenson A, Kelloff G. Inhibitory effect of
aspirin on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in
F344 rats. *Carcinogenesis* 1993;14:1493–7. 562
563
564
- [49] Garcia Rodriguez LA, Huerta-Alvarez C. Reduced incidence
of colorectal adenoma among long-term users of
nonsteroidal antiinflammatory drugs: a pooled analysis of
published studies and a new population-based study.
Epidemiology 2000;11:376–81. 565
566
567
568
569
- [50] Garcia-Rodriguez LA, Huerta-Alvarez C. Reduced risk of
colorectal cancer among long-term users of aspirin and
nonaspirin nonsteroidal antiinflammatory drugs.
Epidemiology 2001;12:88–93. 570
571
572
573
- [51] Kirsh VA, Kreiger N, Cotterchio M, Sloan M, Theis B.
Nonsteroidal antiinflammatory drug use and breast cancer
risk: subgroup findings. *Am J Epidemiol* 2007;166:709–16. 574
575
576
577
- [52] Yoovathaworn KC, Sriwatanakul K, Thithapandha A.
Influence of caffeine on aspirin pharmacokinetics. *Eur J*
Drug Metab Pharmacokinet 1986;11:71–6. 578
579
- [53] Abbadessa G, Spaccamiglio A, Sartori ML, Nebbia C,
Dacasto M, Di CF, et al. The aspirin metabolite, salicylate,
inhibits 7,12-dimethylbenz[a]anthracene–DNA adduct
formation in breast cancer cells. *Int J Oncol* 2006;28:1131–
40. 580
581
582
583
584
- [54] Ho CC, Yang XW, Lee TL, Liao PH, Yang SH, Tsai CH, et al.
Activation of p53 signalling in acetylsalicylic acid-induced
apoptosis in OC2 human oral cancer cells. *Eur J Clin Invest*
2003;33:875–82. 585
586
587
588
589