



CRISTIANE MARQUES FURTADO

Avaliação dos efeitos do clotrimazol sobre a
viabilidade, o potencial metastático e a atividade de
enzimas glicolíticas em linhagens de células tumorais
de mama humana

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
2010

CRISTIANE MARQUES FURTADO

Avaliação dos efeitos do clotrimazol sobre a viabilidade, o potencial metastático e a atividade de enzimas glicolíticas em linhagens de células tumorais de mama humana

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Patrícia Zancan

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

2010



Este trabalho foi realizado no Laboratório de Oncobiologia Molecular – LabOMol, do Departamento de Fármacos, Faculdade de Farmácia, CCS/ UFRJ, sob a orientação da Professora Patricia Zancan. O projeto obteve apoio financeiro concedido pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

Cristiane Marques Furtado

“Avaliação dos efeitos do clotrimazol sobre a viabilidade, o potencial metastático e a atividade de enzimas glicolíticas em linhagens de células tumorais de mama humana”

Dissertação submetida ao corpo docente da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisitos parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Membros da Banca Examinadora:

Professora Patricia Zancan
Professora Adjunta do Departamento de Fármacos, FF, UFRJ
Orientadora

Professor Alexandre dos Santos Pyrrho
Professor Associado do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, FF, UFRJ

Professora. Eleonora Kurtenbach
Professora Associada do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ

Professor Marcelo Alex de Carvalho
Professor Associado do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro

Professor Mauro Sola Penna
Professor Associado do Departamento de Fármacos, FF, UFRJ

Professor Antônio Ferreira Pereira
Professor Associado do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, UFRJ

Rio de Janeiro, RJ, Brasil
Agosto, 2010

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por minha vida e por todas as pessoas que fazem parte dela.

Agradeço imensamente aos meus pais, Antônio e Maria, por me darem o meu maior bem ``a educação``. Por me amarem, me orientarem e me ensinarem a viver com dignidade. Mãe obrigada por confiar e acreditar que estava fazendo a escolha certa; mesmo sem ter entendido direito o que estava acontecendo (ela vai largar o emprego!!). Pai, tenho certeza que estaria muitíssimo orgulhoso. Sem o apoio de vocês tudo seria mais difícil!!!! Agradeço imensamente a vocês, meus queridos pais, por estarem por trás de mais essa vitória. A vocês minha eterna gratidão!!!!!!!!!!!!

Agradeço aos meus irmãos, irmãs, sobrinhos (as), cunhados (as) e agregados, por cada opinião e incentivo antes mesmo de iniciar o mestrado; ha... por cada piadinha também. Por entender que eu não podia ir naquele lugar tão esperado porque estava estudando...mas peraí, quando você vai parar de estudar??? Aff...deixa pra lá, já cansei de explicar. Obrigada pela união de vocês, sempre ao meu lado. Obrigado a toda a família Buscapé por mais essa conquista. Obrigado Fernando por também contribuir pra essa dissertação; seja me incentivando com alguma experiência ou assistindo as minhas repetitivas apresentações, seja me acompanhando na saída do Fundão tarde da noite, ou me esperando com um abraço apertado. Obrigada mais uma vez a cada um. Amo demais todos vocês!!!!!!!!!!!!

Agradeço, essa e mais aquela e aquela outra...a minha Professora e Orientadora Patrícia Zancan. Por tudo, mas tudo mesmo. Pelas conversas em particular (ai que medo!!!), pelas broncas, horas em pé na bancada, elogios, compreensão, paciência, confiança, todo o tempo dedicado, por me acolher e me ensinar com carinho cada detalhe do trabalho (trabalhar com células não é fácil...), pela amizade e por coisas que não dá nem pra agradecer... Obrigada por transmitir seu conhecimento e experiência. Obrigada por me compreender e me incentivar a traçar o melhor caminho. Obrigada por estimular meus sonhos, a seguir com determinação e confiança. Obrigada por fazer parte da minha vida hoje e sempre!!!

Bem é impossível agradecer a Professora Patrícia Zancan, sem antes agradecer ao professor Mauro Sola-Penna. Afinal ele foi responsável por tudo!!! Foi ele quem me apresentou a Professora Patrícia e ao mundo científico. Obrigado Professor, pela oportunidade, por acreditar que poderia dar certo (agora não dá pra voltar atrás). Obrigado por eu ter tido a sorte de lhe conhecer e de me mostrar não somente o excelente profissional que é (ele sabe qualquer assunto!!!), mas também por mostrar que é correto, justo e de um caráter invejável. Obrigado por saber passar da forma mais profissional a sua experiência. Obrigado, por não ser somente um grande Mestre, mas por também ser um grande amigo. Obrigado por ser o meu querido e eterno Professor!!!

Obrigado aos Professores da minha banca de acompanhamento: Professor Alexandre Pyrrho e Mauro Sola-Penna, pelos conselhos, pelas idéias e por estarem sempre com disposição para me ajudar. Obrigado por tudo!!!

Agradeço a cada amizade conquistada!!!. Obrigada as minhas amigas diárias, Mariah e Andréia. Obrigado por compreender os meus dias de mau humor. Obrigado pela ajuda com experimentos, apresentações, protocolos e trabalhos. Pela solidariedade e por dividirem tudo, mas tudo, comigo. Obrigado pelos artigos disponíveis e, claro, por tornarem os Journals mais interessantes (apresenta rapidinho!!!). Pelas rosquinhas com café, pela companhia no almoço, pelos momentos de descontração e risos, mais muitos risos (se as paredes falassem, hehe). Obrigado pelas demonstrações de afeto e companheirismo!!!. Obrigada por tudo.

Obrigado aos amigos do LabECoM: Mônica, Daniel, Raquel, Thiago, Wagner, Isadora, Lílian, Débora, Priscila, Vanessa e Juliana. Obrigado pelas conversas, pelos momentos de descontração, pelas explicações, conselhos e pelo carinho. Obrigada por tornarem os congressos, simpósios e apresentações mais interessantes. Obrigado principalmente pela experiência dos mais especializados e por deixarem eu fazer parte desse excelente grupo.

Obrigada aos amigos que não entendem nada do que faço (ops...alguns até entendem), mas que de alguma forma contribuíram para essa dissertação. Seja ouvindo um desabafo, ou até mesmo um choro (quem não tem problemas!!). Seja me incentivando a continuar com determinação, me mostrando que vale a pena encontrar disposição no final de um dia cansativo de trabalho, pra descontrair!! Obrigado pela honestidade e sinceridade principalmente quando mereci. Obrigado por não me fazer lamentar e sim, consertar o dano feito. Obrigado pelo apoio em todas as horas e principalmente pela firmeza. Obrigado pela amizade de cada um de vocês, que juntos vivemos e nos lembraremos pra sempre!!!

Agradeço a minha banca de defesa. À professora Eleonora Kurtenbach, ao professor Marcelo Alex de Carvalho e ao professor Antônio Ferreira Pereira . Obrigada a todos vocês pela disponibilidade e pelas positivas contribuições ao trabalho que tenho certeza que aconteceram. Obrigada de coração.

“Tenha coragem. Vá em frente.
Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso.

Não importa quais sejam os obstáculos e as dificuldades. Se estamos possuídos de uma inabalável determinação, conseguiremos superá-los independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho.”

Dalai Lama

RESUMO

As células neoplásicas são caracterizadas pela glicólise aeróbica aumentada, a qual se correlaciona com um prognóstico negativo. Embora esta correlação seja bem conhecida, o mecanismo responsável pela elevada taxa glicolítica em cânceres e o papel das enzimas glicolíticas ainda não foram determinados. A glicólise é controlada por reguladores alostéricos, assim como pela ligação reversível das enzimas glicolíticas ao citoesqueleto celular. O clotrimazol (CTZ) é um derivado azólico antifúngico com promissores efeitos anticâncer, os quais podem ser parcialmente atribuídos a sua habilidade em alterar a localização intracelular das enzimas glicolíticas. O presente trabalho objetiva avaliar a atividade das principais enzimas que regulam a glicólise em linhagens celulares de câncer de mama com graus de agressividade variáveis e os efeitos do CTZ sobre a glicólise, viabilidade e potencial metastático destas células. MCF10A, MCF-7 e MDA-MB-231 são linhagens celulares derivadas de mama humana com características não tumorigênica, tumorigênica e metastática, respectivamente. Estas células apresentam um crescente grau de eficiência glicolítica, ou seja, lactato produzido por glicose consumida, correspondendo ao potencial metastático. O CTZ promove importantes alterações nos parâmetros metabólicos celulares, diminuindo o consumo de glicose, a produção de lactato e o conteúdo de ATP intracelular. Embora não haja diferença na atividade da fosfofrutocinase (PFK) e da piruvato cinase (PK), a atividade da hexocinase (HK) é maior em ambas linhagens celulares tumorigênicas quando comparadas com as células MCF10A. Nenhuma diferença é observada na atividade hexocinásica comparando-se as células MCF-7 e MDA-MB-231, sugerindo que a diferença entre as eficiências glicolíticas pode não ser atribuída a esta enzima. Entretanto, encontramos que a expressão da isoforma L da PFK (PFK-L)

correlaciona-se diretamente com a agressividade e a eficiência glicolítica nestas linhagens celulares. O CTZ altera diretamente a atividade destas enzimas glicolíticas após 24 h de tratamento, assim como, inibe a enzima glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) da via das pentoses fosfato. Além disso, o fármaco promove um decréscimo dependente da dose da viabilidade celular e inibe a migração e a invasão celular, efeitos que são mais pronunciados na linhagem MDA-MB-231 do que na linhagem MCF-7. Assim, concluímos que: (1) a eficiência glicolítica, importante para a sobrevivência das células cancerosas, depende primariamente da expressão preferencial da isoforma PFK-L do que das isoformas M e P; (2) nossos resultados suportam as evidências para os efeitos antineoplásicos do CTZ que podem inicia-se pela inibição do fluxo glicolítico, como revelado pela inibição das enzimas glicolíticas. Desta forma, o metabolismo energético pode ser uma alternativa como alvo terapêutico para os tumores glicolíticos.

ABSTRACT

Cancer cells are characterized by increased aerobic glycolysis, which correlates with a negative prognosis. Although this correlation is well known, the mechanism of the elevated rate of glycolysis in cancer and the role of glycolytic enzymes have yet to be determined. Glycolysis is known to be controlled by allosteric regulators, as well as by reversible binding of glycolytic enzymes to the cytoskeleton. Clotrimazole (CTZ) is an anti-fungal azole derivative with promising anti-cancer effect, which is partially attributed to its ability to alter the intracellular localization of glycolytic enzymes. The present work aims to evaluate the activity of the major enzymes that regulate glycolysis in breast cancer cell lines of varying aggressiveness and the effects of CTZ on the glycolysis, viability and metastatic potential of these cells. MCF10A, MCF-7 and MDA-MB-231 are human breast-derived cell lines with non-tumorigenic, tumorigenic and metastatic profiles, respectively. These cell lines present increasing degrees of glycolytic efficiency, i.e., lactate produced per glucose consumed, corresponding to their metastatic potential. CTZ promotes important alterations on the cell metabolic parameters, diminishing glucose consumption, lactate production and intracellular ATP content. Although there are no differences in phosphofructokinase (PFK) or pyruvate kinase (PK) activities, the activity of hexokinase (HK) is higher in both tumorigenic cell lines as compared to MCF10A cells. No difference is observed in HK activity comparing MCF-7 and MDA-mb-231 cells, suggesting that the difference in their glycolytic efficiency could not be attributed to this enzyme. However, we found that expression of the PFK-L isoform strongly correlates with aggressiveness and glycolytic efficiency in these cell lines. CTZ directly alters the activity of these glycolytic enzymes upon 24 h of treatment, as well as, of the pentose phosphate pathway enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH). Moreover, the drug promotes a dose-

dependent decrease on cell viability and inhibits the cellular migration and invasion, which is more pronounced on MDA-MB-231 when compared to MCF-7 cell line. Thus, we conclude that: (1) glycolytic efficiency, which is important for the survival of cancer cells, depends primarily on the preferential expression of PFK-L over the M and P isoforms; (2) our results support evidences for the antineoplastic effects of CTZ that might start by inhibiting glycolytic flux, as revealed by the inhibition of the key glycolytic enzymes. Hence, energy metabolism may be an alternative therapeutic target for glycolytic tumors.

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 - Estimativa dos tipos de câncer mais incidentes na população Brasileira	02
Figura 2 – Os 10 tipos de câncer mais incidentes: estimativas de novos casos e estimativas de óbitos por sexo para 2010	03
Figura 3 - Imagem digitalizada de uma biópsia exemplificando o último estágio do carcinoma ductal “in situ”	07
Figura 4 – Imagem da tomografia por emissão de pósitron (PET-Scan) com FdG de um paciente com linfoma	09
Figura 5 – Reação catalisada pela hexocinase (HK)	16
Figura 6 – Reação catalisada pela fosfofrutocinase- 1 (PFK-1)	17
Figura 7 – Reação catalisada pela piruvato cinase (PK)	19
Figura 8 – Glicólise: da glicose ao piruvato	21
Figura 9 – Reação catalisada pela lactato desidrogenase	22
Figura 10 - Estrutura química do clotrimazol	26
Figura 11 - Efeito do clotrimazol sobre o consumo de glicose nas linhagens de mama MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB-231	46
Figura 12 – Efeito do clotrimazol na produção de lactato nas linhagens de mama MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB-231	47
Figura 13 – Efeito do clotrimazol sobre a atividade mitocondrial das linhagens de mama	49
Figura 14 – Avaliação do conteúdo de ATP celular nas diferentes linhagens de mama na presença do clotrimazol	50

Figura 15 – Atividade hexocinásica das linhagens de mama MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB-231 tratadas com clotrimazol	52
Figura 16 - Efeito do clotrimazol sobre a atividade fosfofrutocinásica nas linhagens de mama humana	53
Figura 17 - Atividade da piruvato cinase nas linhagens MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB-231 após o tratamento com clotrimazol	54
Figura 18 - Efeito do clotrimazol sobre a atividade da G6PDH nas linhagens de mama humana	56
Figura 19 – Atividade da LDH extravasada nas linhagens de mama humana tratada com clotrimazol	57
Figura 20 – Teste de migração celular nas linhagens de mama humana tratadas com clotrimazol	58
Figura 21 – Taxa de migração celular das linhagens de mama humana tratada ou não com clotrimazol	59
Figura 22 – Teste de invasão celular nas linhagens de mama humana tratada ou não com 50 μ M de clotrimazol	60

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP Adenosina 5' difosfato

AMP Adenosina 5' monofosfato

ATP Adenosina 5' trifosfato

cAMP AMP cíclico

BRCA1 Breast cancer susceptibility gene 1 (gene de susceptibilidade ao câncer de mama 1)

BRCA2 Breast cancer susceptibility gene 2 (gene de susceptibilidade ao câncer de mama 2)

Ca²⁺ Ion cálcio

CaM Calmodulina

COX 2 Ciclooxigenase 2

CTZ Clotrimazol

CIS Carcinoma "in situ"

DL50 Dose letal para metade (50%) de um grupo de animais

DMEM Meio de eagle modificado por dulbecco

DMSO Dimetilsulfóxido

DNA Ácido desoxirribonucléico

EGF Epidermal growth factor (fator de crescimento epitelial)

ER Receptor de estrogênio

ERE Elemento do DNA responsivo ao estrogênio

F12 Mistura de nutrientes ham para células

FDG ¹⁸F-flúor-deoxi-2-glicose

FDG-6-Fosfato ¹⁸F-flúor-deoxi-2-glicose-6-fosfato

G6P Glicose -6- fosfato

G6PDH Glicose -6- fosfato desidrogenase

GAPDH Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GLUT Transportador de glicose

HIF Hipoxia-inducible factor (fator induzido por hipóxia)

HK Hexocinase

IC50 Concentração do fármaco que inibe o crescimento de 50% das células

IGF Fator de crescimento semelhante à insulina

INCA Instituto nacional de câncer

KCl Cloreto de potássio

Ki Constante de inibição

Km Constante de Michaelis-Menten

LDH Lactato desidrogenase

MCF-10A Linhagem de mama epitelial não tumorigênica

MCF-7 Linhagem de mama tumoral não metastática

MDA-MB-231 Linhagem de mama tumoral metastática

MgCl Cloreto de magnésio

MRP1 Proteína associada a resistência a múltiplas drogas

MTT Brometo de 3,4,5-dimetilazol-2,5-difeniltetrazolium

NAD Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NAD⁺ Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado

NADH Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido

NADP Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

NADPH Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido

NO Oxido nítrico

PBS Tampão fosfato-salino

PET Tomografia por emissão de pósitron

PFK-1 Fosfofrutocinase-1

PFK-1L Isoforma hepática da PFK

PFK-1M Isoforma muscular da PFK

PFK-1P Isoforma plaquetária da PFK

Pi Fosfato inorgânico

PK Piruvato cinase

PEP Fosfoenolpiruvato

PPP Via das pentoses fosfato

ROS Espécies reativas de oxigênio

SERM Região de controle de estrogênio

T0,5 Tempos para atingir 50% de morte celular

TRIS Tris (hidroximetil)aminometano

VEGF Vascular endothelial growth factor (fator de crescimento endotelial vascular)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	01
1.1 Câncer	01
1.1.1 Diagnóstico	06
1.1.2 Características das neoplasias e o metabolismo energético	08
1.2 Glicólise	14
1.2.1 Glicólise: da glicose ao piruvato	15
1.3 Terapias antitumorais	23
1.3.1 Principais vias para terapias antineoplásicas	23
1.3.2 Clotrimazol como agente antineoplásico	25
1.3.2.1 Clotrimazol e câncer	27
2 OBJETIVOS	30
3 MATERIAI E MÉTODOS	31
3.1 Material	31
3.2 Cultura de células	31
3.3 Teste de atividade mitocondrial	31
3.4 Avaliação do consumo de glicose e produção de lactato	32
3.5 Dosagem da atividade PFK-1, HK, PK e G6PDH	32
3.6 Dosagem do conteúdo de ATP intracelular	33

3.7 Dosagem de proteína	34
3.8 Avaliação da viabilidade celular	34
3.9 Teste de invasão celular (<i>Transwell assay</i>)	34
4.0 Ensaio de migração celular	35
4.1 Análise estatística dos resultados	35
4 RESULTADOS	37
4.1 Caracterização do perfil metabólico, da atividade e expressão de enzimas glicolíticas em linhagens de mama humana	37
4.2 Efeito do clotrimazol sobre o metabolismo glicolítico, viabilidade celular e potencial metastático de linhagens celulares de mama humana	45
4.2.1 Efeitos do clotrimazol sobre o consumo de glicose e a produção de lactato em linhagens de mama humana	45
4.2.2 Efeitos do clotrimazol sobre o metabolismo mitocondrial e sobre o conteúdo de ATP celular	48
4.2.3 Efeitos do clotrimazol sobre a atividade das principais enzimas glicolíticas	51
4.2.4 Determinação da atividade da via das pentoses fosfato	55
4.2.5 Avaliação do efeito do clotrimazol sobre a viabilidade celular	55
4.2.6 Avaliação do efeito do clotrimazol na migração e invasão celular	57
5 DISCUSSÃO	61
6 CONCLUSÕES	67

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

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, não apresentando risco de levar à morte, ou malignos. Câncer é o termo utilizado para todos os tumores malignos e compreende um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem outros tecidos e órgãos, adjacentes ou não. Geralmente, as células neoplásicas malignas proliferam progressivamente e tendem a ser muito agressivas e incontroláveis (EL-BACHA e SOLA-PENNA, 2003b). Por outro lado, um tumor benigno possui uma massa de células coesas que se multiplicam vagarosamente e se assemelham ao seu tecido original (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009).

O câncer configura-se como um grande problema de saúde pública e o contínuo crescimento populacional, bem como seu envelhecimento, afetará de forma significativa o impacto desta patologia no mundo. Esse impacto recairá principalmente sobre os países de médio e baixo desenvolvimento. Desde 2003, as neoplasias malignas constituem-se como a segunda causa de morte na população, representando quase 17% dos óbitos por causa conhecida notificada em 2007 no Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM – Ministério da Saúde, Brasil). Estimou-se que em 2008 ocorreriam 12 milhões de casos novos de câncer e 7 milhões de óbitos. Para a América do Sul, Central e Caribe, estimou-se, em 2008, cerca de um milhão de novos casos de câncer e 589 mil óbitos (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, INCA, 2010).

O Brasil classifica-se entre os países com maior taxa de incidência de câncer em todo o mundo (levando-se em consideração os possíveis diagnósticos incorretos para essa doença). Dados estimados para o corrente ano e válidos também para 2011 mostram que ocorrerão aproximadamente 50 mil novos casos de câncer anuais e esses valores tendem a aumentar rapidamente acompanhando a taxa de incidência mundial. Ainda, segundo o INCA (2010), estima-se que o câncer de pele do tipo não melanoma

será o mais incidente na população brasileira (114 mil casos novos), seguido pelos tumores de próstata (52 mil), mama feminina (49 mil), pulmão (28 mil), cólon e reto (28 mil), estômago (21 mil) e colo do útero (18 mil), como evidenciado na **Figura 1**.

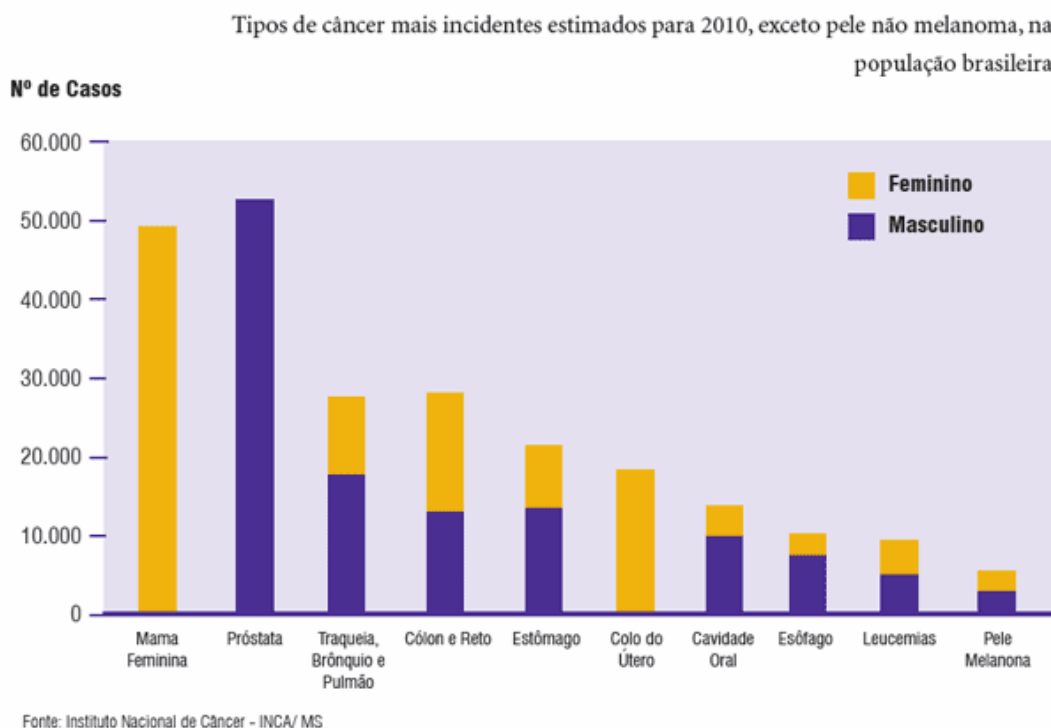


Figura 1- Estimativa dos tipos de câncer mais incidentes na população brasileira.

Figura obtida no site <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/>.

Dentre os tipos de câncer, destaca-se o câncer de mama. Este é o segundo tipo de câncer mais freqüente no mundo e o mais comum entre as mulheres, com cerca de 28% de novos casos anuais, com um risco estimado de 49 casos a cada 100 mil mulheres e com uma estimativa de óbitos em torno de 15% segundo dados da *American Cancer Society* (2010) (**Figura 2**). Somente na região Sudeste do Brasil, o câncer de mama possui um risco estimado de 65 novos casos por 100 mil habitantes. Este tumor é provavelmente o mais temido pelas mulheres devido à sua alta freqüência e, principalmente por seus efeitos psicológicos, os quais afetam a percepção da sexualidade e da própria imagem pessoal da paciente. Ele é

relativamente raro antes dos 35 anos de idade, mas acima desta faixa etária sua incidência cresce rápida e progressivamente (INCA, 2010).

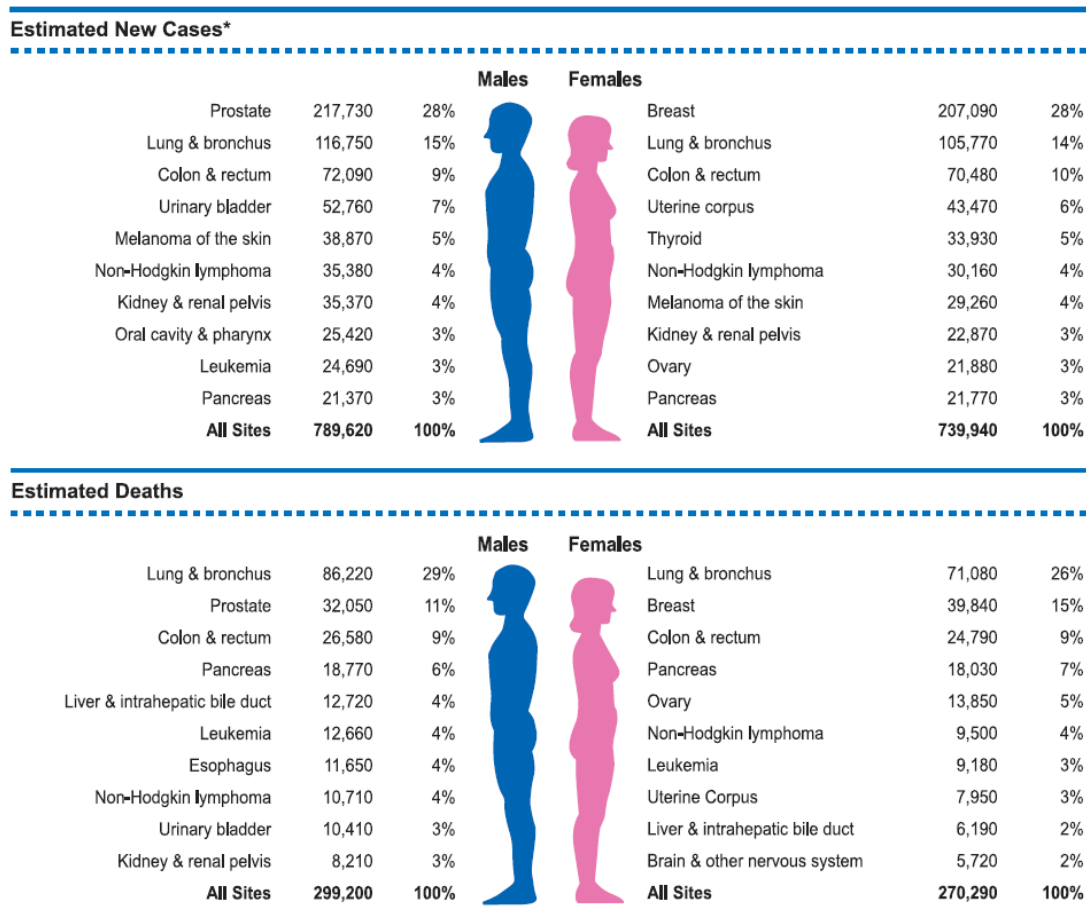


Figura 2- Os 10 tipos de câncer mais incidentes: estimativas de novos casos e estimativas de óbitos por sexo para o ano de 2010. Figura obtida em *Cancer Statistics 2010, American Cancer Society, Inc.*

O câncer de mama apresenta os distúrbios hormonais como um dos principais fatores de risco, entretanto, segundo o INCA, os fatores de risco relacionados à vida reprodutiva da mulher (menarca precoce, nuliparidade, primeira gestação a termo acima dos 30 anos, anticoncepcionais orais, menopausa tardia e terapia de reposição hormonal) também já estão bem estabelecidos. Além desses, os fatores genéticos também estão associados ao maior riscos de desenvolvimento de câncer de mama. Mulheres que apresentam mutação nos genes BRCA1 e BRCA2 têm 85% de chance

de desenvolver câncer de mama antes dos 70 anos de idade (INCA, 2010). De fato, as taxas de incidência de câncer de mama aumentam rapidamente até os 50 anos e, posteriormente, o mesmo se dá de forma mais lenta. Essa mudança no comportamento desta taxa é conhecida na literatura como "*Clemmesen's hook*" e tem sido atribuída ao início da menopausa. Alguns estudos apontam para dois tipos de câncer de mama relacionados com a idade: o primeiro tipo, que acomete 90% dos tumores, ocorre na idade da pré-menopausa e é caracterizado por ser mais agressivo e negativo para o estrogênio receptor (ER), isto é, que não depende do ER para o crescimento das células. O segundo, ocorre na idade da pós-menopausa e apresenta-se ER-positivo, podendo ser efetivamente tratado por inibição da função do ER, uma vez que ER é importante para o crescimento dessas células. As variações morfológicas dos tumores também estão relacionadas ao ER, como por exemplo, os carcinomas medulares são ER-negativos, enquanto que os carcinomas tubulares e lobulares apresentam um fenótipo ER-positivo. Com relação aos carcinomas medulares, pode-se dizer ainda que eles estão associados às mutações no gene *BRCA1* e são mais frequentes em populações de baixo risco, como as japonesas. Por outro lado, os carcinomas tubulares e lobulares têm associação com as mutações do gene *BRCA2* e são mais comuns em populações de alto risco, como a dos Estados Unidos (INCA, 2010; CHAN *et al.*, 2008).

O câncer é uma doença originada a partir de três fatores preponderantes: os fatores ambientais, fatores hereditários e a pré-disposição genética (quando há um risco mais elevado para o familiar de um doente desenvolver a doença, do que para a população em geral) (NIGRO *et al.*, 1989). Contudo, alguns estágios devem ser percorridos até que o câncer se instale, destacando-se a indução, promoção e progressão. O estágio da "indução" é caracterizado pela instabilidade genômica que leva a lesão no DNA, podendo induzir a mutações. Essa alteração genômica ocorre por vários fatores, dentre eles: rearranjos cromossômicos, radiação ultravioleta, agentes químicos e vírus oncogênicos. Todos estes fatores poderão gerar uma mudança irreversível do genótipo da célula normal progenitora, produzindo uma célula "iniciada". O segundo estágio consiste na ativação de oncogenes ou inibição de genes supressores do tumor e é denominado "promoção". Um exemplo é o do gene *p53* que na sua forma não mutada é um gene supressor de tumor e as células neste

estágio são denominadas “transformadas” (NIGRO *et al.*, 1989). Embora o surgimento do câncer ocorre quando a célula perde o controle no seu processo de multiplicação passando a fazê-la de forma desordenada e acelerada, o motivo pelo qual a célula perde o equilíbrio no seu desenvolvimento ainda não está totalmente esclarecido (WEINBERG, 2008). O último estágio da carcinogênese é chamado de “progressão”, onde há mudanças do microambiente celular com o objetivo de manter o processo maligno e a capacidade de gerar metástases. Durante esta fase, são geradas condições para o crescimento das células imortalizadas, tais como produção de fatores de crescimento e citocinas (PETÉN *et al.*, 1990).

A taxa de crescimento das células tumorais é determinada pelo tamanho, volume, conteúdo mitótico e diferenciação. A classificação da neoplasia é baseada em suas características histológicas e no estado de progressão clínica (SANCHEZ *et al.*, 2007). No desenvolvimento do câncer, há essencialmente dois tipos de tecidos distintos: epitelial e estromal. O tecido epitelial é formado por células justapostas, ou seja, intimamente unidas entre si, com crescimento em monocamadas e que apresenta como principais funções: proteção, revestimento, absorção, secreção e proteção da superfície do corpo. O câncer que acomete esse tecido tem prevalência em adultos, dando origem ao câncer de mama, pulmão, pancreático, próstata e melanoma. O tecido estromal é o tecido de sustentação de um órgão, que serve para sustentar as células funcionais (parênquimas) desse órgão. É constituído de tecido conjuntivo e vaso sanguíneo, é elástico, altamente móvel e podendo crescer, em resposta a gradientes morfogenéticos, em várias direções (GILLIES *et al.*, 2008). O câncer que acomete esse tecido é prevalente em crianças, originando o sarcoma, glioma e leucemia. Componentes epitelial e estromal, são estabelecidos durante a embriogênese para 3 camadas de células germinativas primordiais: ectoderme, endoderme e mesoderme que dão origem à pele e sistema nervoso, epitélio e tecido mesenquimal, respectivamente. Os componentes epiteliais são geralmente derivados do endoderma e ectoderma e os estromais são derivados do mesoderma; sendo este determinante nas propriedades moleculares e celulares dos tumores (JESSANI *et al.*, 2004; GILLIES *et al.*, 2008).

A carcinogênese procede por distintos estágios, iniciando com mudanças genéticas que resultam na hiperplasia, progredindo para a displasia dentro do lúmen do ducto,

conhecido como carcinoma *in situ* (Cis), que é delimitado do estroma por uma membrana basal fina. O último estágio do carcinoma *in situ* pode ser caracterizado como angiogênico (GATENBY e GILLIES 2004). Fatores angiogênicos, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), são produzidos pelo tumor podendo promover o aumento da vascularização dentro do estroma e, conseqüentemente, estimular a angiogênese pela formação de novos vasos sanguíneos (GATENBY e GILLIES 2004, HSU e SABATINI, 2008). Esses novos vasos permanecem separados das células tumorais pela membrana basal, ficando confinados no compartimento estromal (**Figura 3**).

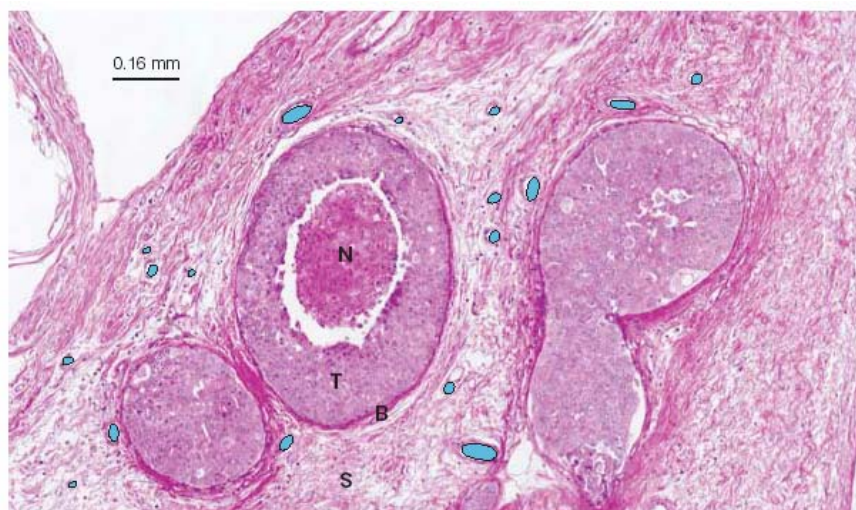


Figura 3 – Imagem digitalizada de uma biópsia exemplificando o último estágio do carcinoma ductal “in situ”. Os vasos sanguíneos (azuis) são vistos no estroma (S) que cerca o tumor (T). O tumor apresenta-se envolto pela membrana basal (B) e é avascular. O centro do tumor apresenta-se necrótico (N). Figura obtida em Gatenby e Gillies (2004).

Assim, a carcinogênese e o desenvolvimento do fenótipo maligno ocorrem em um ambiente avascular. Como resultado, substratos como oxigênio e glicose difundem-se através da membrana basal atingindo a camada de células tumorais onde serão metabolizados. Em consequência, as concentrações de oxigênio diminuem com o distanciamento dos capilares,

desenvolvendo regiões de hipóxia próximas ao limite de difusão do oxigênio. Durante a formação do tumor, a adaptação a hipóxia pode ser mediada pelo fator induzido por hipóxia (HIF), que induz a angiogênese e outras mudanças metabólicas (OSTHUS *et al.*, 2000). Quando as células migratórias do tumor invadem o tecido estromal e se deslocam para locais distantes, se alojando em pré-capilares e capilares, constitui-se a metástase. O carcinoma ducto invasivo acomete 80% dos tumores, seguido pelo lobular, tubular, medular e outros tipos especiais (ISIDORO *et al.*, 2005).

1.1.1 Diagnóstico

Embora o INCA e o Ministério da Saúde incentivem campanhas para a detecção do câncer de mama, a prevenção primária dessa neoplasia ainda não é totalmente possível devido à variação dos fatores de risco e às características genéticas que estão envolvidas na sua etiologia. Novas estratégias de rastreamento factíveis para países com dificuldades orçamentárias têm sido estudadas, uma vez que, até o momento, recomenda-se somente a mamografia para mulheres com idade entre 50 e 69 anos como método efetivo para detecção precoce (INCA, 2010). A mamografia é um exame de diagnóstico por imagem, com finalidade de estudar o tecido mamário, podendo detectar um nódulo mesmo que este não seja palpável. Para isso utiliza-se um equipamento que contém uma fonte com baixas doses de raio X para obter a imagem radiográfica. No Brasil, o Ministério da Saúde recomenda como principais estratégias de rastreamento populacional um exame mamográfico pelo menos a cada dois anos para mulheres de 50 a 69 anos e o exame clínico anual das mamas para mulheres de 40 a 49 anos. Para mulheres de grupos populacionais considerados de risco elevado para câncer de mama, ou seja, com história familiar de câncer de mama em parentes de primeiro grau, recomenda-se o exame clínico da mama e a mamografia, anualmente, a partir de 35 anos (INCA, 2010).

Uma outra técnica para o diagnóstico do câncer, que considera algumas propriedades metabólicas dos tumores visando à aplicação clínica, é a técnica de imagem pela tomografia por emissão de pósitron (PET-Scan) que utiliza um análogo da glicose, a ^{18}F -flúor-deoxi-2-glicose (FdG), para identificar a localização do tumor e das metástases (HSU e SABATINE, 2008). Nesta técnica, o consumo de glicose pelas

células tumorais é mapeado após a administração da FdG, a qual é fosforilada em FdG 6-fosfato pela hexocinase, a primeira enzima da via glicolítica. Como o metabolismo desse composto não ocorre e como as células são impermeáveis a FdG 6-fosfato, o consumo de glicose pelos tecidos é refletido no acúmulo de FdG 6-fosfato (ZIEGLER *et al.*, 2001). A imagem do PET-Scan de milhares de pacientes oncológicos tem confirmado que muitos dos cânceres humanos primários e metastáticos apresentam significativo aumento da captação de glicose (**Figura 4**).



Figura 4 - Imagem da tomografia por emissão de pósitron (PET-Scan) com FdG de um paciente com linfoma. Os nódulos do mediastino (seta púrpura) e os nódulos supraclaviculares (setas verdes) mostram a alta captação de ¹⁸F-flúor-deoxi-2-glicose (FdG), evidenciando que os tumores destes nódulos apresentam alta captação de FdG. A bexiga (seta amarela) também apresenta alta atividade devido à excreção do radionucleotídeo. Figura obtida em Gatenby e Gillies (2004).

Em muitos casos, a especificidade e sensibilidade do FdG-PET-Scan em identificar as lesões primárias e metastáticas é próxima de 90% (GATENBY e GILLIES, 2004). De fato, Meadows e colaboradores (2008) observaram, através de PET-Scan, que aproximadamente 90% dos tumores têm uma taxa glicolítica bem maior do que as células normais e que, conforme aumenta a captação de glicose, aumenta a agressividade do tumor (MEADOWS *et al.*, 2008). Assim, esta técnica é especialmente precisa para a detecção de metástases nodal e distantes (ROBEY *et al.*, 2008). Embora o PET-Scan não seja um método capaz de diferenciar um tumor primário benigno de um maligno, por ser uma técnica altamente variável em cânceres primários, ainda assim, apresenta uma sensibilidade e especificidade muito elevada para metástases (exceto para o câncer de próstata) (GILLIES *et al.*, 2008; ZIEGLER *et al.*, 2001). O carcinoma mamário apesar de ser considerado um câncer relativamente de bom prognóstico, se diagnosticado e tratado oportunamente, ainda apresenta taxas de mortalidade elevadas no Brasil muito provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estádios avançados e assim, de difícil tratamento (INCA, 2010).

1.1.2 Características das neoplasias e o metabolismo energético

A carcinogênese é uma progressão dependente do tempo onde cada vez mais fenótipos prevalecem para emergenciar um câncer invasivo, descrito como “evolução somática”, necessitando de uma sequência de mudanças genéticas hereditárias. O modelo clássico da carcinogênese, o diagrama de Fearon-Vogelstein, consiste no acúmulo de alterações em oncogenes, em seus precursores os proto-oncogenes e genes supressores de tumor o que aumenta sinais promotores do crescimento e diminui os inibidores de crescimento (GATENBY *et al.*, 2007). Adicionalmente, o fenótipo glicolítico está exacerbado em tumores devido a estas alterações. De acordo com Robey e colaboradores (2008), tanto a glicólise aeróbica quanto a expressão e translocação de transportadores de glicose podem ser estimuladas por um grande número de fatores oncogênicos como HIF-1 α , c-Myc e Akt (ROBEY *et al.*, 2008). Algumas dessas alterações promovem mudanças características em tumores, como um aumento do consumo de glicose durante a aerobiose. Dessa forma, alterações

genéticas provocadas pelo grande número de fatores oncogênicos ativados têm um papel importante no aumento da captação de glicose no tumor e, conseqüentemente, na metástase. Um regulador chave da resposta glicolítica em tumores é o fator induzido por hipóxia (HIF-1). HIF-1 é um fator transcricional que funciona como um grande regulador da homeostase do oxigênio. É uma proteína com alvo no DNA que medeia uma resposta adaptativa à privação de oxigênio, sendo assim regulado pela concentração de O₂ (SEMENZA, 2002). Em células cancerosas tanto a hipóxia intratumoral quanto alterações genéticas aumentam a atividade de HIF-1 levando a uma resposta celular pela indução de genes para sua sobrevivência, como proteínas que têm papel chave no desenvolvimento crítico e em processos fisiológicos, incluindo transportadores de glicose (do tipo GLUT), VEGF, enzimas envolvidas com o metabolismo de glicose, fatores hematopoiéticos (transferrina e eritropoietina), transportadores de íons, além de proteínas envolvidas com a proliferação e a sobrevivência celular (DE BERARDINI *et al.*, 2008; SEMENZA, 2002). A atividade de HIF-1 requer a subunidade HIF-1 α , a qual é superexpressada sob o controle de sinais de fatores de crescimento (DE BERARDINI *et al.*, 2008). Os níveis de HIF-1 α podem, de fato, ser estabilizados por muito fatores como pela atividade da ciclooxigenase-2 (COX-2), fator de crescimento semelhantes a insulina (IGF), fator de crescimento epidermal (EGF), óxido nítrico (NO), atividade de Akt, ativação de Src e do oncogene H-Ras, dentre outros (GATENBY e GILLIES, 2004; GILLIES *et al.*, 2008, SHIMADA *et al.*, 2008; DE BERARDINI *et al.*, 2008). A ativação de HIF-1 α não somente estimula a glicólise, induzindo a transcrição de genes glicolíticos e de numerosas enzimas glicolíticas, mas também atenua a atividade mitocondrial, destacando-o como um regulador do metabolismo celular em cânceres (YOUNG e ANDERSON, 2008; SHIMADA *et al.*, 2008).

Uma outra proteína que está presente nas células tumorais regulando seu metabolismo, é a Akt. No câncer de mama, a Akt está alterada favorecendo a instabilidade celular. A via de sinalização da Akt é ativada no último estágio do carcinoma *in situ*. A Akt fosforilada estimula o consumo de glicose em células tumorais sem afetar a taxa da fosforilação oxidativa. Adicionalmente, o estímulo ao consumo de glicose se deve, neste caso, pelo aumento da atividade da enzima

glicolítica que está associada à mitocôndria, a hexocinase, responsável pela fosforilação da glicose em glicose 6-fosfato (YOUNG e ANDERSON, 2008).

Nas células tumorais também são encontradas as proteínas Myc, que são ativadas em várias vias de sinalização importantes no controle do crescimento celular e tumorigênese (OSTHUS *et al.*, 2000). Myc é encontrada no núcleo, no qual funciona como um fator de transcrição e promotor de crescimento. Quando expressada de forma descontrolada opera como uma oncoproteína. Quando há uma desregulação na expressão de Myc a estrutura da sua oncoproteína codificada é alterada. A expressão do gene *Myc* está desregulada em 15 a 30% dos casos de câncer humano, levando a um aumento nos níveis da proteína *c-myc* (WEINBERG, 2008). Entre muitos alvos para Myc estão os genes da glicólise (GILLIES e GATENBY, 2008). A superexpressão de *c-myc* leva ao aumento das taxas da produção de lactato, mesmo sob condições aeróbicas, por superexpressar a enzima lactato desidrogenase A (LDH-A), o qual é importante no fenótipo transformado de células que superexpressão *c-myc* e está envolvida com a sensibilidade celular a apoptose (OSTHUS *et al.*, 2000).

Outra proteína importante no câncer é a *p53* (o qual algumas vezes é denominado *Trp53* em camundongos ou *TP53* em humanos) que pode atuar como um gene supressor de tumor prevenindo o aparecimento de células anormais, especificamente aquelas células que são capazes de gerar tumores, ou como oncogene, similar ao oncogene *Myc*. Esses genes supressores de tumor parecem atuar como reguladores negativos de proliferação em uma variedade de tipos celulares; sua deleção do circuito regulatório das células, leva conseqüentemente, a proliferação inapropriada de algumas delas, e assim ao rompimento do desenvolvimento normal (WEINBERG, 2008). O gene *p53* apresenta-se mutado em 80% dos cânceres humanos, além de ser o gene mais frequentemente mutado. A *p53* tem como função fisiológica a regulação do ciclo celular podendo promover a interrupção do mesmo ou a apoptose em resposta ao dano no DNA (YOUNG e ANDERSON, 2008). Nas células de cânceres, a *p53* induz a apoptose pela via intrínseca associada à mitocôndria (CHEN *et al.*, 2009). Além disso, a *p53* tem um papel chave na regulação do consumo de glicose por induzir a ativação sistemática de muitas vias devido, por exemplo, ao aumento de transportadores de glicose, estimulando a glicólise, ou por afetar a biogênese mitocondrial (YOSEPH *et al.*, 2004). Os efeitos da *p53* na glicólise podem

ser afetados pela proteína TIGAR (regulador da apoptose e da glicólise estimulado pela p53), a qual inibe o metabolismo de glicose por diminuir os níveis de frutose 2,6-bifosfato na célula (BENSAAD *et al.*, 2006). Entretanto, este efeito modulador negativo da glicólise somente acontece quando a p53 não está mutada, ou seja, em aproximadamente 20% dos casos neoplásicos, como já descrito anteriormente.

Além dos oncogenes, uma outra característica de extrema relevância nos cânceres de mama, que são mais comuns em mulheres, é que estes podem ser triplamente negativo para o estrogênio receptor, deixando de expressar esses receptores ou o receptor ficando negativo. Esses receptores se ligam ao estrogênio, um hormônio ovariano, que promove a proliferação e o crescimento celular (MONROE *et al.*, 2005). O estrogênio afeta o desenvolvimento e diferenciação da glândula mamária mediada por seus receptores (LINDBERG, 2010). Já foi demonstrado que cerca de 66% dos cânceres mamários expressam o estrogênio receptor (ER). Os ERs medeiam as ações do estrogênio, aumentando a transcrição de genes ou diretamente através da ligação aos elementos do DNA responsivos ao estrogênio (EREs) nas regiões de controle do estrogênio (ou SERM) dos genes alvos ou através de precursores alternativos envolvendo interações reguladoras com a transcrição de outros fatores (MONROE *et al.*, 2005; LINDBERG, 2010). Há dois tipos de ER: o ER α e o ER β . A proliferação e a progressão do câncer de mama são conduzidas por ER α e a maioria das células, pelo menos inicialmente, expressam este receptor. Ao contrário, o ER β não está relacionado com a tumorigênese e sua ausência pode afetar o desenvolvimento da glândula mamária. A expressão de ER β está associada com tumores menos invasivos e proliferativos (LINDBERG *et al.*, 2010). As linhagens de câncer de mama podem ser agrupadas em ER α -positivas e ER α -negativas. O grupo ER α -positivo (que engloba a linhagem celular MCF-7) pode ser efetivamente tratado pela inibição da função do ER α , como pelo tamoxifeno. Já o grupo ER α -negativo (que engloba a linhagem MDA-MB-231) é altamente invasivo, sendo resistente ao tratamento baseado em antagonistas de ER α (CHAN *et al.*, 2008, LINDBERG *et al.*, 2010).

Somando-se os fatores já citados e devido ao seu estágio avançado de desenvolvimento e suas propriedades metastáticas, o carcinoma mamário é considerado um tumor humano de crescimento acelerado (PEDERSEN, 1978; ZU e

GUPPY, 2004). A grande maioria das linhagens tumorais que apresentam um crescimento rápido possui um metabolismo energético notavelmente modificado se comparadas com os tecidos de origem, como observado em tumores das glândulas mamárias (MCF-7, MDA-MB-435, MDA-MB-231) (MAZUREK *et al.*, 1997).

Uma curiosa, mas comum, propriedade dos cânceres invasivos é o metabolismo alterado de glicose. A glicólise primeiro requer a conversão de glicose em piruvato e então no produto residual ácido láctico. Na maioria das células de mamíferos, a glicólise é inibida pela presença de oxigênio, o qual permite que a mitocôndria oxide piruvato em CO₂ e H₂O. Esta inibição é chamada de ‘efeito Pasteur’ onde o fluxo de glicose é reduzido pela presença de oxigênio (RACHER, 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 foi provada ser incorreta, as observações experimentais da glicólise aumentada em tumores mesmo na presença de oxigênio têm sido repetidamente verificadas (SEMENZA, 2001, EL-BACHA *et al.*, 2003). De fato, o fluxo glicolítico é 2-17 vezes maior em hepatomas de ratos do que em hepatócitos normais (ZU e GUPPY, 2004; MARIN-HERNADEZ *et al.*, 2006).

A glicólise, além de ser a principal via de degradação de carboidratos, produz intermediários biossintéticos para outras vias, alimentando as vias de biossíntese de ácidos graxos, aminoácidos e colesterol, entre outras (EL-BACHA e SOLA-PENNA, 2003b). 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

malígnos (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.

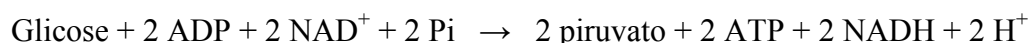
1.2 Glicólise

A oxidação da glicose é conhecida como glicólise ou via de Embden-Meyerhof em mamíferos. Sob condições aeróbias, o produto principal da glicólise, na maioria dos tecidos, é o piruvato. Nas células capazes de metabolizar glicose independentemente do consumo de oxigênio (glicólise anaeróbica), tais como os eritrócitos e algumas fibras musculares, o produto da glicólise é o lactato (NELSON e COX, 2000).

A captação de glicose ocorre através de proteínas transportadoras específicas, sendo denominadas de uma forma geral de GLUT (transportadores de glicose – Glucose transporter). Várias isoformas de GLUT já foram identificadas e clonadas, as quais apresentam diferentes afinidades e capacidades de transportar glicose e são expressas em diferentes tecidos (MANOLESCU *et al.*, 2007).

A via glicolítica consiste de 2 fases separadas. A primeira fase é a fase preparatória, que 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 NADH (NELSON e COX, 2000).

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



O NADH gerado durante a glicólise é utilizado mitocondrialmente na síntese de ATP via fosforilação oxidativa, produzindo 2 ou 3 equivalentes de ATP, dependendo 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 ciclo dos ácidos tricarbóxicos e da cadeia de transporte de elétrons, produz um adicional de 30 moles de ATP; o rendimento total, portanto, é 36 ou 38 moles de ATP obtidos pela oxidação completa de 1 mol de glicose em CO₂ e H₂O (NELSON e COX, 2000).

1.2.1 Glicólise: da glicose ao piruvato.

A fosforilação da glicose, dependente de ATP, para formar glicose 6-fosfato é a primeira reação da glicólise e é catalisada por isoenzimas tecido-específicas conhecidas como hexocinase (HK) (GROSSBARD e SCHIMKE, 1966). A glicocinase é a isoenzima ou forma da hexocinase encontrada em hepatócitos e células β pancreáticas que apresenta um alto Km (Constante Michaelis-Menten) para a glicose. Esta reação é irreversível em condições fisiológicas, sendo um dos pontos de controle da via (**Figura 5**).

A glicose 6-fosfato (G6P) pode ter 3 principais destinos intracelular: pode entrar na glicólise via fosfoglicose isomerase; pode ser convertida em glicose 1-fosfato pela fosfoglicomutase, a primeira etapa da síntese de glicogênio; ou pode ser metabolizada pela glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH), uma enzima da via das pentoses fosfato (PPP), desse modo fornecendo NADPH para as reações de redox e precursores de ácido nucléico (ZHU *et al.*, 2009). González e colaboradores (1964) descreveram que, em células humanas, a HK ocorre em quatro isoformas (I-IV). A isoenzima tipo IV (glicocinase) apresenta uma baixa afinidade pelo substrato G6P, com metade da saturação em aproximadamente 6 mM de G6P. Em contraste, as isoenzimas tipo I (expressa principalmente no cérebro, glândula mamária, rim e retina), tipo II (encontrada principalmente no coração e no músculo esquelético), e tipo III (encontrada virtualmente em todos os tecidos) apresentam alta afinidade pelo substrato, com valores de Km na faixa submilimolar e apresentam susceptibilidade a inibição por *feedback* em níveis fisiológicos de glicose 6-fosfato, com valores de Ki (Constante de Inibição) na faixa de micromolar (SEBASTIAN *et al.*, 1999;

GONZÁLEZ, *et al.*, 1964; MATHUPALA, 2009). A G6P gerada pela hexocinase não é capaz de sair de célula. Isso ocorre porque a membrana plasmática, bem como os GLUTs são impermeáveis a G6P (WILSON, 2003).

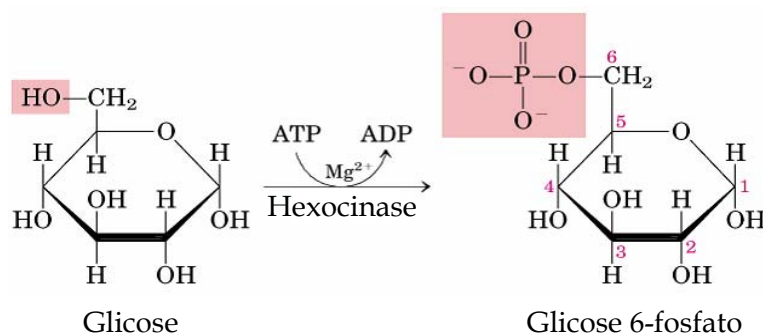


Figura 5 – Reação catalisada pela hexocinase. Adaptado de Nelson e Cox (2000).

A hexocinase do tipo II (HKII) é destacada por estar reversivelmente ligada à mitocôndria, mostrando-se um regulador chave da glicólise. É a principal isoforma de hexocinase expressa em tumores que exibem o ‘efeito Warburg’, assim incluindo a maioria dos cânceres metastáticos (GILLIES *et al.*, 2008). Ligada à membrana externa mitocondrial, a HKII regula não somente o fluxo glicolítico, uma vez que perde a capacidade de ser inibida pelo produto G6P e ganha um acesso direto ao ATP recém sintetizado intramitocondrialmente, mas também é capaz de regular diversos mecanismos, como a apoptose (BUSTAMANTE e PEDERSEN, 1977; MATHUPALA, 2009). A expressão da HKII pode ser afetada por hormônio como a insulina ou por mensageiros como AMP cíclico (cAMP) (GILLIES *et al.*, 2008).

A segunda reação da glicólise é uma isomerização, na qual a glicose-6-fosfato 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, catalisada pela 6-fosfofruto-1-cinase ou fosfofrutocinase-1 (PFK-1), não é facilmente reversível devido a sua grande energia livre positiva ($\Delta G^\circ = + 5,4$ kcal/mol) na direção reversa

(PAETKAU e LARDY, 1967). 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 a ponto da PFK-1 ser considerada a enzima limitante da glicólise (**Figura 6**).

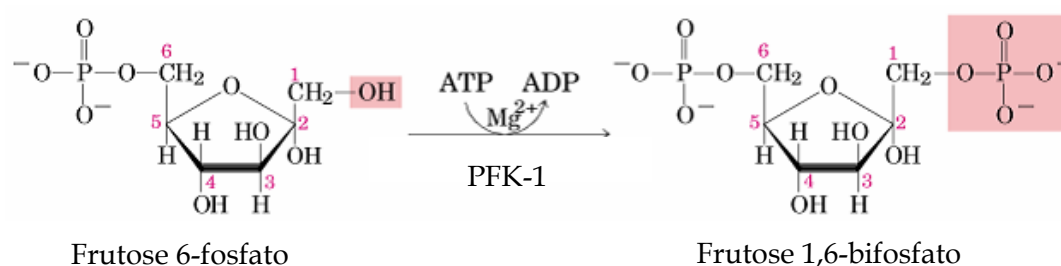


Figura 6 – Reação catalisada pela fosfofrutocinase-1 (PFK-1). Adaptada de Nelson e Cox (2000).

Já foi estabelecida a existência de 3 loci estruturais para a PFK-1: PFK-1-M, PFK-1-L e PFK-1-P codificando distintas subunidades da PFK-1 no músculo, no fígado e plaquetas, respectivamente (VORA e FRANCKE, 1981). Dependendo do tecido, pode haver a expressão de um, dois ou dos três genes que codificam a PFK-1. Os produtos destes genes podem associar-se de forma aleatória formando heteroligômeros ou homoligômeros. No caso particular do músculo esquelético, a isoforma encontrada da enzima é exclusivamente a PFK-1-M (VORA e FRANCKE, 1981).

A PFK-1 é o ponto chave na regulação da glicólise e pode, portanto, ser considerada um importante alvo para o controle da glicólise em tumores, uma vez que esta enzima é ativada em tumores de mama humano através da sua ligação a ultraestruturas celulares, num padrão que segue o potencial metastático do tumor (EL-BACHA *et al.*, 2003). De fato, em tumores extraídos da glândula mamária humana (EL-BACHA *et al.*, 2003), assim como em células infectadas por vírus (EL-BACHA *et al.*, 2004), há um significativo aumento da atividade da PFK-1, sendo esse aumento um possível mecanismo de ativação do fluxo glicolítico. No carcinoma mamário

humano, foi demonstrado também que o aumento da atividade da enzima estava associado a uma alteração na distribuição da enzima na célula, aumentando a fração da PFK-1 associada ao citoesqueleto (EL-BACHA *et al.*, 2003; MEIRA *et al.*, 2005). Adicionalmente, o mesmo padrão de alteração de distribuição pode ser observado em tecido muscular normal estimulado por adrenalina (ALVES e SOLA-PENNA, 2003) ou por insulina (SILVA *et al.*, 2004), ambos hormônios ativadores do fluxo glicolítico nesse tecido. Além disso, em seres humanos, os mecanismos de sinalização celular desencadeados pela insulina, hormônio diretamente relacionado com a velocidade de crescimento celular, influenciam a distribuição intracelular da PFK-1, o que está intimamente relacionado com a viabilidade celular (ZANCAN e SOLA-PENNA, 2005a; 2005b). A comprovação desta hipótese foi estabelecida quando células derivadas de um carcinoma mamário humano, incubadas na presença de clotrimazol, um fármaco que reverte à alteração na distribuição intracelular da PFK-1, apresentaram uma diminuição na sua viabilidade (MEIRA *et al.*, 2005). Neste trabalho foi comprovado que a associação da PFK-1 ao citoesqueleto, descrita anteriormente em tumores (EL-BACHA *et al.*, 2003), é fundamental para a geração de energia nessas células e, conseqüentemente, mecanismos que diminuam esta associação são potenciais alvos no controle dessa patologia.

Dando seqüência a 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.

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 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 grupamento fosfato no ATP. O 3-fosfoglicerato é, primeiramente, convertido em 2-fosfoglicerato pela fosfoglicerato mutase, e a conversão deste em fosfoenolpiruvato (PEP) é catalisada pela enolase.

A reação final da glicólise aeróbica é catalisada pela piruvato cinase (PK), uma enzima altamente regulada. Nesta reação altamente exergônica, o ADP, juntamente com o fosfato de alta energia do PEP, é convertido em ATP. A perda do fosfato pelo PEP 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 (**Figura 7**).

A PK é uma enzima tetramérica que apresenta três isoformas: L, M e K. É descrito que menos da metade dos tecidos normais e benignos apresentam a expressão da isoforma K4 da PK, enquanto que 70-80% dos tecidos malignos apresentam a PK-K4 como sua principal isoforma (BALINSKY et al., 1983). Entre todas as isoformas, a PK-M2 é caracteristicamente expressa em linhagens tumorais (tais como, HeLa e MCF-7), podendo ser estimulada pela hipóxia ou por oncogenes (YOUNG e ANDERSON, 2008). Nas células de câncer, a PK-M2 é limitante para a geração de piruvato (FEARON, 2009), uma vez que é pouco ativa na conversão do PEP em piruvato e, assim, pouco eficiente na produção de ATP (HSU e SABATINI, 2008).

Todas as 10 etapas da via glicolítica encontram-se sumarizadas na **Figura 8**.

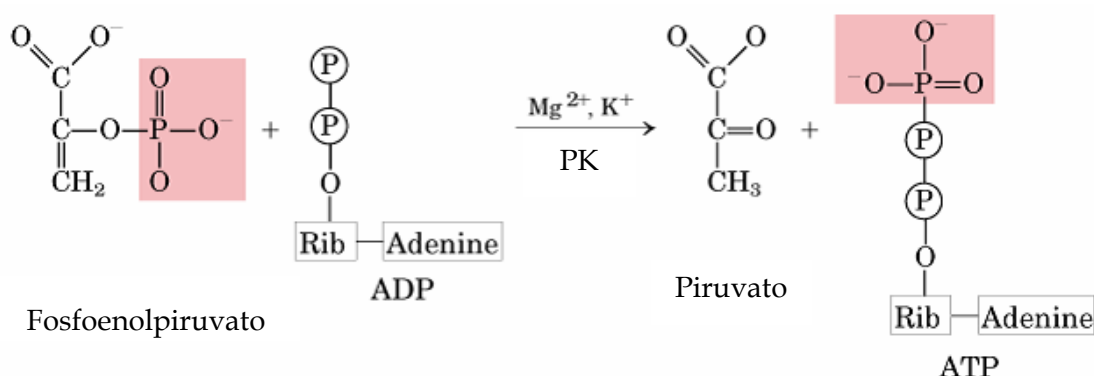


Figura 7 – Reação catalisada pela piruvato cinase (PK). Adaptada de Nelson e Cox (2000).

As reações catalisadas pela hexocinase, pela fosfofrutocinase-1 e pela piruvato cinase, como dito anteriormente, representam passos limitante do fluxo glicolítico pois são irreversíveis em condições fisiológicas e, portanto, apresentam papéis reguladores além dos catalíticos (WEBER *et al.*, 1965). Essas enzimas são consideradas as principais responsáveis pela regulação do metabolismo glicolítico, e as etapas que apresentam a maior complexidade de mecanismos regulatórios em células tumorais (PASONNEAU e LOWRY, 1962; UYEDA, 1979; KEMP e FOE, 1983).

Sob condições aeróbicas, o piruvato, na maioria das células, é metabolizado via ciclo dos ácidos tricarboxílicos. Contudo, sob condições anaeróbicas e, em eritrócitos sob condições aeróbicas, o piruvato é convertido em lactato pela enzima lactato desidrogenase (LDH). 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 (**Figura 9**). 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 aeróbia, 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).

Teoricamente, todas as células do organismo são capazes de sintetizar lactato, mas o músculo esquelético é o principal produtor deste metabólito, principalmente em situações de exercício com intensidade elevada (ROBERGS, 2004). Contudo, um benefício sugerido poderia derivar da secreção de lactato. Assumindo-se que as células tumorais são adaptadas para a acidificação local resultante da secreção de lactato, uma consequência poderia ser um microambiente remodelado que seleciona negativamente células normais e facilita a metástase (GATENBY e GILLIES, 2004). De fato, um constitutivo e persistente aumento na glicólise resulta numa acidificação aguda e crônica do ambiente local. Estudos têm mostrado que o pH extracelular de tumores em humanos e em animais é consistentemente ácido e pode alcançar

valores de pH de aproximadamente 6,0 (RAGHUNAND *et al.*, 2004; GILLIES *et al.*, 2002).

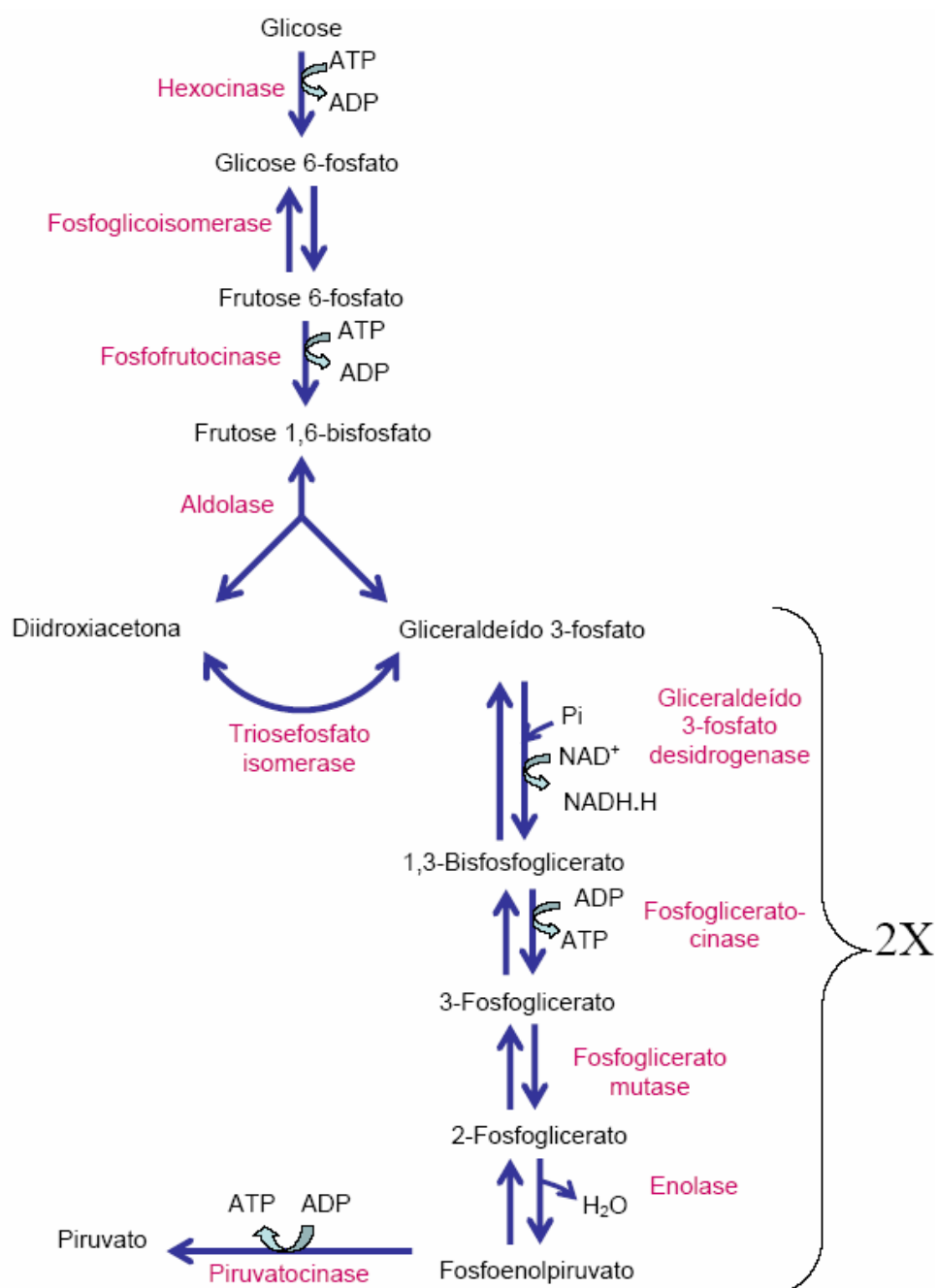


Figura 8 – Glicólise: da glicose ao piruvato. Figura obtida no *site* www.icb.ufmg.br.

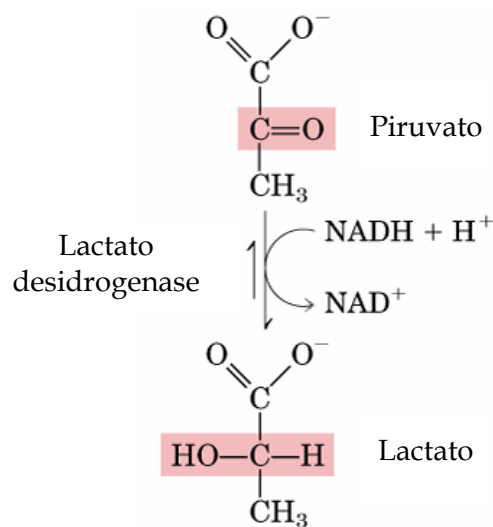


Figura 9 - Reação catalisada pela lactato desidrogenase. Adaptado de Nelson e Cox (2000).

Além disso, células normais, que perderam um mecanismo para se adaptar à acidose celular para se adaptar à acidose extracelular, são incapazes de sobreviver sob tais condições, resultando em necrose ou apoptose através de mecanismos dependentes de p53 e caspase 3, enquanto que populações tumorais continuam a proliferar. A acidose por si pode ser mutagênica e clastogênica (MORITA *et al.*, 1992), possivelmente através da inibição do reparo de DNA (RAGHUNAND *et al.*, 2004). Finalmente, sob algumas, mas não todas as condições, o baixo pH estimula a invasão *in vitro* (MAERTINEZ-ZAGUILIAN *et al.*, 1996) e metástases *in vivo* (SCHALAPPACK *et al.*, 1991). O mecanismo de tal indução não é conhecido, mas pode envolver metaloproteinases e/ou catepsinas, as quais promovem a degradação da matriz extracelular e das membranas basais.

1.3 Terapias antitumorais

Existem três modalidades terapêuticas principais para o câncer: cirurgia, radioterapia e 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 e que sejam determinantes para o controle do crescimento de células tumorais, afetando minimamente outros tipos celulares, torna-se de fundamental importância no planejamento de novas estratégias terapêuticas para o combate e a prevenção do câncer (PENSO e BEITNER, 2002a).

1.3.1 Principais vias para terapias antineoplásicas

Os alvos terapêuticos que agem diretamente no câncer parecem evoluir especificamente na direção das vias relacionadas à sinalização intracelular, morte celular, diferenciação celular e angiogênese. Entretanto, os alvos nestes processos celulares são muito abrangente e frequentemente redundantes, destacando-se assim como uma alternativa, o metabolismo glicolítico (PAN e MARK, 2007). De fato, a inibição da via glicolítica é um bom alvo para a quimioterapia, uma vez que já existem uma série de fármacos no mercado (CHE *et al.*, 2007) além de levarmos em consideração o que já foi abordado anteriormente nesta dissertação e os dados a seguir.

Um grande conjunto de evidências sugere que o principal mecanismo pelo qual a glicólise está substancialmente maior nas células tumorais do que nas células não tumorais é o aumento na transcrição de genes de várias ou todas as enzimas desta via (especialmente, HK, PFK-1, PK, LDH e GAPDH) e de transportadores (especialmente GLUT1), o que é acompanhado pelo aumento na síntese protéica

(MEIENHOFER *et al.*, 1978; DANG *et al.*, 1997; OSTHUS *et al.*, 2000; ATSUMI *et al.*, 2002). Contudo, a atividade destas enzimas raramente tem sido determinada em tumores. A HK e a PFK-1 catalisam as principais etapas de controle do fluxo glicolítico em eritrócitos, hepatócitos e células de músculo esquelético e cardíaco (RAPOPORT *et al.*, 1976; TORRES *et al.*, 1986; TORRES *et al.*, 1989; KASHIWAYA *et al.*, 1994). Mudanças no padrão de expressão de isoformas destas enzimas ocorrem em diversas células tumorais se comparadas com células normais (PEDERSEN, 1978; WEBER, 2001; BUSTAMANTE e PEDERSEN, 1977; VORA *et al.*, 1985; SANCHEZ-MARTINEZ e ARAGON, 1997) e tais modificações são parte dos mecanismos envolvidos no aumento do fluxo glicolítico em células tumorais (RAPOPORT *et al.*, 1976; TORRES *et al.*, 1986; TORRES *et al.*, 1989; KASHIWAYA, *et al.*, 1994).

Assim, componentes individuais na via glicolítica têm sido alvo para o desenvolvimento de terapias antineoplásicas, embora poucos tenham sido empregados na clínica até o momento. Um exemplo é o 3-bromopiruvato, um potente inibidor da hexocinase, que tem reduzido as concentrações de ATP intracelulares gerando citotoxicidade às células tumorais (KO *et al.*, 2004). Uma outra estratégia para o combate dos cânceres envolve a privação de glicose. Essa privação vai favorecer a diminuição da concentração de glicose no meio ambiente tumoral, gerando uma seletiva toxicidade para células em hipóxia e, por consequência, levando a apoptose (XU *et al.*, 2007). Contudo, esta alternativa somente é viável em estudos *in vitro*. Outra estratégia para inibir o metabolismo glicolítico tem como alvo o GLUT-1, uma vez que este é o transportador de glicose superexpresso em cânceres e sua inibição impediria a entrada da glicose na célula (GATENBY e GILLIES, 2007). O análogo da glicose, 2-deoxiglicose também tem sido investigado na terapia anticâncer. Este, em altas doses, é um potente competidor da glicose, reduzindo a captação de glicose e, conseqüentemente, reduzindo o metabolismo glicolítico. A 2-deoxiglicose também reduz a concentração de ATP intracelular levando a morte celular (ZHANG *et al.*, 2006). Quando o 2-deoxiglicose é administrado juntamente com adrimicina e paclitaxel, é capaz de aumentar a eficácia de ambos os fármacos em osteossarcoma e câncer de pulmão (GATENBY e GILLIES, 2007). Assim, novas terapias indicam que estratégias terapêuticas que reduzem a glicólise podem ser bem sucedidas prevenindo

a carcinogênese ou o crescimento do tumor e estabilizando os cânceres invasivos (PELICANO *et al.*, 2006).

1.3.2 Clotrimazol como agente antineoplásico

O clotrimazol (CTZ) é um derivado azólico, primeiramente sintetizado por Buchel e colaboradores (1972), com ação fungistática, terapêuticamente importante, clinicamente seguro e tolerado por humanos (BURGESS e BODEY, 1972; BRUGNARA *et al.*, 1995). Este fármaco é útil no tratamento de infecções por dermatófitos, infecções fúngicas superficiais e várias infecções por *Candida albicans*, incluindo candidíase oral e candidíase vaginal. Seu amplo espectro e potente atividade foram confirmados em vários estudos (PLEMPEL e BARTMANN, 1972; SHADOMY *et al.*, 1982).

O clotrimazol possui peso molecular de 344,85 e é uma base fraca, levemente solúvel em água, benzeno e tolueno, e solúvel em acetona, clorofórmio e DMSO. A DL_{50} oral em ratos é de 923,708 mg/Kg (HOOGERHEIDE *et al.*, 1982). Possui um anel imidazólico ligado a uma molécula de bisfenil-(o-clorofenil)-carbinol com fórmula molecular: $C_{22}H_{17}ClN_2$ (**Figura 10**). Este composto possui diversas denominações comerciais, tais como Canesten® (Bayer), Gino-canesten® (Bayer), Micotrizol® (Eurofarma), Tricosten® (Farmion Lab), entre outras.

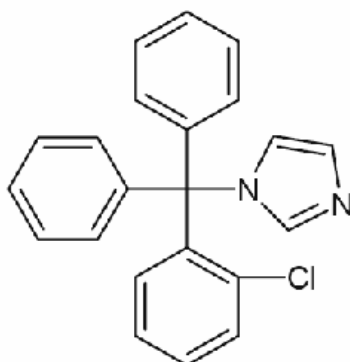


Figura 10 - Estrutura química do clotrimazol (CTZ).

A absorção do clotrimazol é menor que 0,5% após sua aplicação sobre a pele. Em adultos, uma dose oral de 200 mg diários gera concentrações plasmáticas de 0,2 a 0,35 µg/ml. Contudo, por via oral, o clotrimazol pode causar irritação gastrointestinal. Nos pacientes que fazem uso deste fármaco na forma de pastilhas o índice desse efeito colateral é de 5% (GILMANN, 1995).

Os derivados azólicos, como o clotrimazol, são antifúngicos totalmente sintéticos e exercem seus efeitos através da inibição da biossíntese de ergosterol. O ergosterol é o principal esterol componente da membrana celular de fungos e tem um papel importante na fluidez e integridade da membrana, bem como na regulação do crescimento e proliferação celular. Qualquer desajuste na síntese dos esteróis de membrana levará a uma diminuição no crescimento do fungo (GEORGIEV, 2000). Seu modo de ação consiste na inibição da enzima esterol-14- α -demetilase, prejudicando a síntese do ergosterol na membrana citoplasmática, o que leva ao acúmulo de 14- α -metilesteróis. Esses metilesteróis não possuem a mesma forma e propriedades físicas que o ergosterol e levam a formação da membrana com propriedades alteradas que não desempenha as funções básicas necessárias ao desenvolvimento do fungo (BERGOLD e GEORGIADIS, 2004).

Em mamíferos, o clotrimazol é capaz de inibir a proliferação de células vasculares endoteliais, agindo como um inibidor do fator de crescimento vascular endotelial *in vitro* e *in vivo* (TAKAGASHI, 1998; TAKEI, *et al.*, 2003). Além disso, Hegemann e colaboradores (1993) mostraram que o CTZ é capaz de inibir a atividade da calmodulina (CaM) (HEGEMANN *et al.*, 1993). Em casos de queimaduras ou lesões da pele em geral, ocorre uma rápida liberação de cálcio mobilizado por hormônios, como serotonina, bradicinina e histamina (ROCHA, SILVA e ROSENTHAL, 1961; STARR e WEST, 1967; MARCEAU *et al.*, 1983). Esse aumento de Ca²⁺ intracelular é responsável por promover danos nocivos ao metabolismo energético e na estrutura celular, o que levou o grupo da pesquisadora Rivka Beitner a testar antagonistas de CaM, em especial os imidazóis, no tratamento dessas injúrias da pele, os quais se mostram efetivos e atenuaram injúrias causadas por radiação ultravioleta (BEITNER *et al.*, 1989; BEITNER *et al.* 1991).

1.3.2.1 Clotrimazol e câncer

Antagonistas de CaM bloqueiam os efeitos estimulatórios de hormônios, como insulina e fatores de crescimento (LIVNAT *et al.*, 1993; LIVNAT *et al.*, 1994). Esses achados estimularam o estudo desses efeitos sobre o metabolismo energético de células cancerígenas. Como descrito anteriormente, as células cancerígenas são caracterizadas por uma alta taxa de glicólise (sua fonte primária de energia), mesmo em condições aeróbicas (BECKNER *et al.*, 1990; GREINER *et al.*, 1994).

Estudos demonstraram que o clotrimazol é capaz de causar um decréscimo dos níveis de glicose 1,6-bisfosfato e frutose 1,6-bisfosfato em células B16 de melanoma. A queda na concentração da glicose 1,6-bisfosfato, um potente ativador da PFK-1, leva a uma diminuição da atividade fosfofrutocinásica, que é refletida pela queda drástica dos níveis de frutose 1,6-bisfosfato (produto da reação da PFK-1 e também um ativador alostérico desta enzima, especialmente, da isoforma M da PFK-1). Essa redução está fortemente relacionada ao decréscimo do conteúdo de ATP celular e, conseqüentemente, da proliferação celular do câncer devido a uma diminuição da viabilidade nessas células B16 de melanoma (GLASS-MARMOR *et al.*, 1996; GLASS-MARMOR e BEITNER, 1997). Esses resultados sugerem que o clotrimazol exerce algum efeito sobre essas duas moléculas sinalizadoras da glicólise, através da inibição da atividade do complexo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, uma vez que a potência relativa do clotrimazol em reduzir os níveis de glicose 1,6-bisfosfato e frutose 1,6-bisfosfato está próximo ao IC_{50} reportado para a inibição da CaM (GLASS-MAMOR *et al.*, 1996). Também foi visto a capacidade do clotrimazol em desligar a PFK-1 e a aldolase do citoesqueleto de células de Lewis de carcinoma de pulmão e de células CT-26 de adenocarcinoma do cólon. Esse desligamento promoveu uma diminuição do ATP local e, conseqüentemente, promoveu a diminuição da viabilidade celular (PENSO e BEITNER, 2002).

A hexocinase, como relatado anteriormente, é, até então, a única enzima da via glicolítica capaz de se ligar à mitocôndria (BRDICZKA, 1991). A HKII ligada à mitocôndria utiliza preferencialmente o ATP gerado mitocondrialmente, favorecendo a atividade da enzima (VIITANEN *et al.*, 1984). Penso e Beitner (1997) mostraram que o clotrimazol, de maneira dependente da dose, promove o desligamento da HK da

mitocôndria de células B16 de melanoma, diminuindo também a viabilidade dessas células (PENSO e BEITNER, 1997). Em 2004, Meira e colaboradores mostraram que o clotrimazol induz alterações morfológicas e funcionais em uma linhagem celular derivada de câncer de mama, a MCF-7, de maneira dependente do tempo e da dose, exibindo um IC_{50} de 88,6 μ M e $t_{0,5}$ de 89,7 minutos. Essas mudanças ocorreram paralelamente ao desligamento da PFK-1 e da aldolase do citoesqueleto, que por fim, promoveram uma diminuição da viabilidade celular (MEIRA *et al.*, 2005).

Um dos quimioterápicos de primeira escolha para o tratamento de diversos tipos de tumores, o paclitaxel, apresenta um mecanismo de ação semelhante ao observado para o clotrimazol. O paclitaxel promove a apoptose celular através do desligamento das enzimas glicolíticas do citoesqueleto, por promover uma desestabilização das proteínas estruturais (GLASS-MARMOR e BEITNER, 1999; LEHOTSKY *et al.*, 1993). Por outro lado, o clotrimazol, diferente do paclitaxel, é capaz de inibir a proteína associada à resistência a multidroga (MRP1) (KLOKOUSAS *et al.*, 2001). Esse fato pode justificar parte da alta eficiência deste fármaco em diminuir a viabilidade de células tumorais, uma vez que ele inibe o efluxo de drogas dependente de ATP nas células tratadas, sugerindo então uma possível redução da resistência à quimioterapia.

Em 2007, em um artigo publicado pelo nosso grupo de pesquisa, investigou-se os efeitos diretos do clotrimazol sobre a PFK-1 utilizando uma enzima purificada de músculo esquelético de coelho. O clotrimazol, em pH 8,2, que é o pH ótimo da enzima (LUTHER *et al.*, 1986; EL-BACHA *et al.*, 2003; ALVES *et al.*, 2007), foi capaz de inibir a PFK-1 purificada em torno de 50% (ZANCAN *et al.*, 2007a). Observou-se que esse efeito inibitório foi devido à capacidade do fármaco em favorecer a formação de dímeros inativos de PFK-1. Com o objetivo de verificar se esses efeitos inibitórios promovidos pelo clotrimazol seriam devido ao fato deste ser um antagonista de CaM, foi utilizado como parâmetro de comparação o composto 48/80, um clássico antagonista de CaM (GIETZEN *et al.*, 1983). O composto 48/80 não promoveu nenhuma alteração na atividade da enzima, assim como no grau de oligomerização da PFK-1. Esses resultados sugerem que o efeito inibitório promovido pelo clotrimazol sobre a PFK-1 purificada é independente da propriedade anti-calmodulina do mesmo, uma vez que não é mimetizado pelo clássico antagonista de

CaM, o composto 48/80. Mais recentemente, um outro artigo publicado pelo nosso grupo também mostrou que o clotrimazol promove uma inibição dose-dependente da PFK e que essa inibição é devido à dissociação da forma tetramérica da enzima. Além disso, a afinidade da enzima pelos substratos ATP e frutose-6-fosfato foi reduzida pelo fármaco, enquanto que a afinidade do sítio inibitório da enzima pelo ATP foi aumentada pelo clotrimazol (MARCONDES *et al*, 2010).

Todos esses dados aqui descritos sugerem que o clotrimazol possa atuar como um neoadjuvante no tratamento das neoplasias e corroboram para destacar este fármaco como um possível agente antitumoral.

2 OBJETIVOS

Esta dissertação apresenta como objetivo geral:

- Avaliar o efeito do clotrimazol sobre o metabolismo energético de linhagens celulares de mama humana. Para isso utilizaremos as seguintes linhagens: MCF10A (não tumorigênica), MCF-7 (tumoral) e MDA-MB-231 (metastática).

Neste sentido, buscamos atingir o objetivo principal desta através dos seguintes objetivos específicos:

- Avaliar o efeito do clotrimazol sobre os parâmetros metabólicos das linhagens celulares de mama humana;
- Investigar o efeito do clotrimazol sobre o metabolismo mitocondrial e sobre o conteúdo de ATP das mesmas;
- Avaliar a modulação induzida pelo clotrimazol da atividade das principais enzimas glicolíticas: HK, PFK-1 e PK;
- Estudar a ação do fármaco sobre a atividade da via das pentoses fosfato, avaliando a primeira enzima desta via, a G6PDH;
- Avaliar o efeito do clotrimazol sobre a viabilidade celular das linhagens de mama humana;
- Estudar o efeito anti-metastático do clotrimazol, avaliando sua ação sobre a taxa de invasão e migração celular;
- Contribuir para a elucidação do mecanismo de ação do clotrimazol subsidiando sua utilização como agente antineoplásico.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

A linhagem celular de câncer de mama não metastática MCF-7 foi obtida do Banco de Células do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, UFRJ. A linhagem de câncer de mama metastática MDA-MB-231 e a linhagem de mama epitelial não tumorigênica MCF10A foram gentilmente cedidas pela professora Mitzi Brentani (Faculdade de Medicina da USP - SP). DMEM, F12 e soros fetais bovino e equino foram obtidos da Gibco-Invitrogen Corporation (NY, USA). As enzimas para a realização dos ensaios enzimáticos e outros reagentes foram obtidas da Sigma Chemical Co (MA, EUA). O clotrimazol foi obtido da DEG Importação de Produtos Químicos, Lote 1102659003, NF 187.980 (São Paulo, SP, Brasil). Demais reagentes foram obtidos da Merck do Brasil (Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

3.2 Cultura de Células

As células MCF-7, MDA-MB-231 e MCF10A foram mantidas em frascos de cultura e acondicionadas em estufa com 5% de CO₂. As linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 cresceram em meio DMEM (Meio de Eagle modificado por Dulbecco) e foram suplementadas com 10% de soro fetal bovino, glutamina (0,29 g/L) e bicarbonato de sódio (3,7 g/L), pH 7,4. A linhagem MCF10A foi mantida em meio DMEM/F12 (Nutrient Mixture Ham) suplementado com 10% de soro fetal equino e 0,02 µg/mL EGF, 5 µg/mL insulina, 1,25 µg/mL hidrocortizona e 0,1 µg/mL toxina colérica. O inóculo inicial foi de 5×10^4 células/mL, que foram subcultivadas a cada dois dias e mantidas em fase log de crescimento celular, como descrito por Holandino e cols. (2001).

3.3 Teste de atividade mitocondrial

A atividade mitocondrial foi determinada pelo método de Mosmann (1983). Células (1×10^4 células x mL⁻¹) foram cultivadas em placas de 96 poços, em meio de

cultura apropriado para cada linhagem. Após 48 horas, o meio de cultura em contato com as células foi removido e substituído. Diferentes concentrações de clotrimazol (0 - 100 μM) foram adicionadas. O clotrimazol foi dissolvido em DMSO, utilizando-se como controle uma solução de 0,5% do mesmo em PBS, a qual foi testada nas mesmas condições utilizadas para o clotrimazol. Após 24 horas, lavou-se os poços duas vezes com PBS e adicionou-se 5 mg/mL de uma solução de MTT (Brometo de 3,4,5-dimetilazol-2,5-difeniltetrazolium) em PBS. As placas de cultura contendo essa solução foram deixadas por 3 horas a 37°C. Ao final dessa incubação, descartou-se o sobrenadante e os cristais de formazam produzidos foram dissolvidos em 200 μL de DMSO. A absorbância do corante foi medida no comprimento de onda de 570 nm com a subtração do *background* em 650nm, utilizando-se o leitor de microplacas Victor 3 (PerkinElmer, USA). Dados representam a média \pm erro-padrão de no mínimo 3 experimentos ($n \geq 3$), realizados em duplicata.

3.4 Avaliação do consumo de glicose e produção de lactato

As linhagens foram incubadas com clotrimazol (0 - 100 μM) durante 24 h, conforme descrito anteriormente no item 3.3. Após a incubação, o meio de cultura das placas de 96 poços foi retirado e utilizado para avaliar o consumo de glicose e a produção de lactato como descrito por Leite e cols. (2007) e Meira e cols. (2005). O conteúdo de glicose que permaneceu no meio de cultura foi mensurado usando o sistema acoplado de enzimas contendo glicose oxidase/peroxidase (Glucox 500, Doles Ltda, GO, Brasil). A produção de lactato foi avaliada calculando o conteúdo de lactato no meio de cultura incubado com as células através de um meio reacional contendo lactato desidrogenase e NAD^+ . A redução do NAD^+ foi acompanhada através da medida da absorvância em 340 nm no leitor de microplacas Victor 3 (PerkinElmer, USA). Dados representam a média \pm erro-padrão de no mínimo 5 experimentos ($n \geq 5$).

3.5 Dosagem da atividade da PFK-1, HK, PK e G6PDH

As linhagens celulares foram crescidas em placas de 24 poços até atingirem a confluência. Posteriormente, o meio de cultura foi substituído e as linhagens foram incubadas com clotrimazol nas concentrações de 0, 25, 50, 75 e 100 μM durante 24 horas. As células foram, posteriormente, tripsinizadas, centrifugadas (3.000 rpm x 10 min) e ressuspensas em tampão 10 mM fosfato de potássio, pH 7,4, para atingir a concentração de 1×10^6 céls/mL e lisadas em N_2 líquido. Uma alíquota de 5 μL foi utilizada para a quantificação protéica da amostra como descrito no item 3.7., 100 μL do lisado foi utilizado para os ensaios de quantificação das atividades enzimáticas das amostras. O meio reacional para os ensaios acoplados da atividade fosfofrutocinásica continha: 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, 1 mM ATP, 1 mM NADH, 2 U/mL aldolase, 4 U/mL triosefosfato isomerase e 2 U/mL α -glicerofosfato isomerase. Para a atividade hexocinásica foi utilizado um meio reacional contendo: 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 5 mM MgCl_2 , 1 mM glicose, 1 mM NAD^+ , 1 U/mL glicose 6-fosfato desidrogenase. Para a atividade da piruvato cinase: 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 5 mM MgCl_2 , 120 mM KCl, 5 mM ADP, 5 mM fosfoenolpiruvato, 6,6 mM NADH, LDH 22 U/mL. Para a atividade da glicose 6-fosfato desidrogenase o meio reacional continha: 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 5 mM MgCl_2 , 2 mM NADP^+ , 1 mM glicose 6-fosfato. O volume final da reação, em todos os ensaios, foi de 200 μL , ou seja, 100 μL do meio reacional e 100 μL do lisado celular. A oxidação/redução do NADH/ NAD^+ ou a redução de NADP^+ foi acompanhada pela medida da absorvância em 340 nm no leitor de microplacas Victor 3 (PerkinElmer, EUA) (ZANCAN *et al.*, 2010). Dados representam a média \pm erro-padrão de no mínimo 6 experimentos ($n \geq 6$).

3.6 Dosagem do conteúdo de ATP intracelular

Células (1×10^4 células x mL^{-1}) foram cultivadas em placas de 96 poços, em meio de cultura apropriado para cada linhagem. Após 48 horas, o meio de cultura em contato com as células foi removido e substituído. Diferentes concentrações de clotrimazol (0 - 100 μM) foram adicionadas. Após a incubação de 24 horas, o meio de cultura foi retirado e 50 μL de tampão de lise celular do Kit ATPlite (*Luminescence ATP Detection Assay System* – PerkinElmer, EUA) foram adicionados diretamente

sobre as células. A placa foi agitada durante 5 min e, posteriormente, 50 μ L da solução de substrato foram adicionados. O conteúdo de ATP celular foi monitorado através do sistema baseado na reação da D-luciferina com a luciferase de *Photinus pyralis* (Kit ATPlite) seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante, utilizando o leitor de microplacas Victor 3 (PerkinElmer, EUA) para quantificar a luminescência produzida pela reação. Dados representam a média \pm erro-padrão de no mínimo 5 experimentos ($n \geq 5$), realizados em duplicata.

3.7 Dosagem de proteína

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

3.8 Avaliação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada através da quantificação da atividade da enzima lactato desidrogenase extravasada para o meio de cultura. Brevemente, as células (1×10^4 células \times mL⁻¹) foram cultivadas em placas de 96 poços em meio de cultura apropriado para cada linhagem. Após 48 horas, o meio de cultura em contato com as células foi removido e substituído por meio fresco e diferentes concentrações de clotrimazol (0 - 100 μ M) foram adicionadas. Ensaios controle foram realizados utilizando-se DMSO nas mesmas condições e volumes do ensaio com clotrimazol. Após 24 horas, a atividade da lactato desidrogenase presente no meio de cultura foi avaliada em um meio reacional contendo: 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 1 mM NAD⁺, 44,6 mM lactato de sódio. A redução do NAD⁺ foi avaliada pela medida da absorvância em 340 nm no leitor de microplacas Victor 3 (PerkinElmer, EUA). Dados representam a média \pm erro-padrão de no mínimo 5 experimentos ($n \geq 5$).

3.9 Teste de Invasão celular (Transwell assay)

Esse ensaio foi realizado em placas de 24 poços na presença de uma membrana de tereftalato de polietileno (PET) com 8 μ m de poro da Millipore

(*Millicell Hanging Cell Culture Inserts*, Millipore, EUA). As câmaras foram reidratadas em meio isento de soro. Meio completo contendo 10% de soro fetal bovino ou equino foi adicionado na placa (em contato com a base da câmara) para servir como quimioatratador das células. Uma suspensão contendo 5×10^4 células/mL em meio livre de soro fetal foi adicionado no interior da câmara e incubada durante 24 h na presença ou ausência de $50 \mu\text{M}$ de clotrimazol. As células remanescentes na superfície da membrana (parte superior da câmara) foram removidas com um cotonete, enquanto que as células na superfície inferior das membranas foram tripsinizadas e contadas em câmara de Neubauer, seguindo o protocolo descrito por Chan e cols. (2008). Dados representam a média \pm erro-padrão de no mínimo 3 experimentos ($n \geq 3$).

4.0 Ensaio de migração celular

A migração celular foi avaliada pelo ensaio de *wound-healing* segundo Chan e cols. (2008). Brevemente, as células foram crescidas em placas de cultura de 6 poços até atingirem a confluência. Posteriormente, o meio de cultura foi removido e foi produzido um dano na monocamada celular através de uma ponteira de $200 \mu\text{l}$. As células foram lavadas com PBS e incubadas a 37°C na estufa com meios de cultura completo, na presença ou na ausência de $50 \mu\text{M}$ de clotrimazol. Nos tempos indicado (0, 6 e 12 h), as imagens, por contraste de fase, de locais específicos do dano produzido foram capturadas. As imagens foram, então, analisadas e uma medida da área do dano (em μm) foi realizada através do *software* BELView (BEL Engineering, Itália) avaliando quanto as células conseguiram avançar em busca da confluência. Dados representam a média \pm erro-padrão de no mínimo 2 experimentos ($n \geq 2$), realizados em duplicata.

4.1 Análise estatística dos resultados

As análises estatísticas e as regressões não lineares foram realizadas através do aplicativo SigmaPlot 10.0 integrado com o pacote SigmaStat 3.1 (Systat Co. CA, USA) de acordo com o descrito por Zancan e cols. (2010). Exceto quando indicado, o

teste t de Student foi utilizado. Os valores de $p \leq 0.05$ foram usados para considerar os valores das médias estatisticamente diferentes.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização do perfil metabólico, da atividade e expressão de enzimas glicolíticas em linhagens de mama humana

Uma vez que o objetivo principal desta dissertação foi estudar o efeito do clotrimazol sobre o metabolismo energético, especialmente o glicolítico, paralelamente aos resultados descritos a seguir, realizamos a caracterização do perfil metabólico e da atividade catalítica das principais enzimas da glicólise nas linhagens utilizadas neste estudo. Para isso, utilizamos três linhagens de mama humana: MCF10A, MCF-7 e MDA-MB-231, as quais apresentam um perfil não tumorigênico, tumorigênico e metastático, respectivamente.

Os resultados obtidos nesta etapa estão publicados no artigo intitulado: **“Differential expression of phosphofructokinase-1 isoforms correlates with the glycolytic efficiency of breast cancer cells”** no periódico *Molecular Genetics and Metabolism*, volume 100, fascículo 4, páginas 372 a 378, ano 2010.

Neste primeiro grupo de resultados, apresentados no formato de artigo, avaliamos a atividade das enzimas glicolíticas HK, PFK-1 e PK e a eficiência glicolítica das referidas linhagens celulares. Para isso, avaliamos o consumo de glicose e produção de lactato, atividade redutora mitocondrial e conteúdo de ATP celular. Além disso, avaliamos o fluxo através da PPP, pela atividade da G6PDH. Adicionalmente, avaliamos o padrão de expressão das isoformas da PFK-1 nas três linhagens celulares de mama humana.

Este trabalho nos permitiu sugerir que a eficiência glicolítica, primordial para a sobrevivência de células tumorais, depende preferencialmente da expressão da isoforma L da PFK-1 nas células estudadas.



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular Genetics and Metabolism

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ymgme

Differential expression of phosphofructokinase-1 isoforms correlates with the glycolytic efficiency of breast cancer cells

Patricia Zancan^{a,*}, Mauro Sola-Penna^b, Cristiane Marques Furtado^a, Daniel Da Silva^b

^aLaboratório de Oncobiologia Molecular – LabOMol, Faculdade de Farmácia, UFRJ, Brazil

^bLaboratório de Enzimologia e Controle do Metabolismo – LabECoM, Faculdade de Farmácia, UFRJ, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 March 2010

Received in revised form 13 April 2010

Accepted 13 April 2010

Available online 18 April 2010

Keywords:

Glycolysis

Warburg

Metabolism

Breast cancer

Enzyme

ABSTRACT

Cancer cells are characterized by increased aerobic glycolysis, which correlates with a negative prognosis. Although this correlation is well known, the mechanism of the elevated rate of glycolysis in cancer and the role of glycolytic enzymes have yet to be determined. The present work aims to evaluate the activity of the major enzymes that regulate glycolysis in breast cancer cell lines of varying aggressiveness. MCF10A, MCF-7 and MDA-mb-231 are human breast-derived cell lines with non-tumorigenic, tumorigenic and metastatic profiles, respectively. These cell lines have increasing degrees of glycolytic efficiency, i.e., lactate produced per glucose consumed, corresponding to their metastatic potential. Although, there are no differences in phosphofructokinase (PFK) or pyruvate kinase (PK) activities, the activity of hexokinase (HK) activity is higher in both tumorigenic cell lines compared to MCF10A cells. No difference in HK activity is observed between MCF-7 and MDA-mb-231 cells, suggesting that the difference in their glycolytic efficiency could not be attributed to this enzyme. However, we find that expression of the PFK-L isoform directly and strongly correlates with aggressiveness and glycolytic efficiency in these cell lines. Thus, we conclude that glycolytic efficiency, which is important for the survival of cancer cells, depends primarily on the preferential expression of PFK-L over the M and P isoforms.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

A hallmark of malignant cancers is elevated glucose uptake and aerobic glycolysis (Warburg effect), and this is a negative prognostic indicator which may endow tumor cells with invasive potential as well as resistance to radiation and chemotherapies [1]. Despite wide acceptance of the functional importance of glycolysis in cancer, surprisingly little is known about the influence of glycolytic enzymes on cancer cell metabolism. Genes in the glycolytic pathway are over-expressed in the majority of clinically relevant cancers [2]. In addition to these genomic alterations, mammary gland tumors appear to use other survival strategies that also affect glycolysis.

Some authors have proposed that glycolytic activity correlates with the degree of tumor malignancy, so that the rate of glycolysis is higher in more de-differentiated and faster-growing tumors than in slow-growing tumors or normal cells [3–5]. In fact, a high level of lactate has been proposed as predictor of malignancy [6–9]. Furthermore, the glycolytic phenotype persists during metastasis due

to increased production of glucose-derived acid, potentiating invasion of tumor cells into the extracellular matrix of host tissue [10]. High glycolysis in tumor cells has also been related to resistance to chemo- and radio-therapy treatments [11–13]. Thus, blocking glycolysis might impede tumor progression and enhance efficacy of chemo- and radio-therapy.

In this study, we analyzed metabolic profiles and glycolytic enzyme activities in three breast cell lines with different metastatic potentials. We demonstrate that regardless glycolytic gene expression, aggressiveness of tumor cells was strongly associated with elevated glycolytic activity.

Materials and methods

Cells and reagents

The human breast cancer cell line MCF-7 was obtained from the Cell Bank of the Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, UFRJ, Brazil. MDA-mb-231 and the non-tumorigenic epithelial MCF10A cell lines were kindly supplied by Prof. Dr. Mitzi Brentani from the Universidade de São Paulo, USP, Brazil.

The tumor cell lines were maintained in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium; Invitrogen) supplemented with 10% (v/v) FBS (fetal bovine serum; Invitrogen) and L-glutamine. The MCF10A cell

* Corresponding author. Address: Laboratório de Oncobiologia Molecular – LabOMol, Departamento de Fármacos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ 21941-902, Brazil. Fax: +55 21 2260 9192/251.

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

line was maintained in DMEM/F12 medium (Invitrogen) supplemented with 5% FHS (fetal horse serum; Gibco) plus 0.02 µg/mL EGF, 5 µg/mL insulin, 1.25 µg/mL hydrocortisone and 0.1 µg/mL cholera toxin (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA). Cells were grown at 37 °C in 5% CO₂ atmosphere.

NAD⁺, NADH, ATP, glucose 6-phosphate dehydrogenase, fructose 6-phosphate, aldolase, lactate dehydrogenase, phosphoenolpyruvate, NADP⁺ and glucose 6-phosphate were obtained from Sigma. Other reagents were of the highest purity available.

Cell viability assay, glucose consumption, lactate production and ATP quantitative evaluation

To measure metabolic rates, cells were seeded in 96-well plates in the appropriate medium and grown to confluence. Then, the medium was removed and fresh medium was added, and the cells were returned to the incubator for 24 h. After this incubation, the medium was removed and used to evaluate glucose consumption, lactate production, and the amount of leaked lactate dehydrogenase (LDH), while the remaining cells were used to determine mitochondrial activity by MTT assay [14].

LDH activity was determined by spectrophotometrically monitoring by the conversion of NADH to NAD⁺ in a lactate-utilizing reaction [15]. Cellular ATP was assessed using a system based on firefly (*Photinus pyralis*) luciferase (PerkinElmer ATPLite) using a VICTOR3 multilabel reader (PerkinElmer).

Spectrophotometric assay for enzyme activity

Cells were seeded in 24-well plates and grown to confluence. Then, medium was removed and fresh medium was added, and cells were returned to the incubator for 24 h. After this incubation, cells were removed from the plates by trypsinization and counted in a hemocytometer. Protein concentrations of cell lysates were measured [16], and the glycolytic enzyme activities were evaluated. Phosphofructokinase-1 (PFK)¹ activity was assayed by an enzyme-coupled method, where the reduction of NAD⁺ was monitored in a spectrophotometer [17]. Hexokinase (HK), pyruvate kinase (PK) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) activities were assayed as previously described [18,19]. NADH oxidation or NAD⁺ reduction was followed by measuring the absorbance at 340 nm in a microplate reader (VICTOR 3, PerkinElmer). Reactions were initiated by the addition of an aliquot of cellular homogenate. Blanks with none of the coupled enzymes were performed to control for non-specific oxidation/reduction. Each curve was performed in quadruplicate.

Western blotting

Western blotting was performed as previously described [17]. Briefly, samples of whole-cell lysates were subjected to 8% SDS-PAGE and transferred to polyvinylidene difluoride membrane (PVDF Imobilon-P, Millipore), which were blocked with Tween-TBS (20 mM Tris-HCl, pH 7.5; 0.15 M NaCl; 0.1% Tween 20) containing 5% powdered milk, and subsequently incubated with polyclonal rabbit anti-PFK (1:5000; Santa Cruz). PVDF membranes were washed five times with Tween-TBS, followed by 1 h incubation with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:5000; GE). The same Western blots were reprobated with anti-actin antibody (1:5000; Millipore) to ensure that equal amounts of protein were loaded in each lane. Immunoreactive proteins were

detected by chemiluminescence using Kodak film and quantified by densitometry using ImageJ 1.43r (NIH, USA).

Reverse transcriptase-PCR

To investigate PFK gene expression, total RNA from MCF10A, MCF-7 and MDA-mb-231 cells was extracted using Trizol (Sigma), according to the protocol provided by the manufacturer. The concentration of total RNA was determined using NanoDrop spectrophotometer ND-1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) and its integrity was verified by 1% agarose gel electrophoresis (data not shown). Four micrograms of total RNA was reverse transcribed with reverse transcriptase (M-MLV, Uniscience) in a 20 µL reaction mixture using a random primer (Invitrogen). cDNA amplification was performed with a forward primer (5'-CGCTACTGTGGCTACCTGGC-3') and a reverse primer specific for each isoform (PFK-M: 5'-GCATGGAGTACAGGGAAACC-3', 741 bp; PFK-L: 5'-CCAGCATCTTCAGCATCAGC-3', 533 bp; PFK-P: 5'-GGCAGACTTGATGAGATGGC-3', 606 bp). The length of the resultant PCR products enabled us to distinguish between the different PFK isoforms. GAPDH amplification was used as an internal control (forward: 5'-ATCACCATCTTCAGGAGGCG-3' and reverse 5'-CCTGCTTCACCACCTTCTTG-3'). The PCR conditions were as follows: initial denaturation for 1 min at 98 °C, 28 cycles of 30 s at 96 °C, 45 s at 58 °C (PFK) or 57.5 °C (GAPDH) and 1 min at 72 °C, and finally 5 min at 73 °C. DNA fragments were separated by electrophoresis in 1.0% agarose gels containing ethidium bromide and visualized under UV transillumination. PFK isoforms were quantified by ImageJ 1.43r (NIH, USA).

Statistics

Statistical analysis and non-linear regression were performed using the software SigmaPlot 10.0 integrated with SigmaStat 3.1 packages (Systat, CA, USA). Student's *t*-test was used unless otherwise indicated. *P* values <0.05 were considered statistically significant.

Results

The metabolic profiles of three human breast cell lines were compared by measuring glucose consumption, lactate production, intracellular ATP and mitochondrial reduction activity. The cell lines used were the non-tumorigenic MCF10A and the tumorigenic MCF-7 and MDA-mb-231, representing noninvasive and invasive profiles, respectively. There was a negative correlation between glucose consumption and tumorigenic aggressiveness. The glucose consumption rate of MDA-mb-231 was 40% lower than that of MCF-7, which, in turn, was 10% lower than MCF10A (Fig. 1A). However, lactate production in both tumor cell lines was approximately 35% higher than that of MCF10A cells (Fig. 1A). Although lactate production was not different between MCF-7 and MDA-mb-231 cells, the ratio between lactate production and glucose consumption showed a strong positive correlation with the aggressiveness of the tumor cells (Fig. 1B). The more aggressive cell lines had a higher ratio of lactate production to glucose consumption, suggesting that the invasive tumor cells have increased rates of glycolysis and a higher efficiency of conversion of glucose into lactate (glycolytic efficiency). The mitochondrial reduction activity of the cell lines showed the opposite trend, where MCF10A cells had the highest activity, followed by MCF-7 and then MDA-mb-231 cells (Fig. 1C). These data indicate that cells with lower glycolytic efficiency compensate with higher mitochondrial metabolism. Moreover, this compensation appears to be very efficient, since higher intracellular ATP levels were observed in MCF10A compared to MCF-7 and MDA-mb-231 cells (Fig. 1D). Despite the lower glucose consumption, mitochondrial

¹ Abbreviations used: HK, hexokinase; PFK, phosphofructokinase; PK, pyruvate kinase; PFK-L, liver isoform of PFK; PFK-M, muscle isoform of PFK; PFK-P, platelet isoform of PFK; LDH, lactate dehydrogenase; G6PDH, glucose-6-phosphate dehydrogenase.

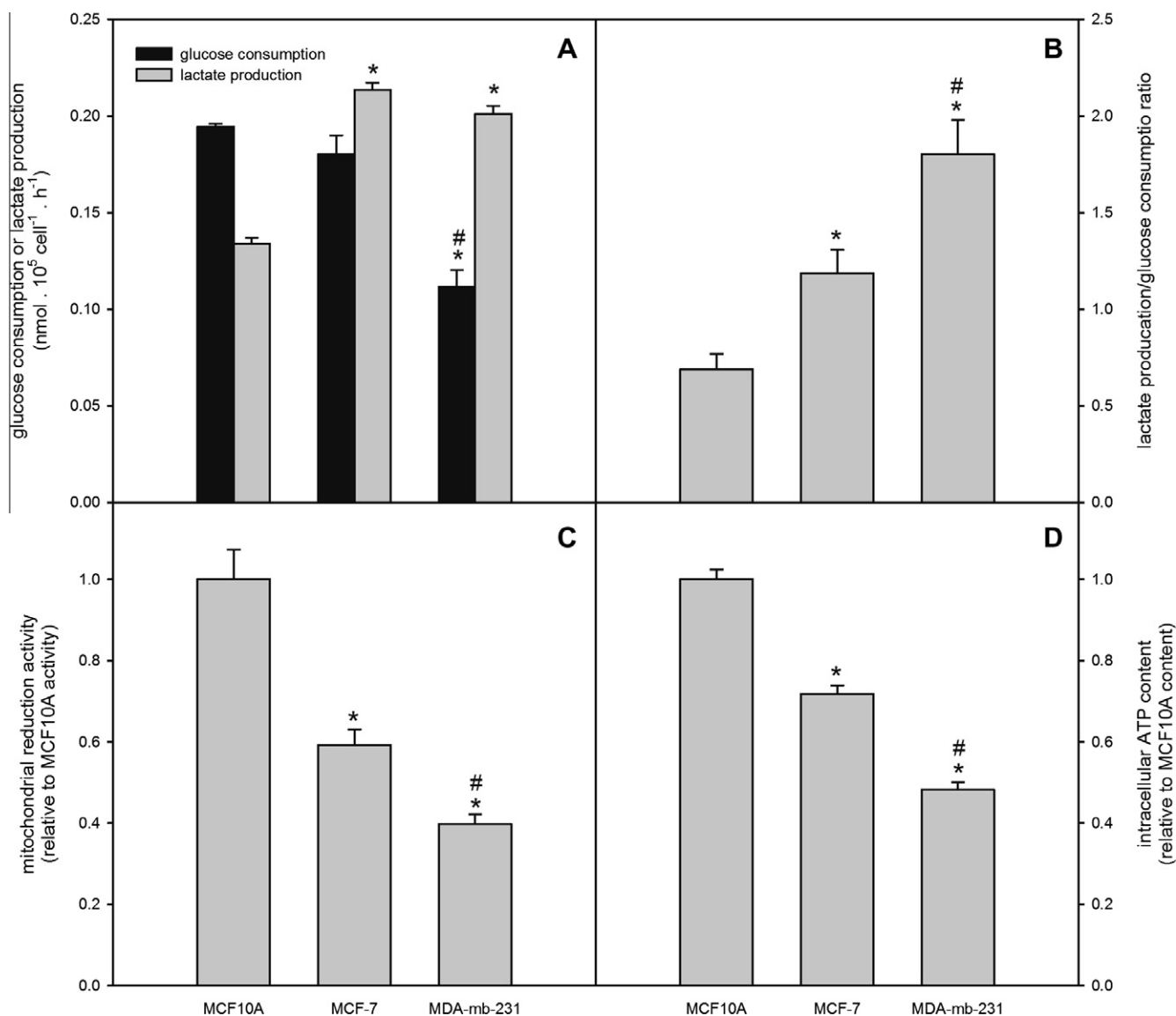


Fig. 1. Characterization of the metabolic profiles of human breast cancer cell lines. (A) Comparison of glucose consumption in MCF10A, MCF-7 and MDA-mb-231 cells. Cells were incubated for 24 h, and glucose consumption was determined as described in the Materials and methods. (B) Lactate production in the three cell lines. Cells in exponential growth phase were incubated with fresh culture medium for 24 h, and lactate production was measured as described. (C) Relative mitochondrial reduction activity, evaluated by MTT assay. All values were normalized to that of MCF10A cells. (D) Intracellular ATP content measured by relative firefly luciferase activity (PerkinElmer ATPLite Kit). Error bars represent standard errors from five independent experiments. * $P < 0.05$ vs. MCF10A; # $P < 0.05$ vs. MCF-7 (two-tailed t -test).

activity and ATP content, this elevated glycolytic efficiency might confer a proliferative advantage to MDA-mb-231 cells. However, we found a similar basal rate of cell proliferation among the three breast cell lines (data not shown).

To investigate the mechanism for the differences in tumor cell metabolism, we compared the activity of the rate-limiting enzymes of glycolysis in the three cell lines. Hexokinase, phosphofruktokinase and pyruvate kinase catalyze the three irreversible steps of glycolysis that determine the rate of the glycolytic flux [20]. We found that there is a positive correlation between HK activity and the tumorigenic aggressiveness of the cell lines, while no significant differences in activity were observed for PFK and PK (Fig. 2A). Since HK activity was positively correlated with the ratio between lactate production and glucose consumption, its activity might be the critical determinant for glycolytic efficiency in breast tumor cells. Although PFK and PK activities did not differ between the three cell lines, the activities of these two enzymes were 5- and 3-times higher than HK activity, respectively. These data suggest

that glucose, once phosphorylated by HK, can be rapidly converted into pyruvate due to the high activities of PFK and PK.

Moreover, the increased glycolytic efficiency observed in the tumor cell lines could be due, in part, to the activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), the rate-limiting catalyzing enzyme of pentose phosphate pathway (PPP). The PPP can divert glucose-6-phosphate from glycolysis, diminishing glycolytic efficiency. G6PDH activity was higher in MCF10A cells compared to MCF-7 and MDA-mb-231 cells (Fig. 2B). Thus, MCF10A might mobilize more glucose-6-phosphate for the PPP, resulting in lower rates of glycolysis.

The fact that PFK activity did differ among the three cell lines was intriguing because this enzyme is considered to be the pace-maker for glycolysis, determining its rate and, consequently, lactate production. To more closely investigate the discrepancy between PFK activity and lactate production, we evaluated total PFK content in the cell lines by Western blot analysis. Surprisingly, we observed that, despite the lack of difference in PFK activity, MCF10A cells had a higher PFK content compared to MCF-7 and

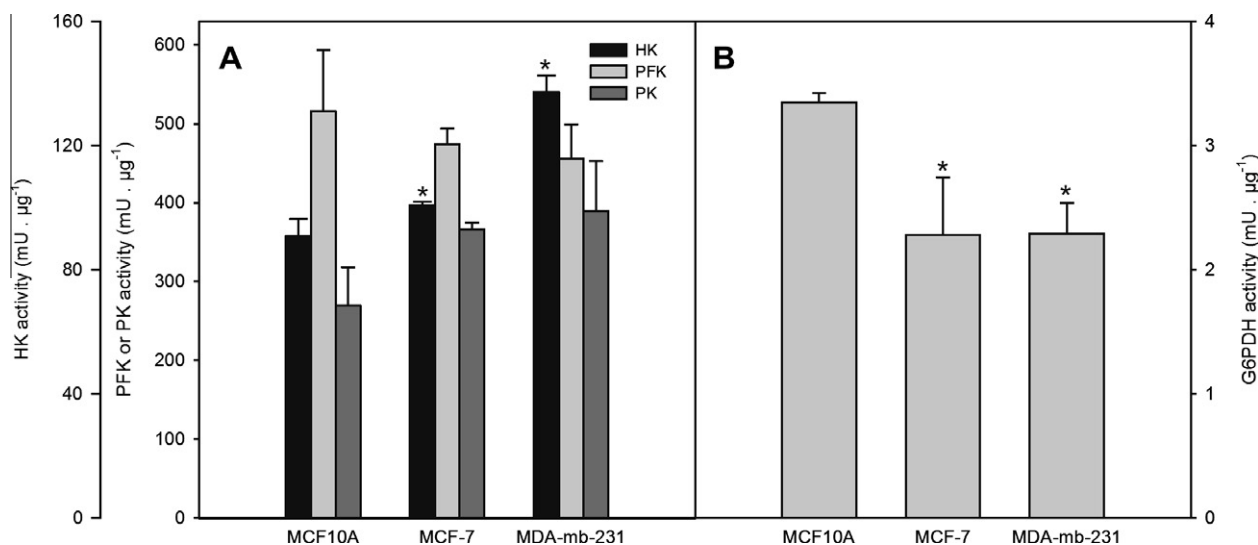


Fig. 2. Metabolic enzyme activity profiles in MCF10A, MCF-7 and MDA-mb-231 cell lines. Cell lines were grown to confluence in the indicated media as described in Materials and methods. Cell lysates were used to evaluate HK, PFK and PK enzyme activities (A) and G6PDH activity (B) as described in the Materials and methods. Plotted values are mean \pm standard errors ($n = 5$ separate experiments). * $P < 0.05$ compared to MCF10A cell line.

MDA-mb-231 cells (Fig. 3A). Densitometric analysis revealed that PFK content decreased with increasing aggressiveness of the cell line (Fig. 3C). These data seemed to conflict with the measured PFK activity and with lactate production, which was higher in the tumor cell lines than in non-tumorigenic MCF10A cells (Fig. 1). This fact led us to consider that the decrease in PFK content in aggressive tumor cell lines may be counterbalanced by the expression of a more active isoform. To determine the expression of specific PFK isoforms, we measured the mRNA for the three PFK isoforms (M, L and P) by RT-PCR (Fig. 3B). The total PFK mRNA content was comparable with the enzyme content quantified by Western blot

analysis, and decreased with the increasing aggressiveness of the cell line (Fig. 3C). However, we observed a drastic difference in the expression pattern of the distinct PFK isoforms. MCF10A cells showed equivalent expression of the three isoforms, with PFK-L slightly lower than the PFK-M and PFK-P (Fig. 3D). However, in the tumorigenic cell lines, PFK-L was the most highly expressed isoform (Fig. 3D). Indeed, PFK-L content increased with increasing aggressiveness of the cell line, whereas PFK-M and PFK-P expression decreased (Fig. 3D).

The changes observed in the expression of PFK isoforms among the cell lines correlate with the glycolytic efficiency plotted in

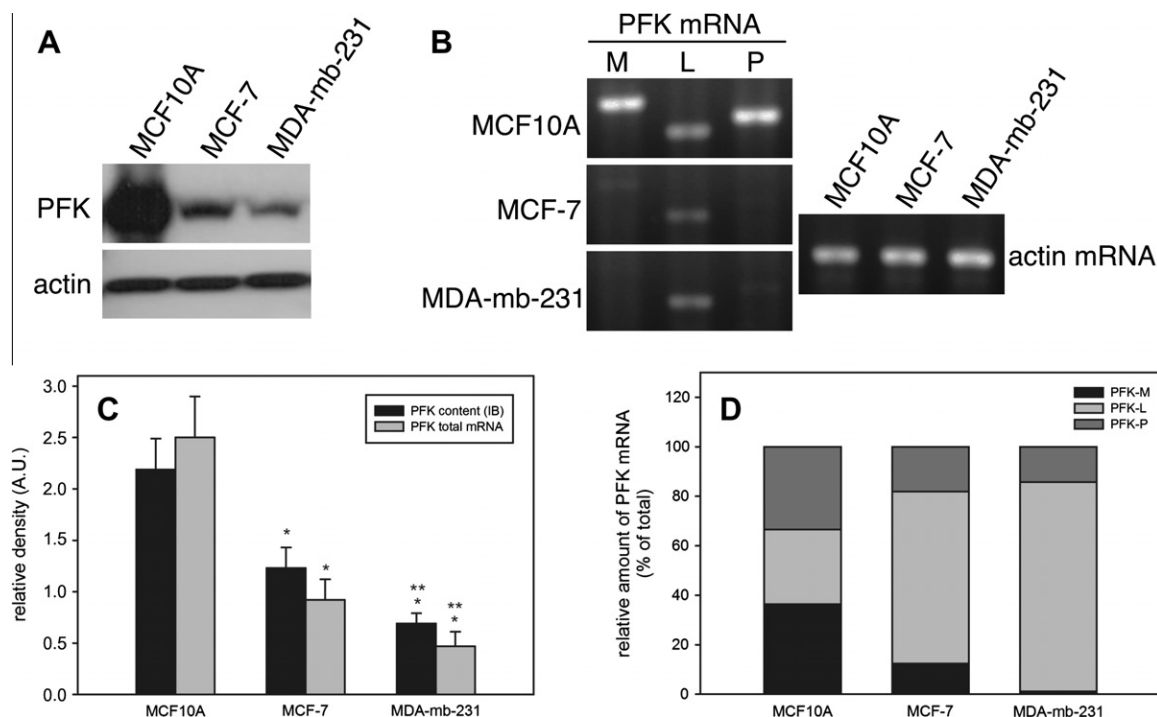


Fig. 3. Dysregulated expression of PFK and PFK mRNA expression in human breast cancer cell lines. (A) Western blot analysis was performed on whole-cell lysates, probed with rabbit polyclonal anti-PFK antibody, and re-probed with anti-actin as a loading control. (B) Agarose gel electrophoresis analysis of PFK RNA isoform expression in MCF10A, MCF-7 and MDA-mb-231 cell lines. RT-PCR was conducted as described in the Materials and methods. (C) Relative PFK content and PFK total mRNA levels. The PFK content was evaluated by immunoblotting as described. (D) Relative amounts of PFK mRNA isoforms as percentage of the control.

Fig. 1B. A strong negative correlation was found between glycolytic efficiency and PFK-M expression (Fig. 4A, correlation coefficient = -0.987 , $P < 0.05$), whereas a strong positive correlation was observed between glycolytic efficiency and PFK-L expression (Fig. 4B, correlation coefficient = 0.992 , $P < 0.05$). A small decrease in PFK-P expression with enhanced glycolytic efficiency was observed but did not reach a statistically significant level (Fig. 4C, correlation coefficient = -0.826 , $P > 0.05$).

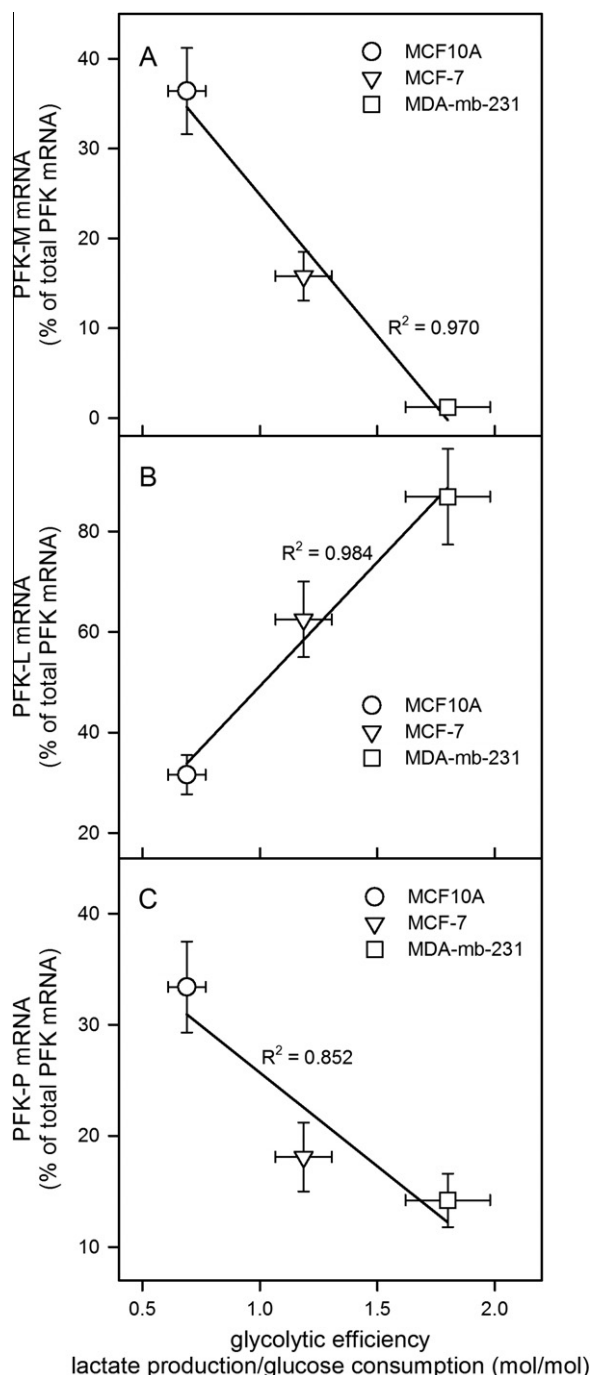


Fig. 4. Correlation plots between glycolytic efficiency and PFK isoforms expression. The glycolytic efficiency was calculated as the ratio of lactate production/glucose consumption (mol/mol). PFK isoforms mRNA levels were plotted as a percentage of total PFK mRNA. Values of PFK isoform expression and glycolytic efficiency are mean \pm standard errors of at least three and five independent experiments, respectively.

Discussion

It has long been known that tumors generally have higher glycolytic rates than normal cells [1,10]. In the present work, we compared glucose consumption among three cell lines and found a negative relationship between glucose utilization as well as tumor cell aggressiveness. The two tumorigenic cell lines showed higher rates of lactate production compared to the non-tumorigenic cell line, which supports the higher glycolytic rate described for tumors, mainly ascribed the Warburg effect [1,10,12,20–22]. In fact, the Warburg effect can be translated into glycolytic efficiency, as shown in Fig. 1B, since this parameter unveils the relationship between produced lactate and the glucose consumed. The highest possible glycolytic efficiency (2 mol/mol) would occur when all the glucose consumed by a cell is converted into lactate, bypassing other metabolic pathways that could utilize glucose or its metabolites. Our results support the hypothesis that the Warburg effect is positively correlated with cell aggressiveness, as has been previously proposed [1,10,21,23,24].

High glycolytic efficiency appears to be insufficient for maintaining ATP production, since the cell line showing the highest glycolytic efficiency had the lowest levels of intracellular ATP, and vice versa. Instead, intracellular ATP levels were higher in cell lines with higher mitochondrial activities, revealing the importance of mitochondria in the energy supply of the cell. It is well known that inhibition of cancer cell glycolysis leads to a decrease in ATP levels and to drug resistance [12]. This phenomenon is probably due to the deficiency of mitochondrial activity in aggressive tumors, making these cells highly dependent on glycolytic flux for energy. This dependence explains the high glycolytic efficiency found in more aggressive cells, which also have lower mitochondrial activity, since the maximal conversion of glucose into lactate represents the maximal production of ATP from glucose consumed. On the other hand, studying breast cancer brain metastases *in vivo*, Chen et al. demonstrated that these metastatic cells show enhanced mitochondrial respiratory pathways for energy production [25]. The fact that metastatic cells should adapt their metabolism to grow in the brain might explain the differences between our results and those published by Chen et al. [25]. In fact, the chances of finding different adaptations in metastatic cells grown in different tissues are high [26–31]. The present work shows the metabolic profiles of cancer cells grown to confluence and may reproduce only some aspects of the complex microenvironment milieu of a cancer tissue.

In the present work, we sought to correlate glycolytic efficiency with the activity of key enzymes that regulate glycolysis, HK, PFK and PK. However, we found differences only in HK activity, which was higher in tumorigenic cells than in the non-tumorigenic cell line. However, we found no difference in HK activity between MCF-7 and MDA-mb-231 cells, in spite of the latter having higher glycolysis. Because tumor cell aggressiveness did increase along with glycolytic efficiency we next considered the possibility that differences in PFK expression might be responsible for the observed metabolic variations between cell lines. This hypothesis was based on previous publications stating the importance of PFK for the regulation of glycolysis [14,17,32–36] and the survival of cancer cells [32,37–40]. Strikingly, the levels of PFK, as determined by Western blot, were highest in the non-tumorigenic cells, contrary to our expectations. However, upon measuring the expression of different PFK isoforms, we found a strong positive correlation between the expression of the PFK-L isoform and cell aggressiveness, with concomitant decrease of M and P isoform expression. Two major considerations should be presented here. First, despite the larger amount of PFK in MCF10A cells, compared to the other two cell lines, the enzyme activity is similar among

them (compare Fig. 3A with Fig. 2A). This indicates that the evaluation of an enzyme content is not always correlated to changes in the enzyme activity or a pathway rate. Several recent studies have used this approach (protein content) to predict metabolic fluxes (such as the case of the study of Chen et al. [25]) but their results should be interpreted with parsimony, or verified by an evaluation of enzymes activities or metabolic markers. Second, our results suggest that the changes of the expressed PFK isoform directly correlate with the glycolytic efficiency and the tumor aggressiveness. In addition, the expression of other glycolytic enzymes, such as phosphoglycerate mutase and glucosephosphate isomerase, has been correlated with increase in cell lifespan [41]. Actually, it has been stated that some glycolytic enzymes present additional non-glycolytic functions in transcriptional regulation, apoptosis control and cell motility [42]. Some of these functions only occur when the enzyme is active, highlighting the importance of these enzymes' activities to other cellular events other than energy production. A recent study has shown that PFK associates to the inactive phosphorylated form of the pro-apoptotic protein Bad [43]. This association stimulates the activity of the enzyme, increasing the glycolytic flux and inhibiting apoptosis [43]. Moreover, PFK also binds to the cytoskeleton stabilizing its structure and contributing to cell shape and motility [44,45]. Thus, the changes of the expressed PFK isoform observed here could have consequences not only to the rate of the reaction catalyzed but also to the putative additional function of the enzyme.

Alterations in PFK isoform expression in tumors have been reported in several types of tumors, including brain, kidney, lung and skin, which all preferentially express PFK-L [34]. Nevertheless, there has not yet been any information regarding alterations in PFK isoform expression in breast cancer. The data presented here clearly show that PFK-L is the major isoform expressed in the more aggressive breast tumor cell line (~90%). From these data, we may infer that during breast cancer tumorigenesis there is an increase in the expression of PFK-L over PFK-P and PFK-M. It has been proposed that tumors might preferentially over-express M or L isoforms due to the lower sensitivity of the former to ATP inhibition and the latter to citrate inhibition [46].

Conclusions

Our data also show that ATP content decreases with the increasing aggressiveness of the cell lines (Fig. 1), thus PFK inhibition by this metabolite might not be limiting in these cells. This could also explain the increased expression of L isoform, which has a high baseline activity and is less sensitive than the P isoform to ATP or citrate inhibition. Indeed, the preferential expression of PFK-L in MDA-mb-231 cells could be responsible for their high level of glycolytic efficiency. In summary, we conclude that glycolytic efficiency, which is critical for the survival of cancer cells, depends on the preferential expression of PFK-L over the M and P isoforms.

Acknowledgments

This work was supported by Grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

- [1] I.F. Robey, R.M. Stephen, K.S. Brown, B.K. Baggett, R.A. Gatenby, R.J. Gillies, Regulation of the Warburg effect in early-passage breast cancer cells, *Neoplasia* 10 (2008) 745–756.
- [2] B. Altenberg, K.O. Greulich, Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes, *Genomics* 84 (2004) 1014–1020.
- [3] P.L. Pedersen, Tumor mitochondria and the bioenergetics of cancer cells, *Prog. Exp. Tumor Res.* 22 (1978) 190–274.
- [4] X.L. Zu, M. Guppy, Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313 (2004) 459–465.
- [5] S. Rodríguez-Enríquez, A. Marín-Hernández, J.C. Gallardo-Pérez, L. Carreño-Fuentes, R. Moreno-Sánchez, Targeting of cancer energy metabolism, *Mol. Nutr. Food Res.* 53 (2009) 29–48.
- [6] S. Walenta, T. Schroeder, W. Mueller-Klieser, Lactate in solid malignant tumors: potential basis of a metabolic classification in clinical oncology, *Curr. Med. Chem.* 11 (2004) 2195–2204.
- [7] S. Walenta, W.F. Mueller-Klieser, Lactate: mirror and motor of tumor malignancy, *Semin. Radiat. Oncol.* 14 (2004) 267–274.
- [8] S. Walenta, M. Wetterling, M. Lehrke, G. Schwickert, K. Sundfor, E.K. Rofstad, W. Mueller-Klieser, High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers, *Cancer Res.* 60 (2000) 916–921.
- [9] M. Sola-Penna, Metabolic regulation by lactate, *IUBMB Life* 60 (2008) 605–608.
- [10] R.A. Gatenby, R.J. Gillies, Why do cancers have high aerobic glycolysis?, *Nat. Rev. Cancer* 4 (2004) 891–899.
- [11] G. Maschek, N. Sivaraj, W. Priebe, P. Braunschweiger, K. Hamilton, G.F. Tidmarsh, L.R. De Young, T.J. Lampidis, 2-Deoxy-D-glucose increases the efficacy of Adriamycin and paclitaxel in human osteosarcoma and non-small cell lung cancers in vivo, *Cancer Res.* 64 (2004) 31–34.
- [12] R.H. Xu, H. Pelicano, Y. Zhou, J.S. Carew, L. Feng, K.N. Bhalla, M.J. Keating, P. Huang, Inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia, *Cancer Res.* 65 (2005) 613–621.
- [13] K.A. Lee, R.A. Roth, J.J. LaPres, Hypoxia, drug therapy and toxicity, *Pharmacol. Ther.* 113 (2007) 229–246.
- [14] G.A. Spitz, C.M. Furtado, M. Sola-Penna, P. Zancan, Acetylsalicylic acid and salicylic acid decrease tumor cell viability and glucose metabolism modulating 6-phosphofructo-1-kinase structure and activity, *Biochem. Pharmacol.* 77 (2009) 46–53.
- [15] M.K. Schwartz, O. Bodansky, Utilization of automation for studies of enzyme kinetics, *Methods Biochem. Anal.* 16 (1968) 183–218.
- [16] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [17] W.S. Coelho, K.C. Costa, M. Sola-Penna, Serotonin stimulates mouse skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase through tyrosine-phosphorylation of the enzyme altering its intracellular localization, *Mol. Genet. Metab.* 92 (2007) 364–370.
- [18] S.J. Khundmiri, M. Asghar, F. Khan, S. Salim, A.N. Yusufi, Effect of ischemia and reperfusion on enzymes of carbohydrate metabolism in rat kidney, *J. Nephrol.* 17 (2004) 377–383.
- [19] E. Iori, R. Millioni, L. Puricelli, G. Arrigoni, L. Lenzi, R. Trevisan, P. James, G.P. Rossi, L.A. Pinna, P. Tessari, Glycolytic enzyme expression and pyruvate kinase activity in cultured fibroblasts from type 1 diabetic patients with and without nephropathy, *Biochim. Biophys. Acta* 1782 (2008) 627–633.
- [20] R. Diaz-Ruiz, S. Uribe-Carvajal, A. Devin, M. Rigoulet, Tumor cell energy metabolism and its common features with yeast metabolism, *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Reviews on Cancer* 1796 (2009) 252–265.
- [21] H. Ashrafian, Cancer's sweet tooth: the Janus effect of glucose metabolism in tumorigenesis, *Lancet* 367 (2006) 618–621.
- [22] R.J. DeBerardinis, A. Mancuso, E. Daikhin, I. Nissim, M. Yudkoff, S. Wehrli, C.B. Thompson, Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104 (2007) 19345–19350.
- [23] J.W. Kim, C.V. Dang, Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect, *Cancer Res.* 66 (2006) 8927–8930.
- [24] G.L. Semenza, Targeting HIF-1 for cancer therapy, *Nat. Rev. Cancer* 3 (2003) 721–732.
- [25] E.I. Chen, J. Hewel, J.S. Krueger, C. Tiraby, M.R. Weber, A. Kralli, K. Becker, J.R. Yates 3rd, B. Felding-Habermann, Adaptation of energy metabolism in breast cancer brain metastases, *Cancer Res.* 67 (2007) 1472–1486.
- [26] S. Burghaus, A. Holsken, M. Buchfelder, R. Fahlbusch, B.M. Riederer, V. Hans, I. Blumcke, R. Buslei, A tumor-specific cellular environment at the brain invasion border of adamantinomatous craniopharyngiomas, *Virchows Arch.* 456 (2010) 287–300.
- [27] J.P. Greenfield, W.S. Cobb, D. Lyden, Resisting arrest: a switch from angiogenesis to vasculogenesis in recurrent malignant gliomas, *J. Clin. Invest.* 120 (2010) 663–667.
- [28] P.J. Hendriksen, N.F. Dits, K. Kokame, A. Veldhoven, W.M. van Weerden, C.H. Bangma, J. Trapman, G. Jenster, Evolution of the androgen receptor pathway during progression of prostate cancer, *Cancer Res.* 66 (2006) 5012–5020.
- [29] G. Acs, X. Xu, C. Chu, P. Acs, A. Verma, Prognostic significance of erythropoietin expression in human endometrial carcinoma, *Cancer* 100 (2004) 2376–2386.
- [30] G. Acs, P.J. Zhang, T.R. Rebbeck, P. Acs, A. Verma, Immunohistochemical expression of erythropoietin and erythropoietin receptor in breast carcinoma, *Cancer* 95 (2002) 969–981.
- [31] H. Zhong, A.M. De Marzo, E. Laughner, M. Lim, D.A. Hilton, D. Zagzag, P. Buechler, W.B. Isaacs, G.L. Semenza, J.W. Simons, Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases, *Cancer Res.* 59 (1999) 5830–5835.
- [32] T. El-Bacha, M.S. de Freitas, M. Sola-Penna, Cellular distribution of phosphofructokinase activity and implications to metabolic regulation in human breast cancer, *Mol. Genet. Metab.* 79 (2003) 294–299.

- [33] T.C. Leite, D. Da Silva, R.G. Coelho, P. Zancan, M. Sola-Penna, Lactate favours the dissociation of skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase tetramers down-regulating the enzyme and muscle glycolysis, *Biochem. J.* 408 (2007) 123–130.
- [34] M.M. Marinho-Carvalho, P.V. Costa-Mattos, G.A. Spitz, P. Zancan, M. Sola-Penna, Calmodulin upregulates skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase reversing the inhibitory effects of allosteric modulators, *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Proteins & Proteomics* 1794 (2009) 1175–1180.
- [35] P. Zancan, M. Sola-Penna, 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 (2005) 392–400.
- [36] P. Zancan, M. Sola-Penna, 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 (2005) 401–411.
- [37] D.D. Meira, M.M. Marinho-Carvalho, C.A. Teixeira, V.F. Veiga, A.T. Da Poian, C. Holandino, M.S. de Freitas, M. Sola-Penna, Clotrimazole decreases human breast cancer cells viability through alterations in cytoskeleton-associated glycolytic enzymes, *Mol. Genet. Metab.* 84 (2005) 354–362.
- [38] P. Zancan, A.O. Rosas, M.C. Marcondes, M.M. Marinho-Carvalho, M. Sola-Penna, Clotrimazole inhibits and modulates heterologous association of the key glycolytic enzyme 6-phosphofructo-1-kinase, *Biochem. Pharmacol.* 73 (2007) 1520–1527.
- [39] L. Glass-Marmor, R. Beitner, 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 (1999) 195–199.
- [40] D. Schwartz, R. Beitner, Detachment of the glycolytic enzymes, phosphofructokinase and aldolase, from cytoskeleton of melanoma cells, induced by local anesthetics, *Mol. Genet. Metab.* 69 (2000) 159–164.
- [41] H. Kondoh, M.E. Leonart, J. Gil, J. Wang, P. Degan, G. Peters, D. Martinez, A. Carnero, D. Beach, Glycolytic enzymes can modulate cellular life span, *Cancer Res.* 65 (2005) 177–185.
- [42] J.W. Kim, C.V. Dang, Multifaceted roles of glycolytic enzymes, *Trends Biochem. Sci.* 30 (2005) 142–150.
- [43] H. Deng, F. Yu, J. Chen, Y. Zhao, J. Xiang, A. Lin, Phosphorylation of Bad at Thr-201 by JNK1 promotes glycolysis through activation of phosphofructokinase-1, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 20754–20760.
- [44] G. Lilling, R. Beitner, Decrease in cytoskeleton-bound phosphofructokinase in muscle induced by high intracellular calcium, serotonin and phospholipase A2 in vivo, *Int. J. Biochem.* 22 (1990) 857–863.
- [45] G. Lilling, R. Beitner, Altered allosteric properties of cytoskeleton-bound phosphofructokinase in muscle from mice with X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx), *Biochem. Med. Metab. Biol.* 45 (1991) 319–325.
- [46] A. Marin-Hernandez, J.C. Gallardo-Perez, S.J. Ralph, S. Rodriguez-Enriquez, R. Moreno-Sanchez, HIF-1 α modulates energy metabolism in cancer cells by inducing over-expression of specific glycolytic isoforms, *Mini Rev. Med. Chem.* 9 (2009) 1084–1101.

4.2 Efeitos do clotrimazol sobre o metabolismo glicolítico, viabilidade celular e potencial metastático de linhagens celulares de mama humana

4.2.1 Efeitos do clotrimazol sobre o consumo de glicose e a produção de lactato em linhagens de mama humana

O metabolismo energético das células tumorais está frequentemente alterado em tumores (GATENBY e GILLIES, 2004) e os resultados previamente apresentados sugerem que a relação entre a produção de lactato e o consumo de glicose nas linhagens celulares MCF10A, MCF-7 e MDA-MB-231 aumenta conforme o grau de malignidade da célula estudada (ZANCAN *et al.*, 2010). Além disso, a utilização de glicose está consideravelmente aumentada nas células neoplásicas proliferativas (MEIRA *et al.*, 2005), e a privação de glicose pode induzir a morte celular em células de carcinoma mamário humano (LEE *et al.*, 1998). Por outro lado, o CTZ, como descrito na Introdução desta dissertação, possui efeitos antineoplásicos através de mecanismos que envolvem o controle da glicólise.

Inicialmente, nesta segunda etapa do estudo, resolvemos medir as taxas de consumo de glicose e de produção de lactato das células tratadas com CTZ. Para isso, utilizamos as mesmas três linhagens de mama humana (MCF10A, normal; MCF-7, tumoral; MDA-MB-231, metastática) visando comparar os efeitos do fármaco sobre diferentes fenótipos de malignidade. O efeito de diferentes concentrações de CTZ sobre o consumo de glicose nas linhagens de mama estão demonstrados na **Figura 11**. Após 24 h de exposição das células ao fármaco não foi observada qualquer mudança no padrão de consumo de glicose na concentração de 25 μM de CTZ para todas as linhagens testadas. Concentrações maiores do fármaco (50, 75 e 100 μM de CTZ) promoveram respostas diferentes dependendo do grau de malignidade da linhagem, onde a linhagem não tumorigênica MCF10A não foi suscetível ao CTZ, tendo inclusive seu consumo de glicose aumentado pelo fármaco. A linhagem MCF-7 não apresentou qualquer mudança no seu padrão de consumo de glicose, mesmo nas mais altas concentrações de CTZ testadas. Por outro lado, a linhagem metastática

MDA-MB-231 apresentou uma significativa redução do consumo de glicose quando 75 μM ou 100 μM de CTZ foram adicionados ao meio.

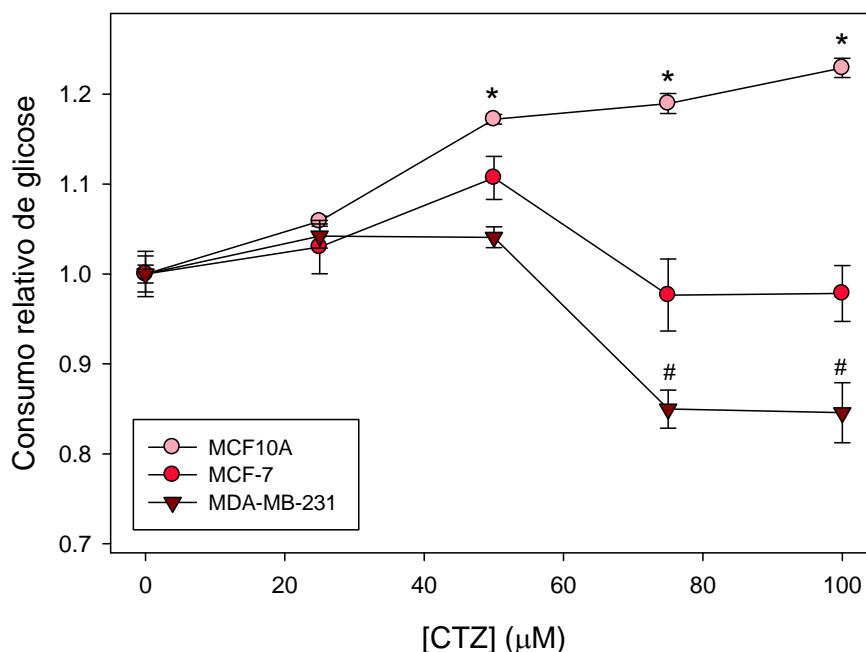


Figura 11 - Efeito do clotrimazol sobre o consumo de glicose nas linhagens de mama humana: MCF10A, MCF-7 e MDA-MB-231. As células cresceram até sua confluência em meio específico para cada linhagem, como indicado no Material e Métodos. O meio foi, então, substituído e as respectivas concentrações de CTZ foram adicionadas e as células foram incubadas por 24 h sob estas condições. Em seguida, o consumo de glicose no meio foi avaliado. Dados representam a média \pm erro-padrão de no mínimo 5 experimentos independentes ($n \geq 5$). # e * $p < 0,05$ comparado ao controle, na ausência do fármaco.

Após analisarmos o consumo de glicose, verificamos o efeito do CTZ sobre a produção de lactato. Na **Figura 12** podemos observar que 50 μM de CTZ não promoveu uma alteração na taxa de produção de lactato na linhagem MCF10A, embora esta mesma concentração do fármaco seja capaz de promover um aumento na captação de glicose por estas células (Figura 11). Por outro lado, o CTZ reduziu a produção de lactato nas linhagens tumorais.

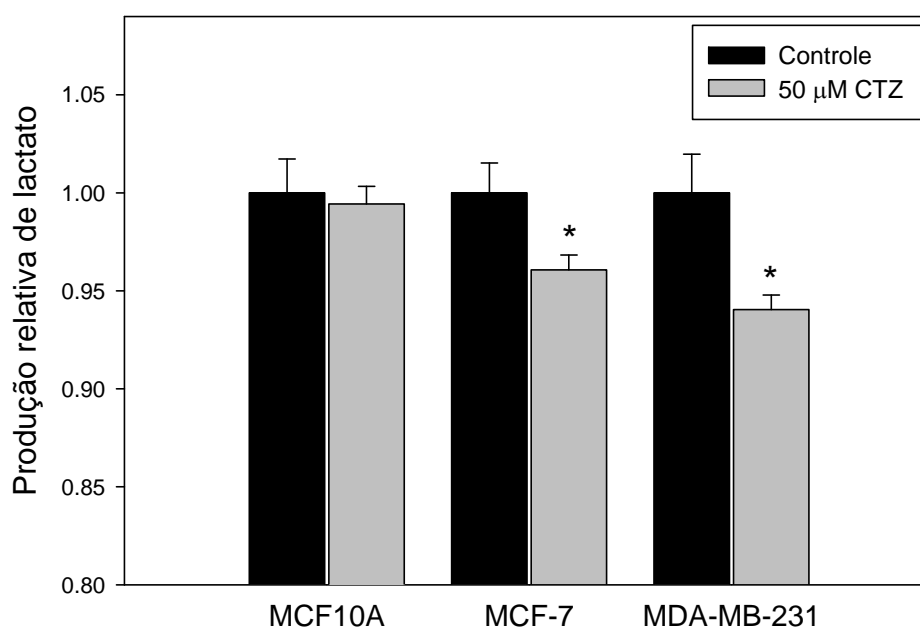


Figura 12 - Efeito do clotrimazol na produção de lactato nas linhagens de mama MCF10A, MCF-7 e MDA-MB-231. O ensaio foi realizado conforme descrito em Material e Métodos. Dados representam a média \pm erro-padrão de no mínimo 5 experimentos independentes ($n \geq 5$). * $p < 0,05$ comparado ao controle, na ausência do fármaco.

Os resultados obtidos para a taxa de consumo de glicose e produção de lactato, embora sutis, indicam que apesar de não haver uma diminuição no consumo de glicose na concentração de 50 μ M de CTZ, há uma redução no fluxo glicolítico observado pela diminuição na produção de lactato pelas células nesta condição. Isso pode indicar que está ocorrendo um desvio metabólico em decorrência do tratamento das linhagens com o fármaco.

4.2.2 Efeitos do CTZ sobre o metabolismo mitocondrial e sobre o conteúdo de ATP celular

Células tumorais exibem um metabolismo alterado caracterizado pelo aumento da captação de glicose e produção de lactato, como primeiramente observado

por Warburg. Essa mudança metabólica não é um reflexo do dano à fosforilação oxidativa mitocondrial (YOUNG e ANDERSON, 2008). Contudo, o ganho relativo ao consumo de glicose e à geração de ATP evidenciam que mesmo apresentando um baixo rendimento, as células tumorais priorizam a via glicolítica para a produção de ATP, sendo esta realizada mais eficientemente em tumores.

Visando avaliar o efeito do CTZ sobre o metabolismo oxidativo, nós avaliamos a taxa de redução mitocondrial através do ensaio do MTT. Este ensaio é, usualmente, empregado para avaliar a viabilidade celular. Entretanto, diversos estudos utilizam o MTT como um indicativo da atividade mitocondrial de células em cultura (OHNO e ABE, 1991; VAN DE LOOSDRECHT *et al.*, 1994; COLLIER e PRITSOS, 2003; HILL *et al.*, 2005; KHANA *et al.*, 2005). Como mostrado na **Figura 13**, 100 μM de CTZ promoveu uma redução da atividade mitocondrial em todas as linhagens testadas, embora tenhamos testados todas as concentrações descritas (0-100 μM). O fármaco foi capaz de gerar resultados diferentes entre as linhagens somente nesta concentração, comparando com os resultados obtidos em 50 μM , atingindo uma inibição de aproximadamente 40% e 60% nas linhagens MCF10A e MDA-MB-231, respectivamente. Contudo, as diferenças observadas nos resultados descritos anteriormente não podem ser totalmente explicadas por uma mudança na atividade redutora mitocondrial, uma vez que 50 μM de CTZ não promoveu qualquer alteração neste parâmetro nas três linhagens celulares.

Assim, a próxima etapa foi avaliar a quantidade de ATP produzido pelas diferentes linhagens celulares de mama após o tratamento com CTZ. Os dados apresentados na **Figura 14** demonstram que o CTZ reduziu o conteúdo de ATP celular

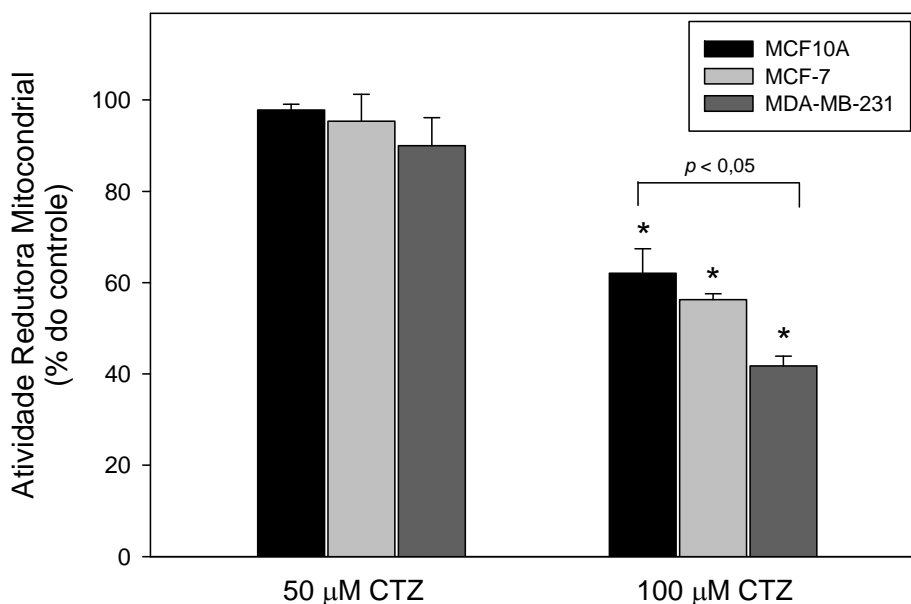


Figura 13 – Efeito do CTZ sobre a atividade mitocondrial das linhagens de mama. A redução mitocondrial foi mensurada como descrito em Material e Métodos. Os valores no gráfico correspondem a média \pm erro padrão de 5 experimentos independentes. * $p < 0.05$ comparando-se com o controle, na ausência do fármaco.

de maneira dependente da dose somente nas linhagens tumorais. Nestes ensaios, o fármaco apresentou diferenças quando a sua potência dependendo do fenótipo da linhagem. O CTZ foi capaz de promover um aumento na concentração de ATP celular na linhagem MCF10A ($26,25 \pm 0,82$ % e $35,28 \pm 3,42$ %, para 50 e 75 μM de CTZ, respectivamente). Por outro lado, o fármaco promoveu uma diminuição nos níveis de ATP intracelulares de modo mais efetivo sobre a linhagem metastática, mas também sobre as células MCF-7 apresentando valores estatisticamente diferentes do controle a partir de 50 μM de CTZ. As células MDA-MB-231 apresentaram uma resposta marcante. O conteúdo de ATP celular foi progressiva e significativamente reduzido conforme a concentração de CTZ elevou-se no meio, atingindo uma inibição máxima na concentração de 75 μM de CTZ (94,7 % de inibição).

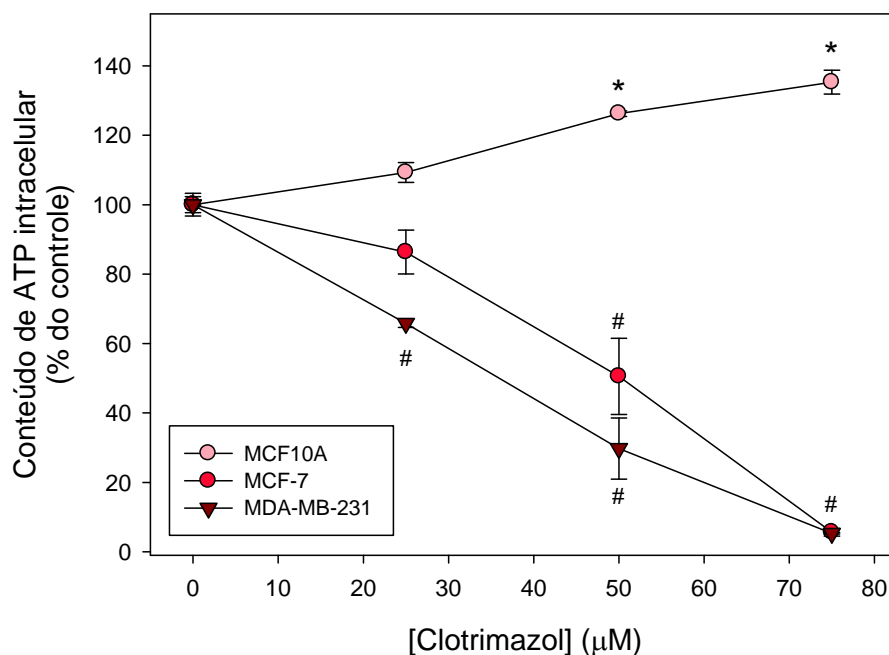


Figura 14 - Avaliação do conteúdo de ATP celular nas diferentes linhagens de mama na presença de CTZ. O ATP celular foi mensurado como descrito em Material e Métodos. Os valores no gráfico correspondem a média \pm erro padrão de 4 experimentos independentes. # e * $p < 0.05$ comparando-se com o controle, na ausência do fármaco.

Estes resultados demonstram o potencial do fármaco em agir de maneira específica, promovendo efeitos significativos sobre a linhagem metastática mais do que sobre a linhagem não metastática (MCF-7) e, principalmente, sobre a não tumoral (MCF10A). Conjuntamente, as últimas observações reforçam a capacidade do CTZ de possivelmente agir como um agente antineoplásico específico para linhagens mais agressivas, como no nosso modelo estudado, uma vez que na linhagem MDA-MB-231 o fármaco reduziu, mais eficientemente do que nas outras linhagens estudadas (MCF10A e MCF-7), o consumo de glicose, a produção de lactato e, conseqüentemente, a geração de ATP sem atingir o metabolismo mitocondrial de modo específico.

4.2.3 Efeitos do CTZ sobre a atividade das principais enzimas glicolíticas

Nossos resultados anteriores demonstram que o CTZ altera as taxas de consumo de glicose, produção de lactato e geração de ATP nas linhagens celulares promovendo respostas mais significativas sobre as linhagens tumorais se comparadas com a linhagem controle não tumoral. Adicionalmente, estes efeitos não são decorrentes de uma ação específica do fármaco sobre a atividade mitocondrial, uma vez que todas as linhagens, independente do seu fenótipo, respondem da mesma maneira a 50 μM CTZ. Assim, nosso próximo objetivo foi investigar se os efeitos antitumorais do CTZ ocorrem por sua ação direta sobre a glicólise. Para isso, avaliamos o efeito do fármaco sobre as três enzimas que regulam o fluxo glicolítico: HK, PFK-1 e PK.

Como descrito anteriormente, a HK é a primeira enzima regulatória do fluxo glicolítico e a única, pelo menos descrita até então, capaz de ligar-se a mitocôndria. Alguns estudos mostram que o CTZ é capaz de promover o desligamento da HK, especificamente a HKII, da mitocôndria, diminuindo, assim, a sua atividade (PENSO e BEITNER, 1997; MAJEWSKI *et al.*, 2004; CHIARA *et al.*, 2008). Contudo, não há descrição do efeito direto deste fármaco sobre a atividade da HK. Assim, avaliamos a atividade dessa enzima nas células de mama humana tratadas com CTZ. O fármaco inibiu a atividade hexocinásica de maneira dependente da dose, produzindo efeitos mais significativos sobre as linhagens tumorais do que sobre a linhagem controle (**Figura 15**). Mesmo na concentração de 100 μM , o CTZ inibiu somente em 45% a atividade da HK na linhagem MCF10A, enquanto que nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 a inibição, nesta mesma concentração de CTZ, foi de 90% e 96%, respectivamente. No gráfico, os valores obtidos para 75 e 100 μM de CTZ são diferentes estatisticamente do controle na ausência do fármaco. Para a linhagem MDA-MB-231, a concentração de 50 μM de CTZ já apresenta diferenças significativas ($p < 0.05$).

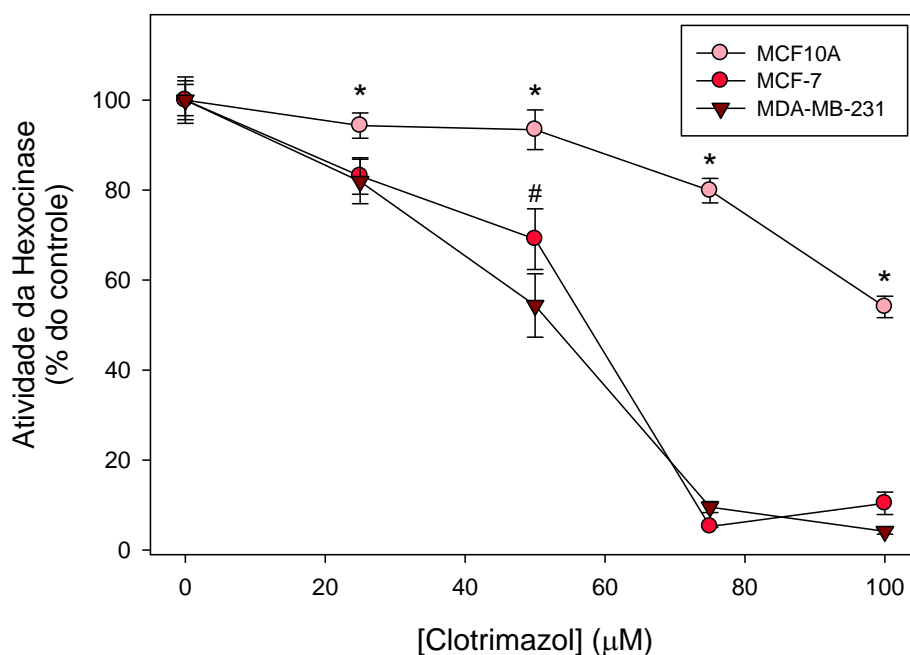


Figura 15 - Atividade hexocinásica das linhagens de mama MCF10A, MCF-7 e MDA-MB-231 tratadas com CTZ. A atividade da enzima HK foi avaliada como descrito em Material e Métodos através do ensaio espectrofotométrico. Dados representam a média \pm erro-padrão de no mínimo 6 experimentos ($n \geq 6$). * $p < 0.05$ comparando-se com as linhagens tumorais nas mesmas concentrações do fármaco. # $p < 0.05$, comparando-se MCF-7 e MDA-MB-231 em 50 μM de CTZ.

A PFK-1 é a terceira enzima do fluxo glicolítico e a segunda enzima regulatória, tendo sua atividade relacionada com a atividade de toda a via. Em 2005, Meira e colaboradores mostraram que o CTZ induz alterações morfológicas e funcionais na MCF-7, de maneira dependente do tempo e da dose, exibindo um IC_{50} de 88,6 μM e $t_{0.5}$ de 89,7 minutos. Essas mudanças ocorreram paralelamente ao desligamento da PFK-1 e da aldolase do citoesqueleto, que por fim, promoveram uma diminuição da viabilidade celular (MEIRA et al., 2005). No presente estudo, nós avaliamos o efeito de duas concentrações do CTZ (50 e 75 μM) sobre a atividade fosfofrutocinásica das linhagens celulares de mama. Nossos resultados mostram que, assim como foi observado para a HK, o CTZ promoveu uma inibição da atividade da

PFK-1 de maneira dependente da dose e com maior especificidade para as linhagens tumorais (**Figura 16**).

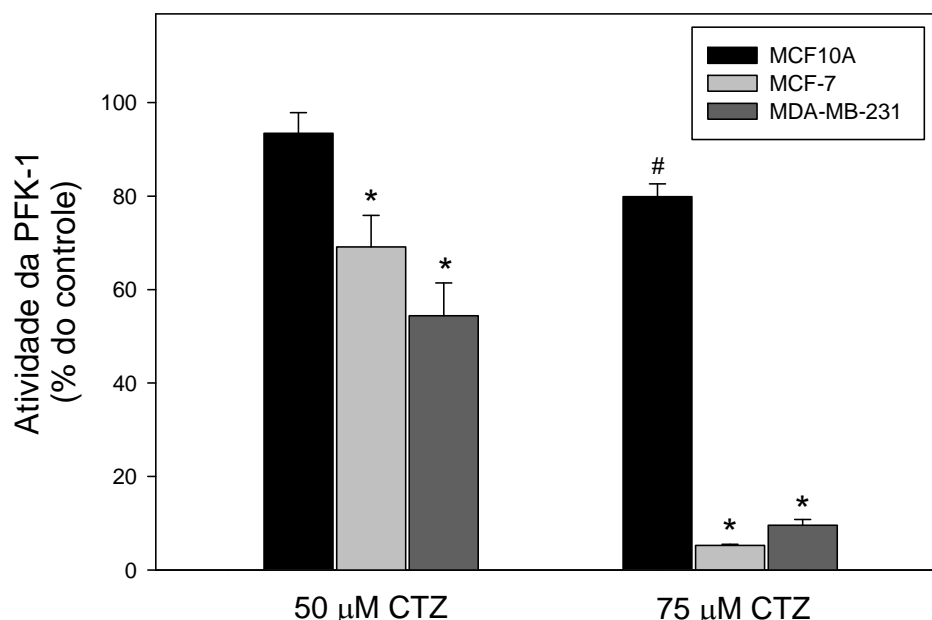


Figura 16 – Efeito do CTZ sobre a atividade fosfofrutocinásica das linhagens de mama humana. A atividade da PFK-1 foi avaliada como descrito em Material e Métodos através do ensaio espectrofotométrico. Dados representam a média \pm erro-padrão de no mínimo 6 experimentos ($n \geq 6$). # $p < 0.05$, comparando-se a atividade da PFK-1 na linhagem MCF10A com seu controle, na ausência do fármaco. * $p < 0.05$, comparando-se com o controle, na ausência do fármaco.

A última enzima da via glicolítica é a piruvato cinase (PK). Até o momento, não há relatos na literatura que descrevam qualquer ação do CTZ sobre esta enzima. Assim, testamos se este fármaco seria capaz de promover algum efeito modulador sobre a atividade da PK nas linhagens utilizadas neste estudo. Na **Figura 17**, observamos que o CTZ promoveu um decréscimo da atividade da enzima em todas as linhagens testadas de maneira dependente da dose. Mais uma vez, o CTZ apresenta-se mais eficaz em inibir a atividade catalítica de enzimas glicolíticas chaves em linhagens tumorais do que na linhagem não tumorigênica. Na concentração de 50 μM de CTZ, as percentagens de inibição são de aproximadamente 58% para as linhagens

MCF10A e MCF-7 e de 80% para a linhagem MDA-MB-231. Em concentrações acima desta, o fármaco promoveu 80% de inibição da atividade piruvato cinásica nas células MCF10A e 100% de inibição nas linhagens tumorais.

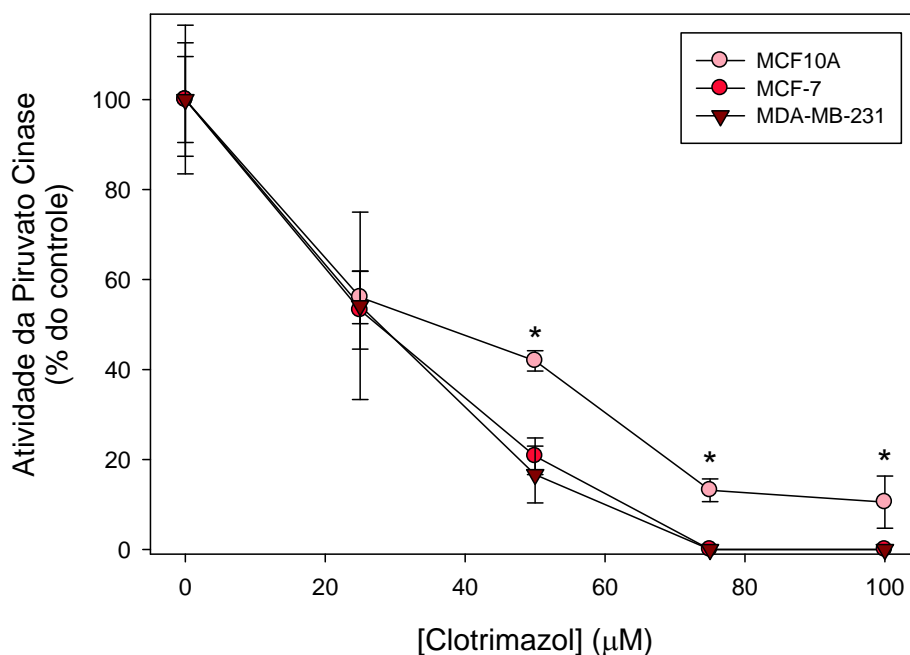


Figura 17 - Atividade da piruvato cinase nas linhagens MCF10A, MCF-7 e MDA-MB-231 após tratamento com CTZ. A atividade da enzima foi avaliada como descrito em Material e Métodos através do ensaio espectrofotométrico. Dados representam a média \pm erro-padrão de no mínimo 6 experimentos ($n \geq 6$).) * $p < 0.05$, comparando-se a linhagem normal com as tumorais, nas mesmas concentrações do fármaco. Todos os pontos são diferentes do controle, na ausência de CTZ ($p < 0.05$).

4.2.4 Determinação da atividade da via das pentoses fosfato

Após a entrada da glicose na célula, esta será convertida, pela HK, em glicose 6-fosfato que poderá destinar-se para a via das pentoses fosfato (PPP). O aumento no fluxo da PPP está diretamente associado com a diminuição da apoptose devido a um aumento na geração de NADPH e, conseqüentemente, de glutathiona reduzida, os quais também promovem a remoção de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas células

(BENSAAD *et al.*, 2006). No intuito de analisar o desvio da glicose 6-fosfato da glicólise para a PPP, verificamos a atividade da glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH), que é a enzima responsável pela primeira reação irreversível da PPP. Semelhante ao observado para as enzimas da glicólise, o CTZ foi capaz de promover a inibição da PPP (**Figura 18**). O efeito inibitório do CTZ foi muito mais pronunciado nas linhagem tumorais do que na linhagem MCF10A em todas as concentrações testadas. A concentração de 75 μ M promoveu um efeito inibitório sobre a G6PDH da linhagem controle (em torno de 60%), enquanto que o efeito foi total para as células MCF-7 e MDA-MB-231. Estes resultados sugerem que a inibição da atividade glicolítica pelo CTZ é acompanhada pela inibição de todo o metabolismo celular, uma vez que nossos resultados mostram que há uma redução do metabolismo mitocondrial e do fluxo pela PPP nas linhagens tratadas com o fármaco. Estes resultados fornecem uma explicação para a redução no consumo de glicose, na produção de lactato e na geração de ATP celular.

4.2.5 Avaliação do efeito do CTZ sobre a viabilidade celular

Após investigarmos o efeito do CTZ sobre os parâmetros metabólicos, sobre a atividade das principais enzimas glicolíticas e da PPP, decidimos avaliar os efeitos deste fármaco sobre viabilidade celular. Para isso, avaliamos a atividade da lactato desidrogenase (LDH) presente no meio de cultura das células tratadas com CTZ. A LDH é uma enzima citoplasmática e sua presença no meio de cultura é indicativo de lise celular e, mais especificamente, de morte celular (RACHER *et al.*, 1989; SAAD *et al.*, 2006).

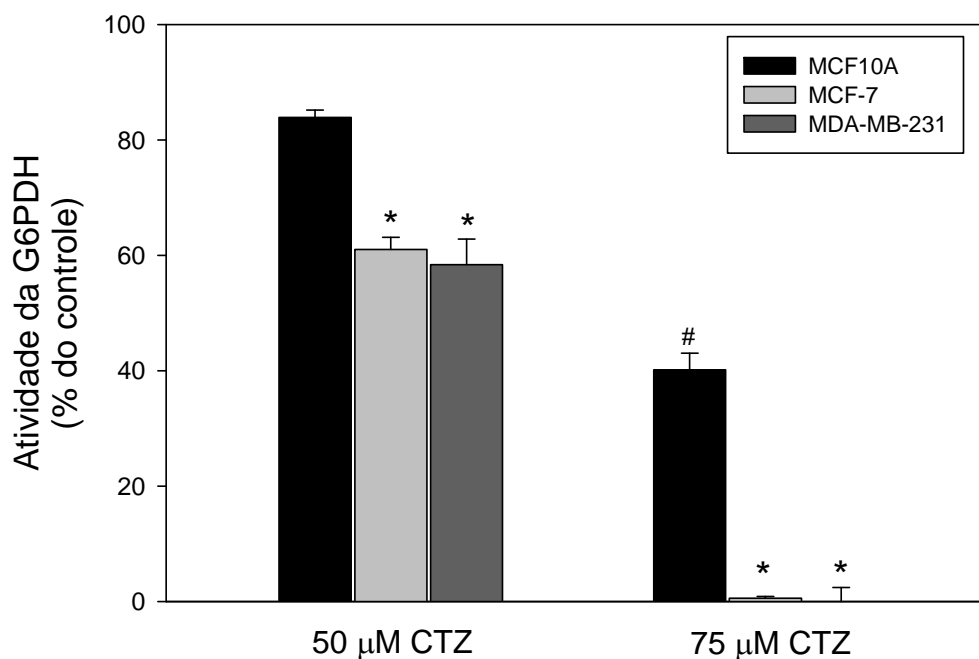


Figura 18 – Efeito do CTZ sobre a atividade da G6PDH nas linhagens mama humana. A atividade da enzima G6PDH foi avaliada como descrito em Material e Métodos através do ensaio espectrofotométrico. Dados representam a média \pm erro-padrão de no mínimo 6 experimentos ($n \geq 6$). * $p < 0.05$ comparando-se com a linhagem MCF10A, nas mesmas concentrações do fármaco. Todas as barras são diferentes do controle, na ausência de CTZ ($p < 0.05$).

Como pode ser observado na **Figura 19**, o CTZ aumentou a liberação de LDH para o meio de cultura somente nas linhagens tumorais. A linhagem MCF-10A não tem sua viabilidade alterada pelo fármaco. Por outro lado, a linhagem metastática MDA-MB-231 é significativamente sensível ao CTZ apresentando uma crescente perda de viabilidade a partir da concentração de 50 μM . A MCF-7, por sua vez, tem sua viabilidade moderadamente afetada pelo fármaco, apresentando perda da viabilidade somente em 75 μM de CTZ.

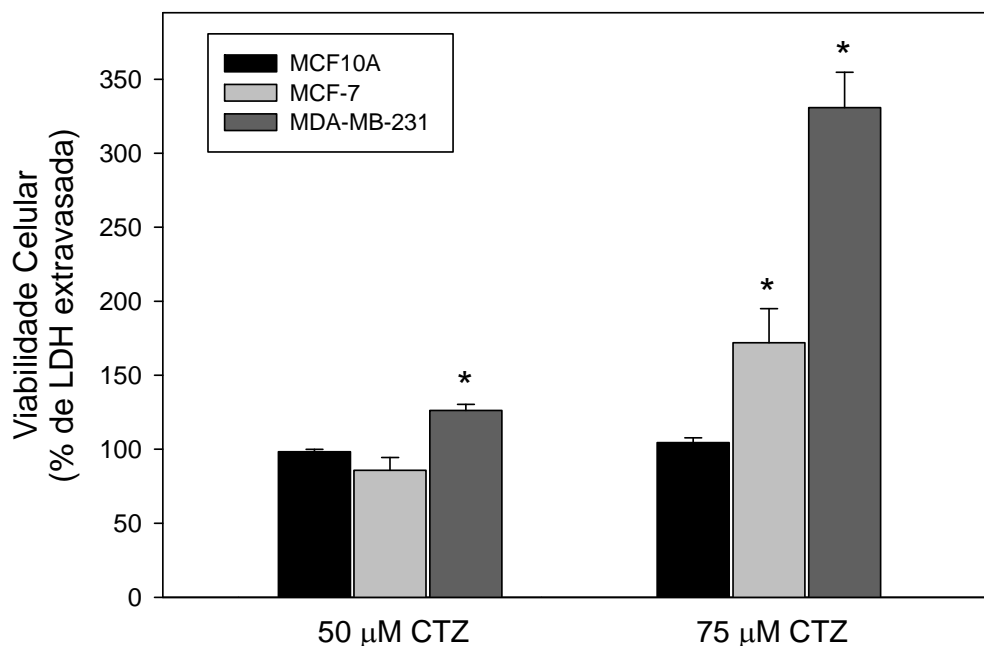


Figura 19 - Atividade da LDH extravasada nas linhagens de mama tratadas com CTZ. A atividade da LDH presente no meio de cultura foi avaliada como descrito em Material e Métodos através do ensaio espectrofotométrico. Dados representam a média \pm erro-padrão de no mínimo 4 experimentos ($n \geq 4$). * $p < 0.05$ comparando-se com o controle, na ausência do fármaco.

4.2.6 Avaliação do efeito do CTZ na migração e invasão celular

Os tumores são caracterizados por alterações metabólicas específicas provenientes de um sinal metabólico que gera uma transformação maligna em diferentes estágios celulares. O parâmetro dessas alterações metabólicas é a degradação anaeróbica da glicose e a transformação desta em lactato que vai resultar em uma proteção imunológica das células tumorais (LANGBEIN *et al.*, 2008). Esse aumento de lactato extravasado promove a degradação da matriz extracelular e conseqüentemente a invasão e metástase (RAGHUNAND *et al.*, 2004; GILLIES *et al.*, 2002).

Uma das principais características do tumor de mama é a capacidade dessas células em tornarem-se invasivas e metastáticas (ZHANG *et al.*, 2010). Para que

ocorra a invasividade em primeiro lugar a célula precisa se desprender do contato célula-célula e célula-membrana. Posteriormente, as células produzem proteases que vão digerir a membrana basal da matriz extracelular; promovem a produção de uma nova membrana extracelular e a transformação mesenquimal (SEMENZA, 2003), fazendo com que a célula atravesse a membrana basal, e permitindo que, em lesões pré-malignas, essa membrana permaneça intacta (GATENBY e GILLIES, 2004). Buscando avaliar se o CTZ seria capaz de impedir as células de tornarem-se invasivas, realizamos os ensaios de migração e invasão celular.

Para avaliar a capacidade migratória das linhagens celulares utilizamos um ensaio de *wound-healing*, descrito em detalhes em Material e Métodos. Primeiramente, capturamos as imagens das células não tratadas ou tratadas com 50 μM de CTZ imediatamente após o dano na monocamada celular ser produzido, o qual foi acompanhado por até 24 h. A **Figura 20** apresenta as imagens obtidas nos tempos de 0, 6 e 12 h (topo: ensaio na ausência do fármaco; base: ensaio na presença de 50 μM de CTZ). Posteriormente, a distância entre as margens do *wound-healing* foram quantificadas, em μm , e os dados foram plotados num gráfico de barras (**Figura 21**). A partir do ensaio pode-se perceber que há uma clara diferença entre as capacidades migratórias das linhagens celulares de mama testadas. A linhagem conhecida mais agressiva (MDA-MB-231), migra numa taxa muito superior àquela da MCF10A ($15,7 \pm 1,4 \mu\text{m/h}$ versus $7,2 \pm 0,7 \mu\text{m/h}$). A linhagem MCF-7 apresenta uma significativa capacidade migratória quando comparada ao controle, mas inferior a das células metastáticas ($11,1 \pm 1,05 \mu\text{m/h}$). Quando avaliamos o efeito do CTZ sobre este parâmetro, observamos que 50 μM do fármaco é capaz de reduzir significativamente a taxa de migração celular somente das linhagens celulares tumorais. Mais uma vez, o efeito observado foi mais expressivo nas células MDA-MB-231 (aproximadamente, 64% de inibição; $10,1 \pm 1,0 \mu\text{m/h}$).

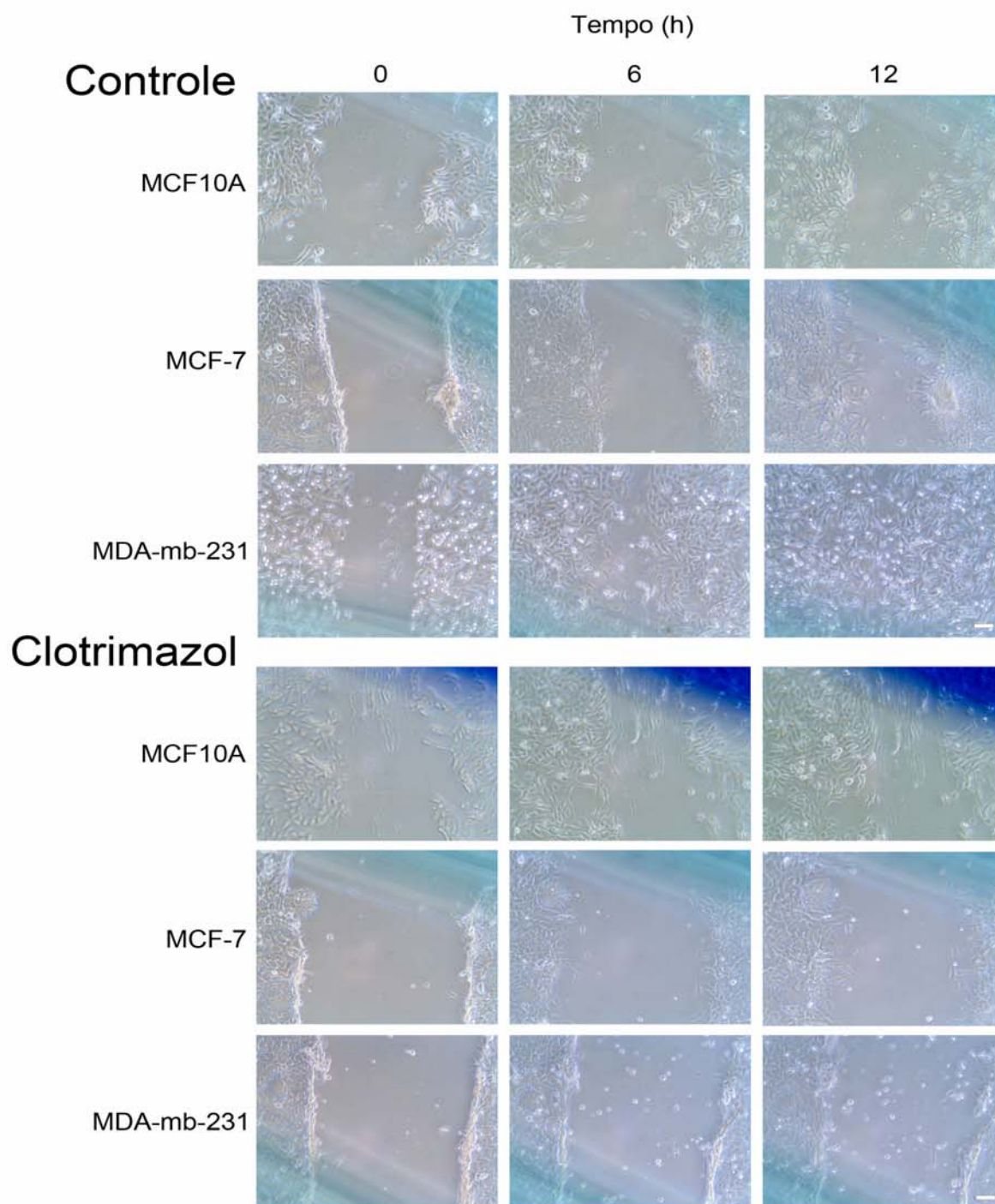


Figura 20 – Teste de migração celular das linhagens de mama humana tratada com CTZ. A migração das células de mama humana na ausência ou presença de 50 μM de CTZ nos tempos 0, 6 e 12 h foi avaliada como descrito em Material e Métodos. A figura apresenta imagens representativas de 2 ensaios de *wound-healing* realizados em duplicata.

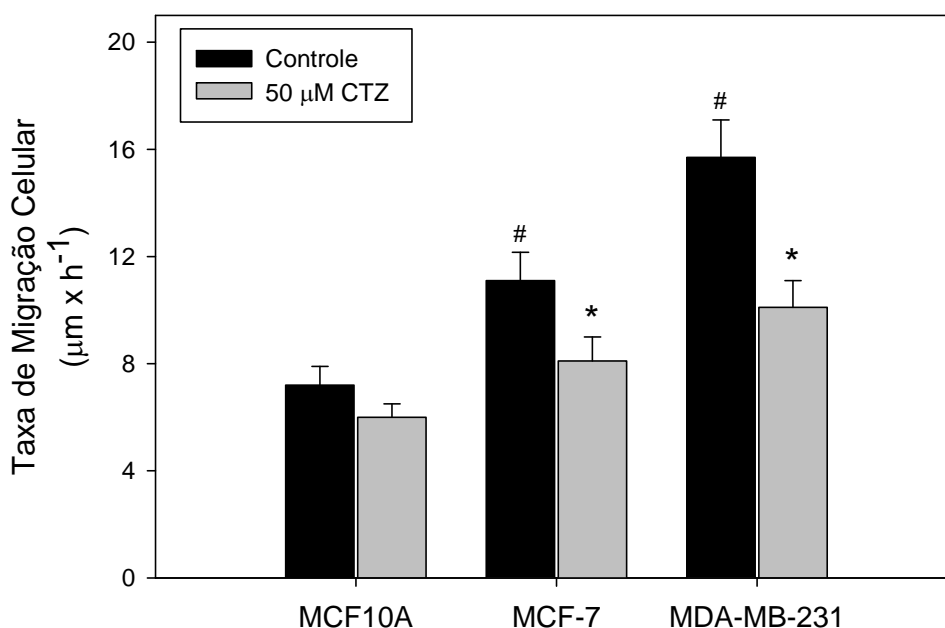


Figura 21 – Taxa de migração celular das linhagens de mama humana tratada ou não com CTZ. A migração das células de mama humana na ausência ou presença de 50 µM CTZ foi avaliada e quantificada conforme descrito em Material e Métodos. O gráfico apresenta os valores da taxa de migração quantificados a partir das imagens capturas e analisadas pelo *software* BELView. As barras representam a média ± erro padrão de no mínimo 2 experimentos ($n \geq 2$), realizados em duplicata. [#] $p < 0.05$ comparando-se com a linhagem controle, sempre na ausência do fármaco. ^{*} $p < 0.05$ comparando-se cada linhagem individualmente, na ausência e presença de CTZ.

Por fim, avaliamos os efeitos do CTZ sobre a capacidade metastática das linhagens até aqui estudadas. Para isso, realizamos um ensaio de invasão celular, também conhecido como *Transwell assay*, utilizando uma membrana de tereftalato de polietileno (PET) com 8 µm de poro, onde as células são estimuladas a atravessar essa membrana pela utilização de um quimoatrator na base da câmara. Podemos observar que novamente o CTZ não promoveu efeitos sobre a linhagem controle (**Figura 22**). Entretanto, 50 µM do fármaco foi capaz de reduzir a invasão celular das linhagens

tumorais em, aproximadamente, 40% e 50% para as células MCF-7 e MDA-MB-231, respectivamente.

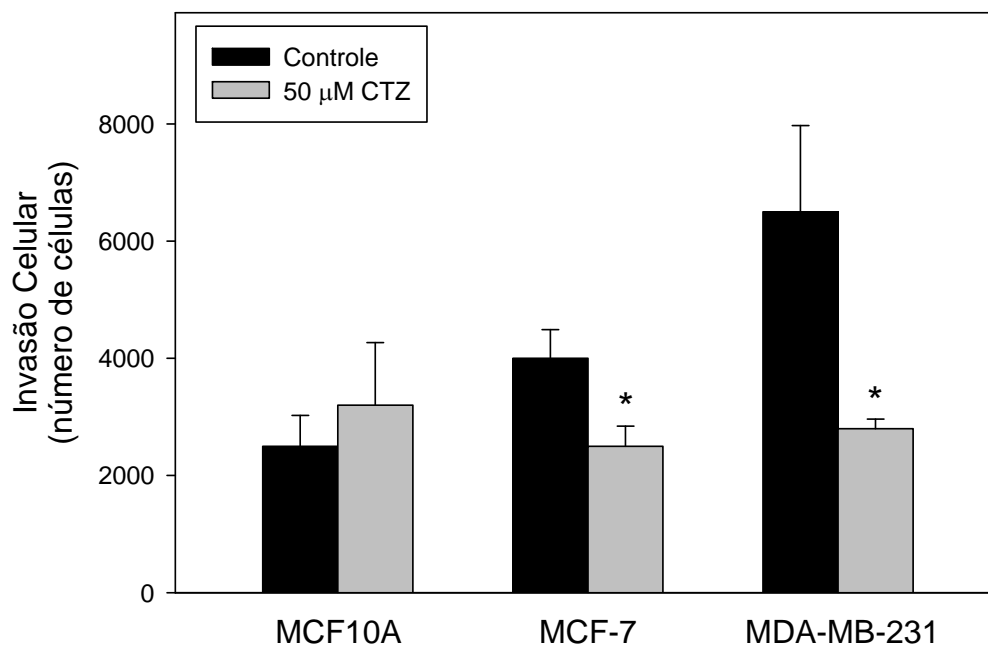


Figura 22 – Teste de invasão celular nas linhagens de mama humana tratada ou não com 50 μ M de CTZ. A invasão celular foi avaliada como descrito em Material e Métodos através do *Transwell assay*. As barras representam a média \pm erro padrão de 3 experimentos independentes ($n = 3$). * $p < 0.05$ comparando-se cada linhagem individualmente, na ausência e presença do fármaco.

5 DISCUSSÃO

Uma curiosa, mas comum, propriedade dos cânceres invasivos é o metabolismo alterado de glicose. Adicionalmente, a glicólise aeróbica aumentada é somente observada em cânceres (SEMENZA, 2001), que além de ser a principal via de degradação de carboidratos, produz intermediários biossintéticos para outras vias, alimentando as vias de biossíntese de ácidos graxos, aminoácidos e colesterol, entre outras (EL-BACHA e SOLA-PENNA, 2003b). 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.

Baseado nos dados descritos acima, esta dissertação teve como objetivo avaliar o papel de um fármaco, o clotrimazol, sobre o metabolismo energético em linhagens de mama humana. Assim, foram utilizadas três linhagens com diferentes fenótipos: MCF10A, uma linhagem não tumorigênica; MCF-7, uma linhagem de carcinoma não metastática; e MDA-MB-231, uma linhagem com a mesma origem, porém metastática.

O clotrimazol é um derivado imidazolinico, utilizado na clínica com antifúngico. Entretanto, nos últimos anos, este fármaco tem sido estudado visando sua utilização como um agente antineoplásico com ação sobre o metabolismo da glicose. Assim, um dos mecanismos de ação antineoplásica deste fármaco poderia ser decorrente de sua atividade antagonista de calmodulina (AKTAS *et al.*, 1998; PENSO e BEITNER, 2002a; 2002b; MEIRA *et al.*, 2005). De fato, a calmodulina é um sinalizador intracelular que está diretamente relacionado à ativação da PFK-1 (MARINHO-CARVALHO *et al.*, 2009) e do fluxo glicolítico (BEITNER *et al.*, 1991).

Num segundo mecanismo proposto, o clotrimazol também seria capaz de deslocar enzimas glicolíticas do citoesqueleto (mais especificamente a PFK-1) (MEIRA *et al.*, 2005) e induzir o desligamento da hexocinase da mitocôndria (outro mecanismo pró-apoptótico) (PENSO e BEITNER, 1998; PASTORINO *et al.*, 2002). Recentemente, nós demonstramos também a capacidade do clotrimazol em agir diretamente na enzima PFK-1 alterando sua estrutura quaternária (ZANCAN *et al.*, 2007a; MARCONDES *et al.*, 2010), uma propriedade importante para a regulação da enzima e sua associação com o citoesqueleto (ZANCAN *et al.*, 2007b; 2008).

Paralelamente aos estudos sobre os efeitos do clotrimazol sobre a atividade das principais enzimas glicolíticas, viabilidade e potencial metastático das linhagens de mama humana, nós realizamos um estudo visando a caracterização destas linhagens quanto aos parâmetros acima descritos. Este trabalho resultou numa publicação, cujos resultados suportam a hipótese do efeito Warburg demonstrando que há, nas linhagens celulares MCF10A, MCF-7 e MDA-MB-231, uma correlação positiva entre a eficiência glicolítica e a agressividade celular nesse modelo testado (ZANCAN *et al.*, 2010).

Adicionalmente, os resultados envolvendo a ação do clotrimazol apresentados nesta dissertação ratificam os possíveis mecanismos de ação descritos para o mesmo e acrescentam novos papéis para este fármaco no controle das neoplasias. Os resultados apresentados na Figura 11 mostram que o clotrimazol foi capaz de reduzir o consumo de glicose somente na linhagem metastática MDA-MB-231. Paralelamente, o fármaco promoveu uma redução na produção de lactato pelas linhagens tumorais numa concentração que não promoveu alteração do consumo de glicose das mesmas (50 μ M), sem alterar este parâmetro metabólico na linhagem controle (Figura 12). Em conjunto, os dados apresentados aqui demonstram: (1) há uma diminuição no consumo de glicose com um aumento na produção de lactato somente nas linhagens tumorais, demonstrando uma alteração do metabolismo de glicose (Figura 1, painéis A e B – seção 4.1 dos Resultados); (2) o clotrimazol é capaz de reverter a alta taxa glicolítica apresentada pelas células.

Uma vez que o metabolismo de glicose está diretamente relacionado com o status energético da célula, avaliamos os efeitos do clotrimazol sobre o metabolismo mitocondrial e sobre a geração de ATP nas linhagens estudadas. Conforme

demonstrado nas Figuras 13 e 14, o clotrimazol foi capaz de promover uma redução na atividade redutora mitocondrial em concentrações elevadas do fármaco e, promoveu uma redução, dependente da dose, no conteúdo de ATP celular, a qual acompanha o fenótipo maligno das linhagens. Contudo, o conteúdo de ATP nas células MCF10A não foi reduzido pelo fármaco.

Estes resultados, em conjunto, demonstram o potencial do fármaco em agir de maneira específica, promovendo efeitos significativos sobre linhagens metastáticas mais do que sobre a linhagem não metastática (MCF-7) e, principalmente, sobre a não tumoral (MCF10A). Além disso, as últimas observações reforçam a capacidade do clotrimazol de agir como um agente antineoplásico específico para neoplasias agressivas, uma vez que nestas células o fármaco reduziu, mais eficientemente do que em outras linhagens estudadas, o consumo de glicose, a produção de lactato e, conseqüentemente, a geração de ATP sem atingir o metabolismo mitocondrial de modo específico.

Buscando correlacionar a eficiência glicolítica das linhagens com a atividade das enzimas que regulam a glicólise e avaliar o efeito do clotrimazol sobre esta via, investigamos a atividade basal (ou seja, sem tratamentos ou intervenções físicoquímicas) das enzimas HK, PFK-1 e PK e investigamos, também, o efeito de diferentes concentrações de clotrimazol sobre suas atividades. Quando comparamos a atividade destas enzimas entre as linhagens, observamos que há somente uma diferença na atividade hexocinásica, a qual foi maior nas células tumorigênicas do que na MCF10A (Figura 2, painel A, seção 4.1 dos Resultados). Por outro lado, os resultados das Figuras 15, 16 e 17 mostraram que, de fato, o clotrimazol promove uma inibição da atividade das enzimas glicolíticas. O efeito observado foi dependente da dose e do fenótipo celular, onde, de modo geral, os efeitos do clotrimazol sobre as enzimas chave glicolíticas foi sendo perdido conforme a células tornava-se mais agressiva (MCF10A < MCF-7 < MDA-MB-231). A inibição máxima atingida para as linhagens tumorais ocorreu na concentração de 75 μ M do fármaco. A HK catalisa a conversão de glicose em glicose-6-fosfato, o qual é o primeiro passo comprometido na glicólise (ROBEY et al., 2005). Contudo, esta 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). Nossos resultados

demonstram que o clotrimazol foi capaz de inibir a HK promovendo efeitos específicos: as linhagens mais sensíveis à inibição são as linhagens tumorais, especialmente a metastática. A linhagem MCF10A apresenta somente 46% de inibição na concentração mais elevada de clotrimazol (100 μ M).

O mesmo perfil de resposta é observado quando avaliamos o efeito do fármaco sobre a atividade fosfofrutocinásica (Figura 16). Meira e cols. (2005) demonstraram o efeito do clotrimazol em linhagens MCF-7 indicando que a diminuição da viabilidade celular observada estava diretamente correlacionada com o fato deste fármaco produzir uma alteração da localização celular da PFK-1, gerando, assim, uma inibição da mesma (MEIRA *et al.*, 2005). Posteriormente, Zancan e cols. (2007b) evidenciaram que o clotrimazol é capaz de produzir efeitos diretos sobre a PFK-1 e não somente sobre sua associação ao citoesqueleto (ZANCAN *et al.*, 2007b). No presente trabalho é interessante observar que, mais uma vez, o clotrimazol apresentou efeitos mais agressivos sobre as linhagens tumorais quando comparados com os resultados obtidos para a linhagem controle não tumorigênica. Uma outra possível explicação para a alteração metabólica nas linhagens tumorais tratadas com clotrimazol seria as diferentes isoformas das enzimas glicolíticas presentes nas linhagens. Na Figura 3 do artigo adicionado na seção 4.2 de Resultados, mais especificamente no painel D podemos verificar a presença de diferentes isoformas da enzima PFK-1 nas linhagens de mama humana, onde a linhagem normal apresenta as 3 diferentes isoformas da PFK-1 (M, L e P), enquanto as tumorais apresentam um aumento da isoforma PFK-L que é a isoforma que está associada com o aumento da agressividade da linhagem tumoral. Por último, quando avaliamos os resultados obtidos para a PK, observamos que há uma redução da atividade desta enzima, a qual é dependente da dose e do fenótipo celular Figura 17.

Ao discutirmos estes resultados obtidos para o efeito do fármacos sobre a atividade das enzimas que regulam a glicose e, frente aos dados obtidos quando avaliou-se a expressão de diferentes isoformas da PFK-1 nas linhagens estudadas, torna-se necessários sugerir que nossos resultados podem estar relacionados com o padrão de expressão de diferentes isoformas da HK, PFK-1 e PK. Os efeitos mais proeminentes do fármaco sobre as linhagens tumorais podem estar diretamente relacionados com a(s) isoforma(s) da enzima expressas nas diferentes linhagens, já

que cada isoforma pode responder de maneira particular a um estímulo. Assim, será necessária uma investigação mais completa de todos os parâmetros que envolvem a atividade das mesmas (genéticos e cinéticos) para o entendimento do efeito do clotrimazol sobre a glicólise.

Uma vez que todas as enzimas responsáveis pela taxa glicolítica apresentam-se inibidas pelo clotrimazol, nosso próximo objetivo foi avaliar se a glicose captada pelas células estaria sendo desviada para a via das pentoses fosfato. Parte da glicose 6-fosfato celular é, normalmente, metabolizada pela PPP. A PPP é uma importante via metabólica celular, pois permite a oxidação total da glicose em uma série de reações independentes da via glicolítica; é uma fonte de pentoses para a síntese dos ácidos nucleicos; produz, em uma etapa oxidativa, o NADPH extramitocondrial necessário para a síntese dos lipídios e para o balanço redox; e seus produtos podem ser isomerizados a intermediários da glicólise. Os resultados apresentados na Figura 18 mostraram que o clotrimazol é capaz de inibir de maneira dependente da dose e do fenótipo maligno a G6PDH, primeira enzima limitante da PPP. A importância deste resultado vem do fato que a inibição desta enzima diminui drasticamente a proliferação celular maligna, aumenta a apoptose e suprime os efeitos de fatores de crescimento tumoral (MAZUREK *et al.*, 1997).

Baseados nestes últimos dados, buscamos avaliar se o clotrimazol estaria promovendo perda de viabilidade celular das linhagens de mama humana. Dados da literatura apresentam que clotrimazol diminui a viabilidade de linhagens celulares derivadas do câncer de mama, MCF-7 (MEIRA *et al.*, 2005), de células CT-26 de adenocarcinoma do colo e células de Lewis de carcinoma do pulmão (PENSO e BEITNER, 2002a; PENSO e BEITNER 2002b), e de células B16 de melanoma (GLASS-MARMOR *et al.*, 1996; GLASS-MARMOR e BEITNER, 1997). Contudo, uma vez que a maior parte dos nossos resultados demonstram um efeito do clotrimazol dependente do fenótipo celular, nosso objetivo foi avaliar se este parâmetro também responderia da mesma maneira. De fato, como observado na Figura 19, o fármaco não foi capaz de promover a perda da viabilidade da linhagem MCF10A em todas as concentrações testadas. Por outro lado, o extravasamento da LDH, um marcador da perda da viabilidade celular, foi 1,5 e 3,5 vezes maior para as linhagens MCF-7 e MDA-MB-231, respectivamente.

Embora o fenótipo glicolítico pareça ser o resultado da adaptação celular as condições ambientais nas lesões pré-malignas, a sua persistência nos cânceres primário e metastático, mesmo em condições de normóxia, indica que este continua representando uma forte vantagem proliferativa e para a sobrevivência celular (GATENBY e GILLIES, 2004). De fato, um aumento persistente e constitutivo da glicólise resulta em acidificação aguda e crônica do ambiente tumoral, onde o pH extracelular nos tumores humanos e animais é consistentemente ácido e pode atingir valores em torno de 6,0 (SEMENZA, 2003). Esse aumento da acidose tecidual é extremamente mais tóxico para o tecido parenquimal normal quando comparado com o tecido tumoral (GILLIES *et al.*, 2008).

Para avaliar o potencial metastático das linhagens celulares MCF10A, MCF-7 e MDA-MB-231, estudamos suas capacidades de migração e invasão na ausência e na presença do clotrimazol. Na Figuras 20, 21 e 22, observamos que o clotrimazol foi capaz de reduzir a migração e a invasão celular somente nas linhagens tumorais e, mais eficientemente, na linhagem mais agressiva, sugerindo que ele possa reduzir possíveis metástases.

Por fim, com base nos resultados apresentados nessa dissertação podemos concluir que o clotrimazol apresenta-se como um potencial agente antineoplásico com moderada seletividade para células malignas. A partir deste estudo objetivamos ampliar as possibilidades de interferir no aumento da glicólise aeróbica característica de tumores e ratificar o uso do clotrimazol como potencial quimioterápico para o tratamento de tumores.

6 CONCLUSÕES

- A relação entre a produção de lactato e o consumo de glicose (eficiência glicolítica) nas linhagens celulares de mama humana MCF10A, MCF-7 e MDA-MB-231 aumenta conforme o grau de malignidade da célula;
- Por outro lado, o conteúdo de ATP celular e a atividade redutora mitocondrial apresentam-se reduzidos conforme o grau de malignidade celular;
- A eficiência glicolítica, primordial para a sobrevivência de células tumorais, depende preferencialmente da expressão da isoforma L da PFK-1;
- O clotrimazol altera os parâmetros metabólicos das linhagens MCF10A, MCF-7 e MDA-MB-231, diminuindo o consumo de glicose, a produção de lactato e o conteúdo de ATP celular somente nas linhagens tumorais;
- O clotrimazol diminui a atividade redutora mitocondrial somente quando altas concentrações do fármaco são utilizadas, apresentando efeitos mais potentes sobre a linhagem tumoral mais agressiva;
- Este fármaco foi capaz de inibir as principais enzimas responsáveis pelo metabolismo glicolítico (HK, PFK-1 e PK) e inibiu o fluxo através da PPP pela inibição da G6PDH, de maneira dependente da dose e do fenótipo celular (MCF10A < MCF-7 < MDA-MB-231);
- O clotrimazol reduziu a migração celular e a invasão celular somente nas linhagens tumorais e mais eficientemente na linhagem metastática ;
- O fármaco induz a morte celular, uma vez que promove a perda da viabilidade celular, especialmente em células mais agressivas.

Com isso, acreditamos que o estudo bioquímico e farmacológico da glicólise aeróbica consolidará este aspecto metabólico dos tumores como um importante alvo para a ação de xenobióticos. Por outro lado, acreditamos que através dos resultados desta dissertação poderemos contribuir para a definitiva utilização do clotrimazol, em baixas dosagens, como agentes antitumorais.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKTAS, S.; DEMIRAL, H.; BILGI, S.; CAGLAR, T.; CALPUR, O.U. **Patellar metastasis from a lung epidermoid carcinoma.** Yonsei Medical Journal, v.39, n 5, p.474-477, (1998).

ALVES, G.G.; MARINHO-CARVALHO, M.M.; ATELLA, G.C.; SILVA-NETTO, M.A.; SOLA-PENNA, M. **Allosteric regulation of 6-phosphofructo-1-kinase activity of fat body and flight muscle from the bloodsucking bug *Rhodnius prolixus*.** Annals. of the Brazilian Academy of Science, v.79, n 1, p.53-62, (2007).

ALVES, G.G.; SOLA-PENNA, M. **Epinephrine modulates cellular distribution of muscle phosphofructokinase.** Molecular Genetics and Metabolism, v.78, p.302-306, (2003).

ATSUMI, T.; CHESNEY, J.; METZ, C.; LENG, L.; DONNELLY, S.; MAKITA, Z.; MITCHELL, T.; BUCALA, R. **High expression of inducible 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFK-2; PFKFB3) in human cancers.** Cancer Research, v. 62, p.5881–5887, (2002).

BALINSKY, D.; PLATZ, C.E.; LEWIS, J.W. **Isozyme patterns of normal, benign, and malignant human breast tissues.** Cancer Research, v.43, p.5895-901, (1983).

BECKNER, M.E.; RACKE, M.L.; LIOTTA, L.A.; SCHIFFMANN, E. **Glycolysis as primary energy source in tumor cell chemotaxis.** Journal of the National Cancer Institute, v.82, p.1836–1840, (1990).

BEITNER, R.; CHEN-ZION, M.; SOFER-BASSUKEVITZ, Y.; OSTER, Y.; BEN-PORAT, H.; MORGENSTERN, H. **Therapeutic and prophylactic treatment of skin burns with several calmodulin antagonists.** General Pharmacology, v. 20, p.165–173, (1989).

BEITNER, R.; CHEN-ZION, M.; SOFER-BASSUKEVITZ, Y. **Effect of the calmodulin antagonist CGS 9343B on skin burns.** *General Pharmacology*, v. 22, p.67–72, (1991).

BENSAAD, K.; TSURUTA, A.; SELAK, M.A.; VIDAL, M.N.; NAKANO, K.; BARTRONS, R.; GOTTLIEB, E.; VOUSDEN, K.H. **TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis.** *Cell*, v. 126, p.107-120, (2006).

BERGOLD, A.M.; GEORGIADIS, S. **New antifungic drugs: a review.** *Visão Acadêmica, Curitiba*, v. 5, n. 2, p.159-172, (2004).

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

BRDICZKA, D. **Contact sites between mitochondrial envelope membranes. Structure and function in energy and protein-transfer.** *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1071, p.291–312, (1991).

BRUGNARA, C.; ARMSBY, C.C.; SAKAMOTO, M.; RIFAIN, N.; ALPER, S.L.; PLATT, O. **Oral-administration of clotrimazole and blockade of human erythrocyte Ca²⁺-activated K⁺ channel: the imidazole ring is not required for inhibitory activity.** *The Journal Pharmacology and Experimental Therapeutic*, v. 273, p.266–272, (1995).

BÜCHEL, K.H.; DRABER, W.; REGEL, E.; PLEMPEL, M. **Synthesis and properties of clotrimazole and other antimycotic 1-triphenylmethylimidazoles** *Arzneimittelforschung*. v. 22, n.8, p.1260-1272, (1972).

BURGESS, M.A.; BODEY, G.P. **Clotrimazole (Bay b 5097): in vitro and clinical pharmacological studies.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 2, p.423–426, (1972).

BUSTAMANTE, E.; PEDERSEN, P.L. **High aerobic glycolysis of rat hepatoma cells in culture: role of mitochondrial hexokinase.** Proceedings of the National Academy of Science, v. 74, p.3735–3739, (1977).

CHAN, W. S.; LIM, J. C.; KE, G.; NG, P.C.; LEE, I.; HUNZIKER, W.; QI, Z.; HONG, W. **A Role for TAZ in migration, invasion, and tumorigenesis of breast cancer cells.** Cancer Research, v. 68, p.2592-2598, (2008).

CHEN, T.; WONG, Y.; ZHENG, W.; LIU, J. **Caspase-and p53-dependent apoptosis in breast carcinoma cells induced by a synthetic selenadiazole derivative.** Chemico Biological Interaction, v. 180, p.54-60, (2009).

CHIARA, F.; CASTELLARO, D.; MARIN, O.; PETRONILLI, V.; BRUSILOW, W.S.; JUHASZOVA, M.; SOLLOTT, S.J.; FORTE, M.; BERNARDI, P.; RASOLA, A. **Hexokinase II detachment from mitochondria triggers apoptosis through the permeability transition pore independent of voltage-dependent anion channels.** PLoS One. v. 3, p.1-11, (2008).

COLLIER, A.C.; PRITSOS, C.A. **The mitochondrial uncoupler dicumarol disrupts the MTT assay.** Biochemistry Pharmacology, v. 66, p.281-287, (2003).

CONISH-BOWDEN, A.; CARDENAS, M.L. **Hexokinase and Glucokinase in Liver Metabolism.** Trends in Biochemical Sciences, v. 16, p.281-282, (1991).

DANG, C.V.; LEWIS, B.C.; DOLDE, C.; DANG, G.; SHIM, H. **Oncogenes in tumor metabolism, tumorigenesis, and apoptosis.** Journal of Bioenergetics and Biomembranes, v. 29, p.345–354, (1997).

DE BERARDINIS, R.J.; LUM, J.J.; HATZIVASSILIOU, G.; THOMPSON, C.B. **The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation.** Cell Metabolism, v. 7, p.11-20, (2008).

EL-BACHA, T.; FREITAS, M.S.; SOLA-PENNA, M. **Cellular distribution of phosphofructokinase activity and implications to metabolic regulation in human breast cancer.** *Molecular Genetics and Metabolism*, v. 79, p.294-299, (2003a).

EL-BACHA, T.; SOLA-PENNA, M. **Alterações no metabolismo de células neoplásicas. Em: Hormônios e Metabolismo: Integração e correlações clínicas,** Da Poian, A.T. e Carvalho-Alves, P.C. (eds), Atheneu, Rio de Janeiro, p.319-322, (2003b).

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

ETO, K.; SUGA, S.; WAKUI, M.; TSUBAMOTO, Y.; TERAUCHI, Y.; TAKA, J.; AIZAWA, S.; NODA, M.; KIMURA, S.; KASAI, H.; KADOWAKI, T. **NADH shuttle system regulates KATP channel dependent pathway and steps distal to cytosolic Ca²⁺ concentration elevation in glucose-induced insulin secretion,** *The Journal of Biological Chemistry*, v. 274, p.25386–25392, (1999).

FEARON, O. **Pyruvate into lactate and back: From the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells.** *Radiotherapy and Oncology*, p.1-5, (2009).

GATENBY, R.A.; SMALLBONE, K.; MAINI, P.K.; ROSE, F.; AVERILL, J.; NAGLE, R.B.; WORRALL, L.; GILLIES, R.J. **Cellular adaptations to hypoxia and acidosis during somatic evolution of breast cancer.** *British Journal of Cancer*, v. 97, p. 646 – 653, (2007).

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

GEORGIEV, V.S. **Membrane transporters and antifungal drug resistance.** *Current Drug Targets*, v, 1 n: 3, p.261-284, (2000).

GIETZEN, K. ADAMCZYK-ENGELMANN, P., WUTHRICH, A., KONSTANTINOVA, A., BADER, H. **Compound 48/80 is a selective and powerful inhibitor of calmodulinregulated functions.** *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 736, p. 109-118, (1983).

GILLIES, R.J. **In vivo molecular imaging.** *Journal of Cellular Biochemistry Supplement*, v. 39, p.231-238, (2002).

GILLIES, R.J.; ROBEY, I.; GATENBY R.A. **Causes and Consequences of Increase Glucose Metabolism of Cancers.** *The Journal of Nuclear Medicine*, v. 49, p.24-42, (2008).

GILMAN, A.G. **As bases farmacológicas da terapêutica.** 9 ed., (1995).

GLASS-MARMOR, L.; BEITNER, R. **Detachment of glycolytic enzymes from cytoskeleton of melanoma cells induced by calmodulin antagonists.** *European Journal of Pharmacology*, v. 328, n.2-3, p.241-248, (1997).

GLASS-MARMOR, L.; MORGENSTERN, H.; BEITNER, R. **Calmodulin antagonists decrease glucose 1,6-bisphosphate, fructose 1,6-bisphosphate, ATP and viability of melanoma cell.** *European Journal of Pharmacology*, v.313, n.3, p.265-271, (1996).

GONZÁLEZ, C.; URETA, T.; SÁNCHEZ, R.; NIEMEYER, H. **Multiple molecular forms of ATP:hexose 6-phosphotranseferase from rat liver.** *Biochemical and Biophysical Research*, v. 16, p.347–352, (1964).

GREINER, E.F.; GUPPY, M.; BRAND, K. **Glucose is essential for proliferation and the glycolytic enzyme induction that provokes a transition to glycolytic energy production.** *The Journal Biological Chemistry*, v. 269, p.31484–31490, (1994).

GROSSBARD, L.; SCHIMKE, R.T. **Multiple hexokinases of rat tissues. Purification and comparison of soluble forms.** The Journal of Biological Chemistry, v. 241, n: 15, p.3546-3560, (1966).

HEGEMANN, L., TOSO, S.M., LAHIJANI, K.I., WEBSTER, G.F., UITTO, J. **Direct interaction of antifungal azole-derivatives with calmodulin: a possible mechanism for their therapeutic activity.** The Journal of Investigative Dermatology, v. 100, n.3, p.343-346, (1993).

HILL, D.B.; SCHMIDT, J.; SHEDLOFSKY, S.I.; COHEN, D.A.; MCCLAIN, C.J. **In vitro tumor necrosis factor cytotoxicity in HEP G2 liver cells.** Hepatology, v. 24, p. 1114- 1119, (2005).

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

HSU, P.P., SABATINI, M.D. **Cancer cell metabolism Warburg and Beyond.** Cell, vol. 134, p.: 703-707, (2008).

INTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. COORDENAÇÃO DE PREVENÇÃO E VIGILÂNCIA DE CÂNCER, RIO DE JANEIRO, BRASIL **Estimativa 2010: Incidência de Câncer no Brasil.** Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/versaofinal.pdf>> Acessado em janeiro de 2010, (2010).

ISIDORO, A.; CASADO, E.; REDONDO, A.; ACEBO, P.; ESPINOSA, E.; ALONSO, A.M.; CEJAS, P.; HARDISSON, D.; FRESNO, V. J. A.; BELDA-INIESTA, C.; GONZALÉZ-BARÓN, M.; CUEZVA, J. M. **Breast carcinoma fulfill the Warburg hypothesis and provide metabolic markers of cancer prognosis.** Carcinogenesis, vol. 12, p.2095-2104, (2005).

JEMAL, A., SIEGEL, R., XU, J., WARD, E. **Cancer Statistics 2010**. American Cancer Society, v.60, (2010).

JESSANI, N.; HUMPHREY, M.; DONALD, M. W. H.; NIESSEN, S.; MASUDA, K.; GANGADHARAN, B.; YATES, J. R.; MULLER, B. M.; CRAVATT, B. F.; **Carcinoma and stromal enzymes activity profiles associated with breast cancer growth in vivo**. PNAS, v. 101, p.13756-13761, (2004).

JOSEPH, A.; MOKBEL, K. **Male breast cancer**. International Journal of Fertility and Womens Medicine, v. 49, p.198-199, (2004).

KASHIWAYA, Y.K.; SATO, K.; TSUCHIYA, N.; THOMAS, S.; FELL, D.A.; VEECH, R.L.; PASSONNEAU, J.V. **Control of glucose utilization in working perfused rat heart**. The Journal of Biological Chemistry, v. 269, p.25502–25514, (1994).

KEMP, R.G.; FOE, L.G. **Allosteric regulatory properties of muscle phosphofructokinase**. Molecular and Cellular Biochemistry, v. 57, p.147-154, (1983).

KHANA, F.H.; SENA, T.; MAITIA, A.K.; JANAA, S.; CHATTERJEEB, U.; CHAKRABARTI, S. **Inhibition of rat brain mitochondrial electron transport chain activity by dopamine oxidation products during extended in vitro incubation: Implications for Parkinson's disease**. Biochimica et Biophysica ACTA, v. 1741, p.65-74, (2005).

KLOKOUSAS, A.; BARRAND, M.A.; HLADKY, S.B. **Effects of clotrimazole on transport mediated by multidrug resistance associated protein 1 (MRP1) in human erythrocytes and tumour cells**. European Journal of Pharmacology, v. 268, p.6569-6577, (2001).

KUO, P.L.; HSU, Y.L.; CHANG, C.H.; LIN, C.C. **The mechanism of ellipticine-induced apoptosis and cell cycle arrest in human breast MCF-7 cancer cells**. Cancer Letters, v. 223, p.293-301, (2004).

LANGBEIN, S.; FREDERIKS, W.M.; ZUR HAUSEN, A.; POPA, J.; LEHMANN, J.; WEISS, C.; ALKEN, P.; COY, J.F. **Metastasis is promoted by a bioenergetic switch: new targets for progressive renal cell cancer.** International Journal of Cancer, v.11, p.2422-2428, (2008).

LEE C.; FERGUSON M.; CHEN L.B. **Construction of the endoplasmic reticulum.** Journal Cell Biology, v. 109, p.2045-2055, (1989).

LEHOTZKY, A., TELEGDI, M., LILIOM, K., OVÁDI, J. **Interaction of phosphofructokinase with tubulin and microtubules. Quantitative evaluation of the mutual effects.** The Journal of Biological Chemistry, vol. 268, p.: 10888-10894, (1993).

LEITE, T.C.; DA SILVA, D.; COELHO, R.G.; ZANCAN, P.; SOLA-PENNA, M. **Lactate favors the dissociation of skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase tetramers down-regulating the enzyme and muscle glycolysis.** Biochemistry Journal, v. 408, p. 123-130, (2007).

LINDBERG, K.; STRAMA, A.; LOCK, J.G.; GUSTAFSSON, J.; HALDOSEN, L.; HELGERO, L.A. **Expression of Estrogen Receptor β Increases Integrin $\alpha 1$ and Integrin $\beta 1$ Levels and Enhances Adhesion of Breast Cancer Cells.** Journal of Cellular Physiology, v. 222, p.156-167, (2010)

LIVNAT, T.; CHEN-ZION, M.; BEITNER, R. **Platelet-derived growth factor (PDGF) rapidly stimulates binding of glycolytic enzymes to muscle cytoskeleton, prevented by calmodulin antagonists.** Biochemical Medicine and Metabolic Biology, v. 53, n.1, p. 28-33, (1994).

LIVNAT, T.; CHEN-ZION, M.; BEITNER, R. **Stimulatory effect of epidermal growth factor on binding of glycolytic enzymes to muscles cytoskeleton and the antagonistic action of calmodulin inhibitors.** Biochemical Medicine and Metabolic Biology, v. 50, n: 1, p.24-34, (1993).

LUTHER, M.A.; CAI, G.Z.; LEE, J.C. **Thermodynamics of dimer and tetramer formations in rabbit muscle phosphofructokinase.** *Biochemistry*, v. 25, p.7931–7937, (1986).

MAJEWSKI, N.; NOGUEIRA, V.; BHASKAR, P.; COY, P.E.; SKEEN, J.E.; GOTTLOB, K.; CHANDEL, N.S.; THOMPSON, C.B.; ROBEY, R.B.; HAY, N. **Hexokinase-mitochondria interaction mediated by Akt is required to inhibit apoptosis in the presence or absence of Bax and Bak.** *Molecular Cell*, v.16, p.819-30, (2004).

MANOLESCU, A.R.; WITKOWSKA, K.; KINNAIRD, A.; CESSFORD, T.; CHEESEMAN, C. **Facilitated hexose transporters: new perspectives on form and function.** *Physiology (Bethesda)*, v. 22, p.234-240, (2007).

MARCEAU, F.; LUSSIER, A.; REGOLI, D.; GIROUD, J.P. **Pharmacology of kinins: their relevance to tissue injury and inflammation.** *General Pharmacology*, v.14, p.209–229, (1983).

MARCONDES, M. C.; SOLA-PENNA, M.; ZANCAN, P., **Clotrimazole potentiates the inhibitory effects of ATP on the key glycolytic enzyme 6-phosphofructo-1-kinase,** *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 497, p.62-67,(2010)

MARÍN-HERNÁNDEZ, A.; RODRÍGUEZ-ENRÍQUEZ, S.; VITAL-GONZÁLEZ, P.A.; FLORES-RODRÍGUEZ, F.L.; MACÍAS-SILVA, M.; SOSA-GARROCHO, M.; MORENO-SÁNCHEZ, R. **Determining and understanding the control of glycolysis in fast-growth tumor cells. Flux control by an over-expressed but strongly product-inhibited hexokinase.** *FEBS Journal*, v. 273, p.1975–1988, (2006).

MARINHO-CARVALHO, M. M.; COSTA-MATTOS, P.V.; SPITZ, G.A.; ZANCAN, P.; SOLA-PENNA, M. **Calmodulin upregulates skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase reversing the inhibitory effects of allosteric modulators.** *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1794, p.1175-1180, (2009).

MATHUPALA, S.P.; KO, Y.; PEDERSEN, P.L. **Hexokinase-2 bound to mitochondria: Cancer's stygian link to the "Warburg effect" and a pivotal target for effective therapy.** *Seminars in Cancer Biology*, v. 19, p.17-24, (2009).

MAZUREK, S.; MICHEL, A.; EIGENBRODT, E. **Effect of extracellular AMP on cell proliferation and metabolism.** *The Journal of Biological Chemistry*, v. 272, p.4941–4952, (1997).

MEADOWS, A.L.; KONG, B.; BERDICHEVSKY, M.; ROY, S.; ROSIVA, R.; BLANCH, H.W.; CLARK, D.S. **Metabolic and Morphological Differences between Rapidly Proliferating Cancerous and Normal Breast Epithelial Cells.** *Biotechnology Program*, v. 24, p.334–341, (2008).

MEIENHOFER, M.C.; DE MEDICIS, E.; COGNET, M.; KAHN, A. **Regulation of genes for glycolytic enzymes in cultured rat hepatoma cell lines.** *European Journal of Pharmacology*, v. 169, p.237–243, (1978).

MEIRA, D.D.; MARINHO-CARVALHO, M.M.; TEIXEIRA, C.A.; VEIGA, V.F.; DA POIAN, A.T.; HOLANDINI, C.; FREITAS, M.S.; SOLA-PENNA, M. **Clotrimazole decreases human breast cancer cells viability through alterations in cytoskeleton-associated glycolytic enzymes.** *Molecular Genetic and Metabolism*, v. 84, p.354-362, (2005).

MONROE, D.G.; SECRETO, F.J.; SUBRAMANIAM, M.; GETZ, B.J.; KHOSLA, B.; SPELSBERG, T.C. **Estrogen receptor α and β heterodimers exert unique effects on estrogen- and tamoxifen-dependent gene expression in human U2OS osteosarcoma cells.** *Molecular Endocrinology*, v.19, p.1555-1568, (2005).

MORITA, K.; NISHIKAWA, M.; KOBAYASHI, K.; DEGUCHI, K.; ITO, M.; NAKANO, T.; SHIMA, K.; NAGAO, M.; KUNO, T.; TANAKA, C. **Augmentation of retinoic acid-induced granulocytic differentiation in HL-60 leukemia cells by serine/threonine protein phosphatase inhibitors.** *FEBS Letters*, v.21, p.314-340, (1992).

MOSSMAN, B.T. **In vitro approaches for determining mechanisms of toxicity and carcinogenicity by asbestos in the gastrointestinal and respiratory tracts.** Environmental Health Perspectives, v.53, p.155-61, (1983).

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

NIGRO, J.M.; BAKER, S.J.; PREISINGER, A.C.; JESSUP, J.M.; HOSTETTER, R.; CLEARY, K.; BIGNER, S.H.; DAVIDSON, N.; BAYLIN, S.; DEVILEE, P. **Mutations in the p53 gene occurs in diverse human tumour types.** Nature, v. 342, p.705-708, (1989).

OHNO, M.; ABE, T. **Rapid colorimetric assay for the quantification of leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin-6 (IL-6).** Journal of Immunological Methods, v. 145, p.199-203, (1991).

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS), Disponível em: <http://www.who.int/topics/cancer/en/>. Acessado em setembro de 2009, (2009).

OSTHUS, R.C.; SHIM, H.; KIM, S.; LI, Q.; REDDY, R.; MUKHERJEE, M.; XU, Y.; WONSEY, D.; LEE, L.A.; DANG, C.V. **Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc.** The Journal of Biological Chemistry, v.275, p. 21797–21800, (2000).

PAETKAU, V.; H.A. **Phosphofructokinase. Correlation of physical and enzymatic properties.** The Journal of Biological Chemistry, v.242, p.2035-2042, (1967).

PAN, J.G.; MAK, T.W. **Metabolic Targeting as an Anticancer Strategy: Dawn of a New Era?** Science Signaling, v.381, p.1-5, (2007).

PASSONNEAU, J.V.; LOWRY, O.H. **Phosphofructokinase and the Pasteur effect.** Biochemistry Biophysics Research Commun, v.7, p.10-15, (1962).

PASTORINO, A.C.; JACOB, C.M.; OSELKA, G.W.; CARNEIRO-SAMPAIO, M.M. **Visceral leishmaniasis: clinical and laboratorial aspects.** Journal de Pediatria, v. 78, p.120-127, (2002).

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

PENSO, J.; BEITNER, R. **Clotrimazole decreases glycolysis and the viability of lung carcinoma and colon adenocarcinoma cells.** European Journal Pharmacology, v. 451, p.227-235 (2002b).

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.** Molecular Genetic and Metabolism, v.76, p.181-188, (2002a).

PETÉN, J.; HOLMBERG, L.; TRICHOPOULOS, D.; KALLIONIEMI, O.P.; KVALE, G.; WALLGREN, A.; TAYLOR-PAPADIMITRIOU, J. **Biology and natural history of breast cancer.** International Journal of Cancer Supplement, v.5, p.5-21, (1990).

PETERSEN, P.L. **Tumor mitochondria and the bioenergetics of cancer cells.** Progress in Experimental Tumor Research, v.22, p.190-274, (1978).

PLEMPEL, M.; BARTMANN, K. **Experimental studies on the antimycotic action of clotrimazole (Canesten) in vitro and after local application in vivo.** Drugs German, v. 15, p.103-120, (1972).

RACHER, A.J.; LOOBY, D.; GRIFFITHS, J.B. **Use of lactate dehydrogenase release to assess changes in culture viability.** Cytotechnology, v.3, p.301-307, (1989).

RACKER, E. **History of the Pasteur effect and its pathobiology.** Molecular and Cellular Biochemistry, v.5, p.17-23, (1974).

RAGHUNNAND, N.; GARCIA- MARTIN, M.L.; GATENBY, R.A. **pH imaging. A review of pH measurement methods and applications in cancers.** IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine, v.23, p.57-64, (2004).

RAPOPORT, T.A.; HEINRICH, R.; RAPOPORT, S.M. **The regulatory principles of glycolysis in erythrocytes in vivo and in vitro. A minimal comprehensive model describing steady states, quasi-steady states and time-dependent processes.** The Biochemical Journal, v.154, p.449–469, (1976).

ROBERGS, R.A.; GHIASVAND, F.; PARKER, D. **Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis** American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, v.287, p.502-516, (2004).

ROBEY, I.F.; STEPHEN, R.M.; BROWN, K.S.; BAGGETT, B.K.; GATENBY, R.A.; GILLIES, R.J. **Regulation of the Warburg. Effect in Early-Passage Breast Cancer Cells.** Neoplasia, v.10, p.745-756, (2008).

ROCHA E SILVA, M.; ROSENTHAL, S.R. **Release of pharmacologically active substances from the rat skin *in vivo* following thermal injury.** The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutic, v.132, p.110–116, (1961).

SAAD, B., DAKWAR, S., SAID, O., ABU-HIJLEH, G., AL BATTAH, F., KMEEL, A., AZIAZEH, H. **Evaluation of Medicinal Plant Hepatotoxicity in Co-cultures of Hepatocytes and Monocytes.** CAM, v.3, p.93–98, (2006).

SANCHEZ-MARTINEZ, C.; ARAGON, J.J. **Analysis of phosphofructokinase subunits and isozymes in ascites tumor cells and its original tissue, murine mammary gland.** FEBS Letters, v.409, p.86–90, (1997).

SCHLAPPACK, O.K.; ZIMMERMANN A.; HILL R.P. **Glucose starvation and acidosis: effect on experimental metastatic potential, DNA content and MTX resistance of murine tumour cells.** British of Journal Cancer, v.64, p.663-670, (1991).

SEBASTIAN, S.; WHITE, J.A.; WILSON, J.E. **Characterization of the rat type III hexokinase gene promoter. A functional octamer 1 motif is critical for basal promoter activity**, *The Journal of Biological Chemistry*, v.274, p.31700–31706, (1999)

SEMENZA, G.L. **Angiogenesis in ischemic and neoplastic disorders**. *Annual Review of Medicine*, v.54, p.17-28, (2001).

SEMENZA, G.L. **Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1**. *Biochemical Pharmacology*, v.64, p. 993–998, (2002).

SEMENZA, G.L. **Targeting HIF-1 for cancer therapy**. *Nature Reviews Cancer*; v. 3, n.10, p.721-32, (2003).

SHADOMY, S.; DIXON, D.M.; MAY, R. **A comparison of bifonazole (Bay H 4502) with clotrimazole in vitro**. *Sabouraudia*, v.20, p.313-323, (1982).

SHIMADA, N.; SHINAGAWA, T.; ISHII, S. **Modulation of M2-type pyruvate kinase activity by the cytoplasmic PML tumor suppressor protein**, *Genes to Cells*, v.13, p.245-254, (2008).

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

STARR, M.S.; WEST, G.B. **Bradykinin and oedema formation in heated paws of rats**. *British Journal Pharmacology and Chemotherapy*, v.31, p.178–187, (1967).

TAKAHASHI, H.; ABE, M.; SUGAWARA, T. **Clotrimazole, an imidazole antimycotic, is a potent inhibitor of angiogenesis**. *Japanese Journal of Cancer Research*, v.89, p.445-451, (1998).

TAKEI, S.; ISEDA, T.; YOKOYAMA, M. **Inhibitory effect of clotrimazole on angiogenesis associated with bladder epithelium proliferation in rats.** *Archives of Pharmacol Research*, v.10, p.78-85, (2003).

TORRES, N.V.; MATEO, F.; MELENDEZ-HEVIA, E.; KACSER, H. **Kinetics of metabolic pathways. A system in vitro to study the control of flux.** *Biochemistry Journal*, v.234, p.169–174, (1986).

TORRES, N.V.; SOUTO, R.; MELENDEZ-HEVIA, E. **Study of the flux and transition time control coefficient profiles in a metabolic system in vitro and the effect of an external stimulator.** *Biochemistry Journal*, v.260, p.763–769, (1989).

UYEDA, K. **Phosphofructokinase.** *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, v.48, p.193-244, (1979).

VAN DE LOOSDRECHT, A.A.; BEELEN, R.H.; OSSENKOPPELE, G.J.; BROEKHOVEN, M.G.; LANGENHUIJSEN, M.M. **A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leukemia.** *Journal of Immunological Methods*, v.174, p.311-320, (1994).

VIITANEN, P.V.; GEIGER, P.J.; ERICKSON-VIITANEN, S.; BESSMAN, S.P.; **Evidence for functional hexokinase compartmentation in rat skeletal muscle mitochondria.** *The Journal of Biological Chemistry*, v.259, p.9679–9684, (1984).

VORA, S.; HALPER, J.P.; KNOWLES, D.M. **Alterations in the activity and isozymic profile of human phosphofructokinase during malignant transformation in vivo and in vitro: transformation- and progression-linked discriminants of malignancy.** *Cancer Research*, v.45, p.2993–3001, (1985).

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

WEBER, G. **Ordered Biochemical Program of gene Expression in Cancer Cells.** *Biochemistry*, v.66, p.1164–1173, (2001).

WEINBERG, R. A., **A biologia do câncer.** Editora Ateneu, p.1- 864, (2008).

WILSON, J.E. **Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function.** *The Journal Experimental Bioogy*, v.206, p. 2049–2057, (2003).

XU, F., BURG, K.J. **Three-dimensional polymeric systems for cancer cell studies.** *Cytotechnology*, vol. 54, p.: 135-143, (2007).

YONG, C.D.; ANDERSON, S.M. **Sugar and fat- that's where it's at: metabolic changes in tumors.** *Breast Cancers Research*, v.202, p.1-9, (2008).

ZANCAN, P.; ALMEIDA, F.V.; FABER-BARATA, J.; DELLIAS, J.M.; SOLA-PENNA, M., **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-1 allosteric regulation.** *Archives of Biochemistry Biophysics*, v.467, p.275-282, (2007a).

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*, v. 60, p.526-533.

ZANCAN, P.; ROSAS, A.O.; MARCONDES, M.C.; MARINHO-CARVALHO, M.M., SOLA-PENNA, M. **Clotrimazole inhibits and modulates heterologous association of the key glycolytic enzyme 6-phosphofructo-1-kinase.** *Biochemical Pharmacology*, v.63, p.1520-1527, (2007b).

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.** *Molecular Genetic and Metabolism*, v.86, p.392-400, (2005a).

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

ZANCAN, P.; SOLA-PENNA, M.; FURTADO, C.M.; SILVA, D.D. **Differential expression of phosphofructokinase-1 isoforms correlates with the glycolytic efficiency of breast cancer cells.** *Molecular Genetic and Metabolism*, v.100, p.372-378, (2010).

ZHANG, F.; SUN, X.; YI, X.; ZHANG, Y. **Metabolic characteristics of recombinant Chinese hamster ovary cells expressing glutamine synthetase in presence and absence of glutamine.** *Cytotechnology*, v. 51, p.21-28, (2006).

ZHANG, Y.; MA, B.; FAN, Q. **Mechanisms of breast cancer bone metastasis.** *Cancer Letters*, v.292, p.1-7, (2010).

ZHU, A.; ROMERO, R.; PETTY, R.H. **An enzymatic fluorimetric assay for glucose-6-phosphate: Application in an in vitro Warburg-like effect.** *Analytical Biochemistry*, v.388, p.97-101, (2009).

ZIEGLER, A.; VON KIENLIN, M.; DECORPS, M.; REMY, C. **High glycolytic activity in rat glioma demonstrated in vivo by correlation peak 1H magnetic resonance imaging.** *Cancer Research*, v.61, p.5595–5600, (2001).

ZU, X.L.; GUPPY, M. **Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction.** *Biochemical and Biophysical Research Communication*, v.313, p.459–465, (2004).