



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

Mariah Celestino Marcondes Brunow

**METABOLISMO ENERGÉTICO COMO ALVO PARA O
TRATAMENTO DO CÂNCER DE MAMA COM
NANOPARTÍCULAS CONTENDO CLOTRIMAZOL**

Rio de Janeiro,
2013

Mariah Celestino Marcondes Brunow

“METABOLISMO ENERGÉTICO COMO ALVO PARA O
TRATAMENTO DO CÂNCER DE MAMA COM
NANOPARTÍCULAS CONTENDO CLOTRIMAZOL”

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia
da Universidade Federal do Rio de
Janeiro, como parte dos requisitos
necessários à obtenção do título de Doutor
em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Patricia Zancan
Profa. Adjunta do Departamento de Biotecnologia Farmacêutica, Faculdade de
Farmácia, UFRJ.

Rio de Janeiro,
2013

FICHA CATALOGRÁFICA

MARCONDES, Mariah Celestino Brunow.

Metabolismo energético como alvo para o tratamento do câncer de mama com nanopartículas contendo clotrimazol. Rio de Janeiro, UFRJ, Faculdade de Farmácia, CCS, 2013.

XIX, 133 f.

Tese – Doutor em Ciências Farmacêuticas

1. Câncer. 2. Clotrimazol. 3. Nanoterapia. 4. Metabolismo. 5. Micela

I. Universidade Federal do Rio de Janeiro

II. Metabolismo energético como alvo para o tratamento do câncer de mama com nanopartículas contendo clotrimazol

FOLHA DE APROVAÇÃO

Mariah Celestino Marcondes Brunow

Metabolismo energético como alvo para o tratamento do câncer de mama
com nanopartículas contendo clotrimazol

Membros da Banca Examinadora:

Prof. Patricia Zancan (Orientadora)

Professora Adjunta do Departamento de Biotecnologia Farmacêutica, Faculdade de Farmácia, UFRJ

Prof. Eleonora Kurtenbach

Professora Associada do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ

Prof. Wagner Seixas da Silva

Professor Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ

Prof. André Luis Souza dos Santos

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

Prof. Luis Mauricio Trambaioli da Rocha e Lima (Revisor)

Professor Associado do Departamento de Biotecnologia Farmacêutica, Faculdade de Farmácia, UFRJ

Rio de Janeiro/2013



Este trabalho foi realizado no Laboratório de Oncobiologia Molecular (LabOMol), do Departamento de Biotecnologia Farmacêutica, Faculdade de Farmácia, CCS/UFRJ, sob a orientação da Professora Patrícia 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/Nanobiotecnologia) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) no período de Novembro de 2009 a Outubro de 2013.

AGRADECIMENTOS

- ❖ *À Deus, por sempre me guiar e me dar sabedoria , sendo a maior razão das minhas vitórias;*
- ❖ *Aos meus pais que sempre torceram por mim, obrigada pelo apoio e compreensão incondicionais, sempre me encorajando, e mesmo distantes, estarem sempre na torcida para que eu realize meus sonhos;*
- ❖ *Ao meu marido, obrigada pelo amor, por acalmar meu coração nos dias difíceis, por acreditar em mim e por viver meus sonhos comigo;*
- ❖ *À minha orientadora, Patrícia Zancan, obrigada pela amizade e ensinamentos, que me fizeram crescer e amadurecer no mundo científico durante esses 7 anos juntas;*
- ❖ *Ao Prof. Mauro Sola Penna, obrigada pela paciência e presteza em me ensinar e ajudar quando sempre precisei;*
- ❖ *À todos os amigos do Labomol, obrigada pela convivência diária. Principalmente a Cris, pela ajuda não só nos experimentos, mas nas dificuldades que surgiam no dia a dia, pelas conversas, risadas e conselhos.*
- ❖ *À todos os amigos do Labecom, que apesar de serem de outro laboratório, é como se fossem do meu. Obrigada por tudo.*
- ❖ *Aos Prof. Mauricio TR Lima e Mauro Sola Penna, minha banca de acompanhamento, obrigada pelas ideias e contribuições científicas para o desenvolvimento deste trabalho;*
- ❖ *Aos Prof. André Luis, Wagner Seixas e Eleonora Kurtenback, obrigada por aceitarem a participar da minha banca de doutorado e pelas futuras contribuições ao trabalho;*

- ❖ *Aos meus colaboradores, Anne Cristine Fernandes e Ivaldo Junior, obrigado pelos experimentos, ideias e pelo tempo gasto comigo;*
- ❖ *Aos meus amigos que mesmo de perto ou de longe, torceram por mim. Muito obrigada;*
- ❖ *Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, obrigado pela oportunidade de ter feito parte desta instituição;*
- ❖ *Às agências de fomento CAPES/nanobiotecnologia, FAPERJ e CNPq, obrigada pelo apoio financeiro;*

*“E sabemos que todas as coisas contribuem juntamente para o bem
daqueles que amam a Deus.”*

Romanos 8.28

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda
pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”*

(Arthur Schopenhauer)

RESUMO

O clotrimazol (CTZ) apresenta-se como um potencial fármaco antineoplásico, devido aos seus efeitos deletérios sobre diferentes pontos do metabolismo energético de linhagens celulares de câncer. Devido a sua baixa solubilidade aquosa e a alta lipofilicidade, neste trabalho, este fármaco foi incorporado em um sistema micelar formando microemulsões óleo/água. Esse sistema é importante para o tratamento do câncer, uma vez que promove a liberação prolongada do fármaco, diminuindo assim a toxicidade e aumentando a eficácia terapêutica. Neste contexto, o presente trabalho tem como finalidade investigar e comparar o efeito do CTZ solúvel com o CTZ incorporado em micelas sobre o metabolismo glicolítico e mitocondrial em uma conhecida linhagem celular de câncer de mama, a MCF-7. Como controle não tumoral, utilizamos duas linhagens, MCF-10A e C2C12, as quais não responderam ao tratamento com o CTZ micelar. Por outro lado, linhagem MCF-7 sofreu uma brusca redução da viabilidade, principalmente pelo CTZ micelar, que foi 23,18% mais potente que a sua forma solubilizada em dimetil sulfóxido (DMSO). Esse efeito foi dependente da dose e do tempo de exposição ao fármaco. Nossos resultados revelaram ainda que, na maioria dos pontos do metabolismo glicolítico e mitocondrial analisados, o efeito inibitório do CTZ foi potencializado quando incorporado em micelas. Sobre o metabolismo de glicose, o fármaco diminuiu a atividade das três enzimas chaves glicolíticas: hexocinase, fosfofrutocinase e piruvato cinase; e da enzima chave da via das pentoses, a glicose-6-fosfato desidrogenase. Como consequência, observamos uma redução na produção de lactato. Sobre o metabolismo oxidativo mitocondrial, o fármaco promoveu despolarização mitocondrial, diminuição a atividade da enzima chave do ciclo de Krebs, a succinato desidrogenase, e promoveu alterações significativas na morfologia mitocondrial. Todas essas alterações levaram a um quadro de estresse oxidativo, caracterizado pela diminuição do conteúdo de ATP, aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e diminuição do conteúdo de glutatona reduzida. Adicionalmente, o fármaco alterou a morfologia normal das células MCF-7, promovendo uma contração de seus prolongamentos, tornando-as arredondadas. Os ensaios visando avaliar os mecanismos de morte celular demonstraram que o CTZ induziu a morte celular tanto por processos apoptóticos, como por necrose. Por fim, em condições nutricionais de baixa concentração de glicose (1 mM), o efeito inibitório do CTZ micelar sobre a

viabilidade celular, sobre o conteúdo de ATP e a produção de ROS foi potencializado quando comparado a condição padrão de 4,5 mM de glicose. Em conjunto, nossos resultados revelam que houve êxito na incorporação do CTZ em sistemas nanométricos micelares, devido aos seus superiores efeitos inibitórios sobre o metabolismo energético de células tumorais quando comparado aos efeitos do CTZ solubilizado em DMSO. Assim, este sistema microemulsionado apresenta-se como uma alternativa para aumentar a eficiência terapêutica, o qual se pretende aplicar em ensaios futuros.

Palavras chaves: câncer, clotrimazol, micela, metabolismo.

ABSTRACT

Clotrimazole (CTZ) has been described as a potential antineoplastic drug due to its deleterious effects on different targets of energy metabolism of cancer cell lines. Due to its poor aqueous solubility and high lipophilicity, in this study CTZ was incorporated into micelles forming microemulsions oil/water. This system is important for cancer treatment because it promotes prolonged drug release, thereby reducing the toxicity and increasing therapeutic effectiveness. In this context, this work aims to investigate and compare the effects of the soluble CTZ with CTZ incorporated into micelles on the glycolytic and mitochondrial metabolism, in the known breast cancer cell line MCF-7. As controls, we used two normal strains, MCF-10A and C2C12, which were not affected by micellar CTZ. However, MCF-7 presented an abrupt reduction in viability when treated with micellar CTZ, which was 23.18% more powerful than the preparation directly solubilized in DMSO. This effect was dose- and time-dependent. Our results also revealed that most of the mitochondrial and glycolytic targets analyzed were more sensitive to CTZ and the drug was incorporated in the microemulsions. On glucose metabolism, the drug decreased the activity of three key glycolytic enzymes, hexokinase, phosphofructokinase and pyruvate kinase, and the key enzyme of the pentose phosphate pathway, glucose-6-phosphate dehydrogenase. As a result, was observed a decrease in the lactate production. On mitochondrial oxidative metabolism, the drug promoted a mitochondrial depolarization, decreases the activity of an enzyme of the Krebs cycle, succinate dehydrogenase, and promoted significant changes in mitochondrial morphology. All of these changes led to a frame of oxidative stress, characterized by the decrease in ATP content, increased reactive oxygen species (ROS) production and decreased content of reduced glutathione. Additionally, the drug altered the morphology of normal MCF-7 cells, providing a contraction of its extensions, making them rounded. Assays of cell death mechanism by CTZ demonstrated that the drug induces both apoptotic processes and necrosis. Finally, when the cells were grown under low glucose concentration (1 mM), the inhibitory effects of micellar CTZ on cell viability, ATP content and ROS production were enhanced when compared to standard conditions of 4.5 mM glucose. Altogether our results show that incorporation of CTZ in micellar systems presented advantages to

the freely soluble drug due to their superior inhibitory effects on energy metabolism in tumor cells. Thus, this microemulsion system presents itself as an alternative to increase the therapeutic efficiency, which is intended to apply in future trials.

Key words: cancer, clotrimazole , micelle, metabolism.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. PRINCIPAIS ESTÁGIOS NA PROGRESSÃO TUMORAL.....	2
FIGURA 2. DISTRIBUIÇÃO PROPORCIONAL DOS DEZ TIPOS DE CÂNCER MAIS INCIDENTES ESTIMADOS PARA 2012 POR SEXO NO BRASIL, EXCETO PELE NÃO MELANOMA.....	4
FIGURA 3. VIA GLICOLÍTICA.....	10
FIGURA 4. REAÇÃO CATALISADA PELA LDH.....	12
FIGURA 5. ESTRUTURA INTERNA MITOCONDRIAL.....	16
FIGURA 6. ESTRUTURA QUÍMICA DO CLOTRIMAZOL.....	21
FIGURA 7. ESTRUTURA DAS MICROEMULSÕES.....	27
FIGURA 8. DIÂMETRO MÉDIO DAS MICELAS VAZIAS (SEM CTZ) E COM CTZ POR ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS).....	40
FIGURA 9. ANÁLISE DA ESTABILIDADE TÉRMICA DAS MICELAS POR ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS).....	42
FIGURA 10. ANÁLISE DA ESTABILIDADE DAS MICELAS AO LONGO DO TEMPO POR ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS).....	43
FIGURA 11. EFEITO DO CTZ SOLÚVEL E MICELAR SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DA LINHAGEM MCF-7.....	46
FIGURA 12. EFEITO DA MICELA SEM CTZ SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DA LINHAGEM MCF-7.....	46
FIGURA 13. EFEITO DO CTZ MICELAR SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DAS LINHAGENS NÃO TUMORAIS, MCF-10 A E C2C12.....	47
FIGURA 14. EFEITO DO CTZ MICELAR SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DA LINHAGEM MCF-7 AO LONGO DO TEMPO.....	48
FIGURA 15. MICROSCOPIA DE LUZ POR COLORAÇÃO DE GIEMSA DAS CÉLULAS MCF-7 APÓS O TRATAMENTO COM CTZ MICELAR.....	50
FIGURA 16. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DAS CÉLULAS MCF-7 APÓS O TRATAMENTO COM CTZ MICELAR.....	51
FIGURA 17. MICROSCOPIA DE LUZ DE CONTRASTE INTERFERENCIAL DIFERENCIAL DE NOMARSKI (DIC) DAS CÉLULAS MCF-7 APÓS O TRATAMENTO COM CTZ MICELAR.....	52

FIGURA 18. PANORAMA GERAL: MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DAS CÉLULAS MCF-7 APÓS O TRATAMENTO COM CTZ MICELAR.....	53
FIGURA 19. PANORAMA GERAL: MICROSCOPIA ÓTICA POR COLORAÇÃO DE GIEMSA DAS CÉLULAS MCF-7 APÓS O TRATAMENTO COM CTZ MICELAR.....	53
FIGURA 20. EFEITO DO CTZ SOLÚVEL E MICELAR SOBRE A ATIVIDADE DA VIA GLICOLÍTICA.....	56
FIGURA 21. EFEITO DO CTZ SOLÚVEL E MICELAR SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA CHAVE DA VIA DAS PENTOSSES, A G6PDH.....	57
FIGURA 22. EFEITO DO CTZ SOLÚVEL E MICELAR SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA SDH.....	59
FIGURA 23. ANÁLISE DO POTENCIAL TRANSMEMBRÂNICO MITOCONDRIAL NA PRESENÇA DE CTZ SOLÚVEL E MICELAR.....	61
FIGURA 24. ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO PELO CTZ SOLÚVEL E MICELAR.....	62
FIGURA 25. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DA MITOCÔNDRIA DAS CÉLULAS MCF-7 APÓS O TRATAMENTO COM CTZ MICELAR.....	65
FIGURA 26. DETERMINAÇÃO DA INTEGRIDADE DA MEMBRANA DA CÉLULA MCF-7 NA PRESENÇA DE CTZ SOLÚVEL E MICELAR.....	67
FIGURA 27. ANÁLISE DO CICLO CELULAR DAS CÉLULAS MCF-7 NA PRESENÇA DE CTZ SOLÚVEL E MICELAR.....	69
FIGURA 28. INTENSIDADE DE MARCAÇÃO PARA ANEXINA NAS CÉLULAS MCF-7 NA PRESENÇA DE CTZ SOLÚVEL E MICELAR.....	70
FIGURA 29. O EFEITO DO CTZ MICELAR É POTENCIALIZADO EM BAIXA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE.....	72

LISTA DE SIGLAS

- ADP** - Adenosina difosfato
- AMPK** - Proteína cinase ativada por AMP
- ATCC** - *American Type Culture Collection*
- ATP** - Adenosina trifosfato
- CAT** - Ciclo dos ácidos tricarboxílicos
- CMC** - Concentração crítica micelar
- CTZ** - Clotrimazol
- DIC** - Microscopia de luz de Contraste Interferencial Diferencial de Nomarski
- DLS** - *Dynamic Light Scattering*
- DMEM** - Meio de Eagle modificado por Dulbecco
- DMSO** - Dimetilsufóxido
- DNA** - Ácido Desoxiribonucléico
- EDTA** - Ácido etilenodiaminotetracético
- F1,6BP** - Frutose 1,6-bifosfato
- F6P** - Frutose 6-fosfato
- FAD⁺** - Flavina adenina dinucleotídeo oxidada
- FADH₂** - Flavina adenina dinucleotídeo reduzida
- FDG** - Flúor-deoxiglicose
- G6P** - Glicose 6-fosfato
- G6PDH** - Glicose 6-fosfato desidrogenase
- GAPDH** - Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
- GLUT** - Transportadores de glicose por difusão facilitada
- GSH** - Glutathiona reduzida
- GSSG** - Glutathiona oxidada
- HK** - Hexocinase
- LDH** - Lactato desidrogenase
- MDR** - Resistência a múltiplas drogas
- ME** - Microemulsão
- MET** - Microscopia eletrônica de transmissão
- MEV** - Microscopia eletrônica de varredura
- MO** - Microscopia ótica
- MRC** - Meio de reação comum

MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazoli)-2,5-difenil-2H-tetrazólio

NAD⁺ - Nicotinamida adenosina dinucleotídeo oxidada

NADH - Nicotinamida Adenina dinucleotídeo Reduzido

NADP⁺ - Nicotinamida adenosina dinucleotídeo fosfato oxidada

NADPH - Nicotinamida adenosina dinucleotídeo fosfato reduzida

NBT - Nitroazul de tetrazólio

OMS - Organização Mundial da Saúde

PBS - Tampão fosfato salino

PDH - Piruvato desidrogenase

PET - Tomografia de emissão de pósitrons

PFK - Fosfofrutocinase

PFK-C - Isoforma de plaqueta da PFK

PFK-L - Isoforma hepática da PFK

PFK-M - Isoforma muscular da PFK

PGM - Fosfoglicerato mutase

PI - Iodeto de propídeo

ROS - Espécie reativa de oxigênio

SDH - Succinato desidrogenase

TRX - Tioredoxina

VDAC - Canal de ânion voltagem dependente

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 CÂNCER.....	1
1.2 CARACTERÍSTICAS METABÓLICAS DO CÂNCER.....	4
1.3 METABOLISMO GLICOLÍTICO.....	9
1.4 METABOLISMO MITOCONDRIAL.....	13
1.4.1 ESTRESSE OXIDATIVO.....	17
1.5 MORTE CELULAR.....	18
1.6 CLOTRIMAZOL.....	20
1.6.1 CLOTRIMAZOL NO TRATAMENTO DO CÂNCER.....	22
1.7. MICROEMULSÃO COMO UM PROMISSOR CARREADOR DE MOLÉCULAS INSOLÚVEIS.....	24
1.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS DA INTRODUÇÃO.....	28
2. OBJETIVOS	30
2.1 OBJETIVO GERAL.....	30
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 MATERIAIS.....	32
3.2 PREPARO DAS MICROEMULSÕES.....	32
3.3 DETERMINAÇÃO DO TAMANHO MÉDIO MICELAR.....	32
3.4 CULTURA DE CÉLULA.....	32
3.5 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR.....	32
3.6 DOSAGEM DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS GLICOLÍTICAS HK, PFK E PK E DA ENZIMA CHAVE DA VIA DAS PENTOSSES A G6PDH.....	33
3.7 QUANTIFICAÇÃO DO CONTEÚDO DE ATP.....	33
3.8 DOSAGEM DA PRODUÇÃO DE LACTATO.....	34
3.9 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TRANSMEMBRÂNICO DA MITOCÔNDRIA.....	34
3.10 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE ROS.....	34
3.11 QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DA SUCCINATO DESIDROGENASE.....	35

3.12	ANÁLISE DO CICLO CELULAR.....	35
3.13	AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DA MEMBRANA CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	35
3.14	DETECÇÃO DE MORTE CELULAR POR ANEXINA V.....	36
3.15	QUANTIFICAÇÃO DO CONTEÚDO DE GLUTATIONA.....	36
3.16	MICROSCOPIA DE LUZ POR COLORAÇÃO DE GIEMSA.....	36
3.17	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	37
3.18	MICROSCOPIA DE LUZ DE CONTRASTE INTERFERENCIAL DIFERENCIAL DE NOMARSKI (DIC).....	37
3.19	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET).....	37
3.20	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS.....	38
4.	RESULTADOS.....	39
4.1	CARACTERIZAÇÃO DAS MICELAS CONTENDO CTZ.....	39
4.2	ESTUDO DA CITOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i>	44
4.2.1	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR.....	44
4.2.2	AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA CELULAR.....	49
4.3	ESTUDO DO METABOLISMO DA GLICOSE.....	54
4.4	ESTUDO DO METABOLISMO MITOCONDRIAL.....	58
4.5	ESTUDO DO MECANISMO DE MORTE CELULAR.....	66
4.6	ESTUDO DO COMPORTAMENTO DA LINHAGEM TUMORAL EM BAIXA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE.....	68
5.	DISCUSSÃO.....	73
6.	CONCLUSÕES.....	83
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
8.	APÊNDICES: TRABALHOS PUBLICADOS DURANTE O PERÍODO DE DOUTORADO.....	104
8.1	Apêndice A: <i>Muscle-Type 6-Phosphofructo-1-kinase and Aldolase Associate Conferring Catalytic Advantages for Both Enzymes;</i>	
8.2	Apêndice B: <i>Clotrimazole Preferentially Inhibits Human Breast Cancer Cell Proliferation, Viability and Glycolysis;</i>	

8.3 Apêndice C: *Resveratrol decreases breast cancer cell viability and glucose metabolism by inhibiting 6-phosphofructo-1-kinase.*

1. INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER

As neoplasias malignas pertencem a uma classe de doenças na qual um grupo de células apresenta características distintas das células normais que acarretam em um crescimento desordenado, proliferação incontrolada, imortalidade, invasão para outros tecidos e metástase (INCA, 2013). A invasão refere-se a penetração direta das células cancerosas em tecidos adjacentes. A metástase refere-se a sua habilidade em penetrar nos vasos linfáticos e sanguíneos, circularem através da corrente sanguínea e posteriormente pararem em outras áreas do organismo, onde crescem e formam colônias da neoplasia primária. Nesses casos as células formam uma massa tecidual distinta, formadas por células indiferenciadas, denominadas de tumor (CROWLEY, 2004). Antigamente, acreditava-se que os tumores surgiam apenas em indivíduos debilitados, a partir de corpos estranhos que se instalavam no organismo de indivíduos devido a fragilidade na saúde. A partir da década de 80 sabe-se que além dos tumores originarem-se a partir de tecidos saudáveis, estes são capazes de se mover pelo corpo, atingir e colonizar outros tecidos formando tumores secundários (BICKERS e LOWRY, 1989).

A célula anormal gerada é o produto final do mau funcionamento da regulação do ciclo celular, cujas células mutadas e injuriadas, são permitidas a progredir realizando o ciclo celular, acumulando mutações (FOSTER, 2008). Quando tais genes são transcritos, provocam a síntese de proteínas que mostram perda ou ganho de sua função biológica. Essas mutações podem ser causadas por agentes físicos e químicos do ambiente, por patógenos e vírus ou por produtos tóxicos da própria célula, como radicais livres (FOSTER, 2008). Um exemplo bastante conhecido é a mutação do gene supressor tumoral, p53. A forma mutada desse gene promove a perda de um estímulo supressor de tumor na célula deixando-a mais suscetível à indução e progressão da tumorigênese (NIGRO et al., 1989). As mutações somáticas no oncogene p53 são encontradas em aproximadamente 50% de todos os tumores humanos, fazendo dele o gene mais comumente alterado (MATOS et al., 2005).

Alguns estágios devem ser percorridos até que o câncer se instale, destacando-se três: estágio de indução, estágio de promoção e estágio de progressão (**Figura 1**). O estágio da indução é caracterizado pela lesão do DNA que ocorre por vários fatores,

como visto no parágrafo anterior. Todos estes fatores podem gerar uma mudança irreversível do genótipo da célula normal progenitora, produzindo uma célula denominada “iniciada”. O segundo estágio consiste na ativação de oncogenes ou inibição de genes supressores do tumor e é denominado de fase ou estágio de promoção. Um exemplo já citado anteriormente é o do gene p53 e as células neste estágio são denominadas “transformadas”. O último estágio da carcinogênese, chamado de progressão, é onde ocorre a mudança do microambiente celular com o objetivo de manter o processo maligno e a capacidade de gerar metástases. Durante esta fase, são geradas condições para o crescimento das células imortalizadas, tais como produção de fatores de crescimento e citocinas (PETÉN et al., 1990; WITSCH et al., 2010; INCA 2013).

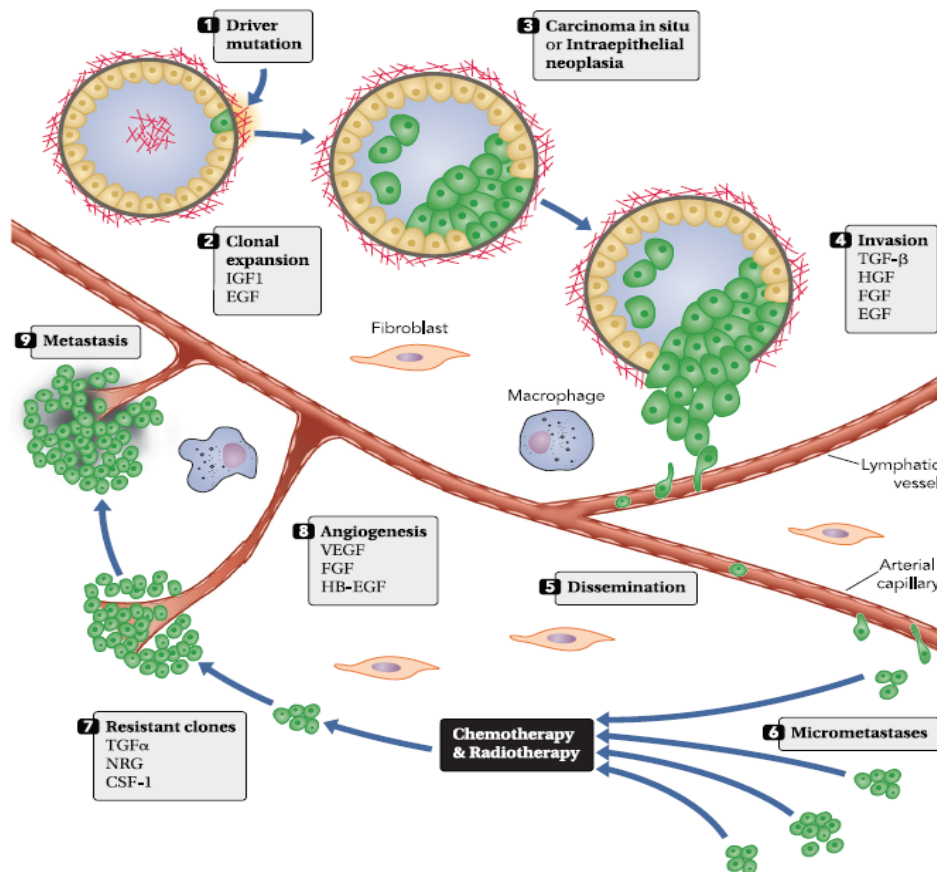



Figura 1. Principais estágios na progressão tumoral (WITSCH et al., 2010).

Em contraste com o tumor maligno, o tumor benigno cresce lentamente e permanece localizado, não se infiltrando em tecidos adjacentes nem invadindo vasos sanguíneos ou linfáticos, não apresentando, portanto, metástases. Habitualmente, um

tumor benigno pode ser completamente removido cirurgicamente sem dificuldade (CROWLEY, 2004). Histologicamente, as células do tumor benigno são bem diferenciadas, aproximando-se do fenótipo do tecido de onde se originam, podendo inclusivamente manter a atividade funcional desse tecido mãe (CROWLEY, 2004; VERMEULEN et al., 2008). As mitoses são raras, o que se relaciona com o seu baixo índice de crescimento (STEVENS e LOWE, 2000). Assim, dificilmente levam pacientes a óbito. Quanto à sua origem, os tumores podem ser divididos em carcinomas, que são tumores sólidos derivados do tecido epitelial, representando a maioria dos tumores malignos já descritos; os sarcomas, que são cânceres derivados dos tecidos conjuntivo e musculares; os cânceres de sistema nervoso e as leucemias (FERREIRA e ROCHA, 2004).

A incidência mundial dessa doença vem crescendo ao longo dos anos. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que, no ano 2030, podem-se esperar 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer. Seguindo tendência mundial, no Brasil, as estimativas do INCA para o ano de 2013 apontam a ocorrência de aproximadamente 518.510 casos novos de câncer (INCA, 2013). Destaca-se entre os tipos mais incidentes, o câncer de mama. Este é o segundo tipo mais frequente no mundo e o mais comum entre as mulheres (**Figura 2**), respondendo por 22% dos casos novos a cada ano. Em 2013, espera-se, para o Brasil, 52.680 casos novos de câncer da mama, com um risco estimado de 52 casos a cada 100 mil mulheres. Os homens também podem desenvolver câncer de mama, porém é raro, constituindo menos de 1% dos casos de câncer de mama (INCA, 2013).

A OMS estima que cerca de 1/3 dos casos de câncer poderiam ser prevenidos. A prevenção e o controle do câncer de mama estão entre os mais importantes desafios científicos e de saúde pública, uma vez que é um dos cânceres mais temido pelas mulheres devido à sua alta frequência e, sobretudo pelos seus efeitos psicológicos, que afetam a percepção da sexualidade e a imagem pessoal (INCA, 2013). Quando essa enfermidade encontra-se em um estágio avançado, usualmente definido como doença metastática ou inoperável, é essencialmente incurável.

Localização primária	casos novos	percentual			Localização primária	casos novos	percentual
Próstata	60.180	30,8%	Homens 	Mulheres	Mama Feminina	52.680	27,9%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.210	8,8%			Colo do Útero	17.540	9,3%
Cólon e Reto	14.180	7,3%			Cólon e Reto	15.960	8,4%
Estômago	12.670	6,5%			Glândula Tireoide	10.590	5,6%
Cavidade Oral	9.990	5,1%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.110	5,3%
Esôfago	7.770	4,0%			Estômago	7.420	3,9%
Bexiga	6.210	3,2%			Ovário	6.190	3,3%
Laringe	6.110	3,1%			Corpo do Útero	4.520	2,4%
Linfoma não Hodgkin	5.190	2,7%			Linfoma não Hodgkin	4.450	2,4%
Sistema Nervoso Central	4.820	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.450	2,4%

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10

Figura 2. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012 por sexo no Brasil, exceto pele não melanoma (INCA, 2013).

Diminuir o crescimento do tumor, prolongar a sobrevida e aliviar os sintomas, possibilitando tratamento paliativo efetivo e melhoria da qualidade de vida, são os atuais objetivos do tratamento (WINER et al., 2001).

Dessa forma, o entendimento do comportamento e do metabolismo dessas células é de fundamental importância para alterar o quadro epidemiológico do câncer e ter assim, um sucesso no tratamento dessa neoplasia. As culturas de células de carcinoma mamário humano, como MCF-7, MDA-MB-453 e MDA-MB-231, têm sido importantes modelos *in vitro* para estudar a regulação e metabolismo do câncer da mama, permitindo importantes avanços científicos no que se refere ao desenvolvimento de moléculas para o tratamento dessa doença (ENGEL e YOUNG, 1978).

1.2 CARACTERÍSTICAS METABÓLICAS DO CÂNCER

Em 2000, Douglas Hanahan e Robert Weinberg, escreveram um artigo de revisão publicado pela revista *Cell*, que se intitula *The Hallmarks of Cancer*. Nele os autores apresentaram seis "características adquiridas" necessárias para que células comuns se transformem em células cancerosas. Os processos que levam a transformação celular induzem uma série de reestruturações funcionais em decorrência da nova condição e do microambiente no qual o tumor irá se desenvolver. Quando mutações ocorrem nos oncogenes e, por isso, os tornam ativos, ou em genes supressores de tumor e os tornam inativos, inicia-se o caminho pelo qual as células descendentes dessas vão adquirindo as seis características de que fala o título do artigo e que levam à formação

de tumores. São elas: autossuficiência em sinais de crescimento; insensibilidade para sinais de inibição de crescimento; evasão da morte celular programada; potencial ilimitado de replicação; angiogênese sustentada e capacidade de invadir tecidos e criar metástases. Em seu trabalho complementar 11 anos depois, intitulado *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*, publicado também na revista *Cell* (2011), Hanahan e Weinberg citaram duas "características emergentes", sugerindo mecanismos adicionais que suportam estas capacidades proliferativas, que inclui a reprogramação do metabolismo energético celular, a fim de suportar o crescimento celular e a proliferação contínua, e a capacidade de escapar à destruição pelo sistema imune.

Dentre os diferentes marcos do câncer citados acima, destaca-se a reprogramação do metabolismo energético celular. A proliferação celular descontrolada, que representa a essência da doença neoplásica, envolve não só o controle desregulado da proliferação celular, mas também ajustes do metabolismo energético a fim de estimular o crescimento e divisão celular (EL-BACHA e SOLA-PENNA, 2003). Assim, a condição proliferativa de uma célula tumoral requer uma reprogramação metabólica da célula, de maneira a satisfazer suas demandas energéticas e de biomassa. A modificação no metabolismo energético das células tumorais mais conhecida e melhor compreendida é a capacidade glicolítica aumentada mesmo na presença de altas concentrações de O₂ (ZHOU et al., 2010). Esse fenômeno transpõe o *Efeito Pasteur*. Louis Pasteur foi o primeiro a demonstrar que, na maioria das células de mamíferos, a glicólise é inibida pela presença de O₂, permitindo que as mitocôndrias oxidem piruvato em CO₂ e H₂O (PETERSEN, 1978; MAZUREK et al., 1997; GRIGUER et al., 2005; GATENBY e GILLIES, 2004; MARIN-HERNANDEZ et al., 2006). Entretanto, no início do século passado, em 1920, o famoso bioquímico alemão Otto Warburg, foi o primeiro a observar que tecidos tumorais de fígado apresentavam dominância da glicólise em relação a fosforilação oxidativa, convertendo glicose em lactato, mesmo na presença de O₂, quando comparados aos tecidos normais do mesmo órgão. O fenômeno das células tumorais gerarem ATP em condições aeróbicas ficou conhecido como *efeito warburg* ou glicólise aeróbica (WARBURG, 1956; WOLF et al., 2011). Nesse experimento, Warburg fez a surpreendente descoberta que as células tumorais, ao contrário das células normais, utilizavam a glicólise em vez da fosforilação oxidativa mitocondrial para oxidar glicose, que embora aparente uma produção energética ineficiente, a produção de ATP pode ser até aproximadamente 100 vezes mais rápida do que pela fosforilação oxidativa, atendendo assim, a demanda das células cancerígenas

que se proliferam rapidamente (WARBURG, 1956; GATENBY e GILLIES, 2004; HSU e SABATINI, 2008). Além disso, Warburg também observou que o tecido tumoral apresentava um consumo de glicose superior aos tecidos normais (FERREIRA, 2010), conferindo vantagens adaptativas diante do ambiente ácido e das condições de hipóxia (RESENDES-ANTONIO et al., 2010). Recentemente, descobriu-se que alta taxa de lactato pode suprimir a proliferação de linfócitos T citotóxicos humanos, além de diminuir sua atividade citotóxica. Esses efeitos podem contribuir para que as células neoplásicas escapem da ação do sistema imunológico (ZHOU et al., 2010).

Posteriormente, Warburg levantou a hipótese de que as células tumorais teriam um metabolismo mitocondrial danificado, no entanto, a hipótese de defeito mitocondrial foi descartada, sendo demonstrado que células tumorais podem realizar fosforilação oxidativa mesmo com inibição glicolítica (GATENBY e GILLIES, 2004). ROSSIGNOL et al. (2004) mostraram que o metabolismo mitocondrial deficiente em células tumorais (Hela) pode ser melhorado significativamente alterando somente a oferta de substrato, já que a fosforilação oxidativa tem capacidade de se adaptar funcionalmente e estruturalmente a glutaminólise. Vários mecanismos são propostos para explicar a baixa atividade da fosforilação oxidativa nas células tumorais, entre estes: a diminuição do pH citosólico (como resultado do aumento na produção de lactato), a competição entre fosforilação oxidativa e glicólise pelo ADP e fosfato inorgânico e, danos à membrana mitocondrial interna provocado por radicais livres, entre outros (DIAZ-RUIZ et al., 2009).

Embora a hipótese de Warburg seja bastante antiga, alguns mecanismos adaptativos que levam ao aumento do metabolismo glicolítico nessas células já foram claramente descritas ao passo que outras não foram suficientemente esclarecidas. As primeiras sugestões dessas alterações foram propostas por BUSTAMANTE et al., (1981), que acreditavam que a distribuição subcelular da hexoquinase (HK), uma das enzimas chaves da via glicolítica, poderia ser a principal causa do aumento da glicólise em tumores (RISTOW, 2006). Já foi visto que nas células tumorais ocorre aumento da expressão desta enzima, especialmente a isoforma II (BAYLEY e DEVILLE, 2012), como também um aumento da atividade em células tumorais de mama MCF-7 e MDA-MB-231 quando comparadas com a linhagem controle, a MCF10-A (ZANCAN et al., 2010). Ao contrário das células normais, em que a HK encontra-se no citosol, a célula tumoral possui a HK localizada, principalmente, na membrana mitocondrial externa, ancorada ao canal de ânion dependente de voltagem (VDAC). Alguns estudos sugerem

que esta localização da HK exerce um papel importante de resistência à apoptose, impedindo a interação de proteínas pró-apoptóticas ao VDAC e, conseqüentemente, impedindo a liberação de citocromo *c* e outros fatores apoptóticos da mitocôndria (PEDERSEN, 2007; BHARDWAJ, 2010; WENNER, 2011; WOLF, 2011).

Além disso, já foi observado que esse fenômeno é devido em parte pela regulação estimulatória de transportadores de glicose, como o GLUT 1, que substancialmente aumenta a captação de glicose para o citoplasma (DEBERARDINIS et al., 2008; HSU e SABATINI, 2008; JONES e THOMPSON, 2009). Este transportador pode ser ainda alvo da proteína quinase ativada por AMP (AMPK), considerada o principal sensor energético celular da razão ATP/AMP, promovendo assim a manutenção da homeostasia energética (CARLING et al., 2004). Esta proteína é capaz de ativar GLUT 1 e GLUT 4, aumentando as taxas de glicólise e degradação de ácidos graxos para compensar quedas nos níveis de ATP. Desta forma, a atividade da AMPK foi interpretada como facilitadora da progressão tumoral (ASHRAFIAN, 2006).

Outro ponto recentemente evidenciado é a alteração na expressão de isoformas da enzima chave da glicólise, a fosfofrutocinase (PFK) (ZANCAN et al., 2010). A reação catalisada por esta enzima é considerada o principal ponto de controle de todo o fluxo glicolítico e conseqüentemente da síntese de ATP (UYEDA, 1979; KEMP e FOE, 1983). Num artigo recentemente publicado na *Molecular Genetics and Metabolism*, pelo nosso grupo de pesquisa, intitulado *Differential expression of phosphofructokinase-1 isoforms correlates with the glycolytic efficiency of breast cancer cells*, foi evidenciado que a expressão da isoforma L da PFK se correlaciona positivamente com a progressão da malignidade, com a eficiência glicolítica (lactato produzido por glicose consumida) e, conseqüentemente, com a agressividade do tumor. Ou seja, a sobrevivência das células cancerígenas, depende da expressão preferencial da isoforma L da PFK em detrimento das isoforma M e P (ZANCAN et al., 2010). Além disso, foi observado que células cancerosas podem aumentar sua capacidade de biossíntese de macromoléculas através da expressão preferencial de uma isoforma da piruvato quinase, a PK-M2. Essa enzima catalisa a conversão irreversível do fosfoenolpiruvato a piruvato, porém, de forma mais lenta que outras isoformas, permitindo, assim, o desvio dos intermediários da via glicolítica para outras vias anabólicas, como a via das pentoses fosfato (CAIRNS et al., 2011).

Algumas características da glicólise aeróbica tumoral são efetivamente utilizadas como marcadores para procedimentos de diagnósticos e tratamentos do câncer. Um

exemplo é a tomografia de emissão de pósitrons (PET), que se baseia na utilização de um análogo da glicose, o flúor-deoxiglicose (FDG). Esta técnica é baseada no aumento da capacidade das células tumorais em captar glicose (*efeito warburg*). Como a sonda FDG não é metabolizada, esta se acumula nos tecidos facilitando a identificação dos tumores (KHERLOPIAN et al., 2008). Além da sua utilização para diagnóstico, a glicólise aeróbica serve como uma importante ferramenta para a terapia antineoplásica. Esta abordagem é conhecida como Terapia Metabólica (MORENO-SÁNCHEZ et al., 2007) e baseia-se no fato das células tumorais apresentarem-se mais sensíveis ao tratamento com os inibidores do metabolismo energético do que as células saudáveis, já que a glicólise aeróbica aumentada é somente observada em cânceres (WARBURG, 1956; MORENO-SÁNCHEZ et al., 2007).

Como vimos anteriormente, o câncer é essencialmente uma doença genética e por muito tempo seu estudo e busca por terapias focou em mutações e terapia gênica. Entretanto esta abordagem se deparou com uma enorme e complexa variabilidade. Apesar da reprogramação metabólica aqui descrita emergir de diferentes maneiras, ela aparentemente ocorre de maneira consistente em virtualmente todos os tipos tumorais e distingue estas de células saudáveis. Desta maneira, a reversão e/ou inibição desta pode constituir uma abordagem eficiente na busca por melhores terapias e com menos efeitos colaterais. Além disso, uma combinação de inibidores do metabolismo energético com outros fármacos antitumorais poderia aumentar a eficácia do tratamento do câncer (KROEMER e POUYSSEGUR, 2008).

Neste contexto, vários compostos têm sido desenvolvidos e estudados, tanto *in vitro* como *in vivo*, tendo como alvo tanto o metabolismo glicolítico, como também o metabolismo mitocondrial, duas importantes vias de produção de ATP, para o tratamento de neoplasias. Dentre esses agentes, destaca-se o clotrimazol (CTZ), utilizado atualmente na clínica como antifúngico e que vem apresentando promissores efeitos antitumorais. Várias publicações já mostraram a capacidade do CTZ em diminuir a viabilidade celular, como de células CT-26 de adenocarcinoma do cólon e células de Lewis de carcinoma do pulmão (PENSO e BEITNER, 2002a e 2002b), de células A172, T98G, C6 e C9 de glioblastoma (KHALID et al., 1999 e 2005), de células B16 de melanoma (GLASS-MARMOR et al., 1996; GLASS-MARMOR e BEITNER, 1997), de células CCL229 de câncer de cólon humano (ZHAO e SONG, 2002), de células derivadas do câncer de mama, MCF-7 e MDA-MB-231 (MEIRA et al., 2005; FURTADO et al., 2012), como também em tecidos mamários humanos tumorais

retirados de pacientes com câncer de mama (COELHO et al., 2011) e de ratos com glioma intracranial (KHALID et al., 2005).

1.3 METABOLISMO GLICOLÍTICO

O transporte da glicose, uma molécula altamente polar, é realizado através de difusão facilitada, portanto a favor de seu gradiente de concentração, e dependente de GLUTs na superfície de todas as células (BELL et al., 1990). Esta hexose pode ser advinda da nutrição exógena (alimentação do indivíduo ou administração venosa) ou do metabolismo glicolítico endógeno (através da conversão do glicogênio armazenado do fígado novamente à glicose); esta entrará na corrente sanguínea e será utilizada. O papel da glicose é, então, fornecer energia química e metabólitos para a manutenção e o funcionamento dos diversos tecidos do organismo e, essa energia pode ser disponibilizada tanto a partir de processos aeróbios quanto anaeróbios (GUYTON e HALL, 2002; ARONOFF et al., 2004). Na maioria das células de mamíferos, a presença de O₂ leva ao aumento do metabolismo mitocondrial (processo aeróbico), aumentando o estado energético da célula e, conseqüentemente, inibindo a glicólise (RACKER, 1974). Nas células capazes de metabolizar glicose independentemente do consumo de O₂ (processo anaeróbio), como os tumores, o piruvato que é o produto final da glicólise é majoritariamente convertido em lactato (NELSON e COX, 2000; GATENBY e GILLIES, 2004).

A oxidação da glicose é conhecida como glicólise ou via de Embden-Meyerhof (**Figura 3**) em mamíferos e é principal via no fornecimento de energia à maioria das células. Devido a sua capacidade de disponibilizar ATP rapidamente e não depender do metabolismo oxidativo e, conseqüentemente, da presença de O₂, esta via assume fundamental importância para a sobrevivência celular (STANLEY e CONNETT, 1991), sendo, portanto, fortemente regulada por vários mecanismos diferentes (BEITNER et al., 1979). A glicólise consiste em dez reações sequenciais que convertem uma molécula de glicose em duas moléculas de piruvato (**Figura 3**), sendo essas etapas separadas em duas fases.

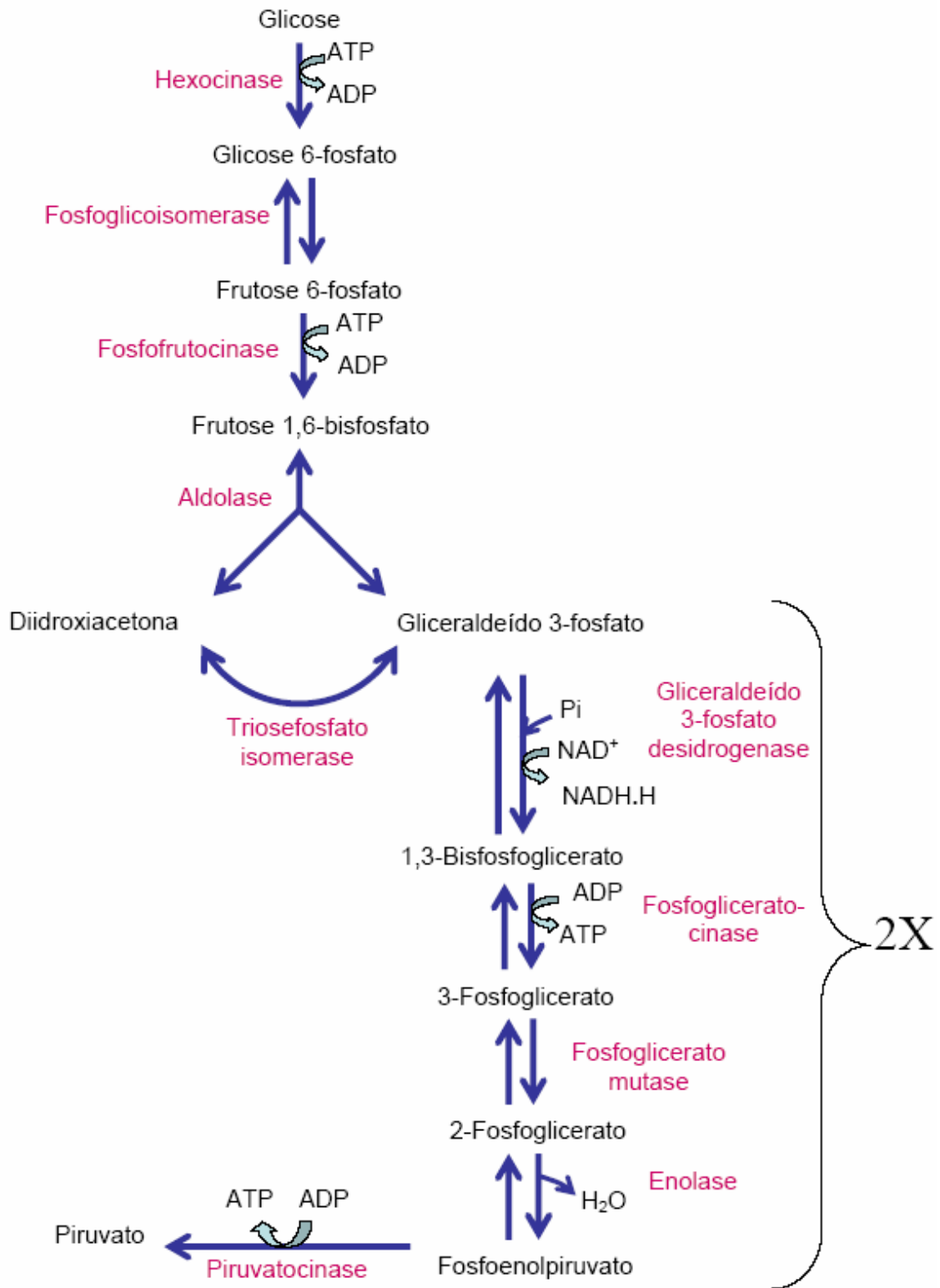


Figura 3. Via Glicolítica (NELSON e COX, 2000).

A primeira reação é catalisada pela hexocinase (HK), uma das três enzimas reguladoras do fluxo glicolítico. Essa enzima catalisa uma reação irreversível em condições fisiológicas, que consiste na transferência de um grupamento fosfato do ATP para a glicose formando glicose 6-fosfato (G6P) (GROSSBARD e SCHIMKE, 1966). A membrana celular é impermeável à G6P, que pode por isso ser acumulada na célula (WILSON, 2003). A G6P pode ser utilizada na síntese do glicogênio, para produzir outros compostos de carbono na via das pentoses fosfato, ou ser degradada para produzir energia através da glicólise. Para poder ser utilizada na produção de energia, a G6P é primeiro isomerizada a frutose-6-fosfato (F6P) pela enzima fosfoglicoisomerase.

A F6P é depois fosforilada originando frutose-1,6-bisfosfato (F1,6BP). Esta reação é catalisada pela fosfofrutocinase (PFK), ocorrendo a transferência irreversível, em condições metabólicas, do grupamento fosfato gama terminal do ATP para a F6P (UYEDA, 1979). Esta é a segunda reação chave da via, sendo descrita como um potencial alvo para o controle do crescimento celular devido a estreita atividade enzimática e a taxa de glicólise (UYEDA, 1979; KEMP e FOE, 1983; SOLA-PENNA et al., 2010). Por ser considerada a principal enzima da via glicolítica, a PFK está sujeita a uma forte regulação metabólica.

A quarta reação consiste na hidrólise da F1,6BP em dois produtos de 3 carbonos, dihidroxiacetona fosfato e gliceraldeído-3-fosfato, que são facilmente interconvertíveis por isomerização, através da ação da triosefosfato isomerase. Portanto, basta uma via metabólica para degradar as duas (NELSON e COX, 2000). É uma reação tão exergônica que pode ser usada para produzir ATP. A produção de ATP é feita em dois passos. No primeiro, dá-se a oxidação do gliceraldeído-3-fosfato e a fosforilação do ácido produzido, formando 1,3-bisfosfoglicerato através da reação catalisada pela gliceraldeído 3-fosfato (GAPDH). O grupo fosfato do carbono 1 do 1,3-bisfosfoglicerato pode por isso ser transferido para ADP, produzindo ATP e formando 3-fosfoglicerato (ETO et al., 1999). Este produto é isomerizado a 2-fosfoglicerato pela fosfoglicertao mutase, que depois de desidratado e perder H₂O dá origem a um fosfoenol, o fosfoenolpiruvato pela enzima enolase.

Devido ao seu elevado potencial de transferência de fosfato, o fosfoenolpiruvato pode transferir um fosfato ao ADP formando piruvato. Esta é a última reação da via e é catalisada pela piruvato cinase (PK), sendo a terceira enzima que catalisa uma reação irreversível, em condições fisiológicas, da via glicolítica (GUPTA et al., 1976).

Na glicólise gastam-se, portanto, duas moléculas de ATP (primeira fase até a formação das duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato), e produzem-se quatro moléculas de ATP. O NAD^+ tem que ser regenerado, caso contrário a glicólise é interrompida, uma vez que NAD^+ é substrato de uma das reações. Em condições aeróbicas, o NADH transfere os seus elétrons para a cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria. Na ausência de O_2 , o NADH transfere os seus elétrons para o próprio piruvato, dando origem ao lactato através da ação da enzima lactato desidrogenase (LDH) (**Figura 4**) (NELSON e COX, 2000; BROOKS, 2000).

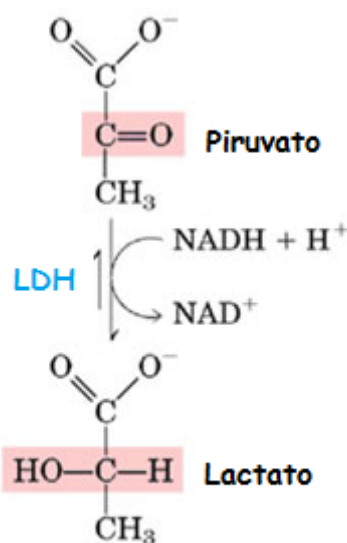


Figura 4. Reação catalisada pela lactato desidrogenase (NELSON e COX, 2000).

Como dito anteriormente, células com grande demanda energética como as células cancerígenas adaptam seu metabolismo para uma rápida e eficiente produção de energia, o que leva a uma maior produção de lactato (GATENBY e GILLIES, 2004). De fato, diversos trabalhos têm evidenciado uma relação direta entre o aumento do metabolismo de células cancerígenas com uma maior produção de lactato (GATENY e GILLIES, 2004; HSU e SABATINI, 2008). Tecidos tumorais possuem diferentes ambientes no que se refere a vascularização e conseqüentemente a pressão de O_2 . Em massas tumorais sólidas as regiões mais internas são menos vascularizadas e possuem uma taxa glicolítica mais elevada comparada as células mais periféricas (DENKO,

2008). Além disso, FANTIN et al., (2006), demonstraram que a inibição da atividade da LDH confere menor habilidade das células tumorais de se proliferarem sob hipóxia, indicando a importância desta enzima para a manutenção do tumor.

Devido ao importante papel regulatório na glicólise, as enzimas HK, PFK e PK são um dos principais alvos metabólicos de estudo para a inibição da via glicolítica, visando o tratamento do câncer. Um exemplo, o CTZ, apresenta alta capacidade inibitória sobre a atividade dessas enzimas. Esse efeito inibitório já foi observado em modelos de cultura de células tumorais (MEIRA et al., 2005; FURTADO et al., 2012), em tecidos tumorais mamários humanos (COELHO et al., 2011) e em modelos simples através de enzimas purificadas (ZANCAN et al., 2007; MARCONDES et al., 2010 e 2011). Alguns inibidores sintéticos destas enzimas, como 2-desoxiglicose, lonidamina e 3-bromopiruvato, já se encontram em estudos pré-clínicos (ZHAO, 2011; WOLF, 2011; GONG, 2011).

O fármaco CTZ, que é molécula de estudo deste trabalho, será abordado mais detalhadamente no ponto 1.6 dessa introdução.

1.4 METABOLISMO MITOCONDRIAL

O piruvato formado a partir da glicólise pode seguir diferentes vias metabólicas dependendo da célula em questão e do perfil metabólico em que a mesma se encontra. Vimos na sessão anterior que em condições anaeróbicas, o piruvato produzido é reduzido a lactato (BROOKS, 2000). Por outro lado, em condições aeróbicas, o lactato, como também os lipídios e aminoácidos convergem para uma etapa final que envolve a doação dos elétrons removidos desses nutrientes para o O_2 . Este processo ocorre na cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, gerando H_2O e liberando energia. A energia liberada é conservada primeiramente na forma de um gradiente transmembranar de prótons e, posteriormente, na forma de ATP, sintetizado via fosforilação oxidativa (MITCHELL, 1966).

A cadeia respiratória é composta por cinco complexos enzimáticos, onde ocorre uma gradativa transferência de elétrons para a redução do O_2 e síntese de ATP. Estes elétrons são removidos do NADH e $FADH_2$ e transferidos para o O_2 através de uma série de passos catalisados por diferentes enzimas, em que cada passo libera uma

pequena quantidade de energia. Este conjunto de enzimas, designados complexos I (NADH desidrogenase), II (succinato Q oxidoredutase), III (Q citocromo c oxidoredutase) e IV (citocromo c oxidase), constitui a cadeia respiratória e encontra-se na membrana interna da mitocôndria. Durante esta transferência, prótons H^+ são expelidos da matriz para o espaço intramembranar, gerando um gradiente eletroquímico responsável pelo potencial de membrana mitocondrial. Este potencial de membrana de ordem de 180 mV contribui para o armazenamento de energia livre disponível para a consequente reação de síntese de ATP no complexo V, que ocorre através do acoplamento de ADP mais fosfato inorgânico (COX e NELSON, 2000).

Além da fosforilação oxidativa, a mitocôndria desempenha diferentes funções na regulação de vários processos celulares, exerce um papel central na regulação da sinalização por Ca^{2+} , na produção de ROS, no controle do pH e na liberação de fatores indutores de apoptose (SARASTE, 1999; DZEJA et al., 2000). Assim sendo, da mitocôndria dependem processos vitais para a célula, responsáveis não apenas pela sobrevivência, mas também pela longevidade celular (DZEJA et al., 2001). Estas organelas estão intimamente ligadas a homeostase celular porque, apesar de variarem na quantidade (de centenas a mais de 1000 por células) e distribuição, sua localização está próxima aos pontos onde existe grande consumo de energia. Isto indica uma estreita relação entre as mitocôndrias e a necessidade energética da célula, corroborando a sua função, dentre muitas, de síntese de 90% do ATP celular através da fosforilação oxidativa (WALLACE, 1997). Por esses motivos, a mitocôndria tem sido considerada um importante alvo terapêutico no estudo de compostos antitumorais (WALLACE e STARKOV, 2000; OTT et al., 2007; ROMERO-GRACIA et al., 2011).

Os efeitos tóxicos sobre as mitocôndrias podem ocorrer tanto por mecanismos diretos como indiretos, incluindo a quebra de homeostasia intracelular de íons, inibição enzimática, danos as membranas celulares, anóxia, alterando além da fosforilação oxidativa, a atividade do ciclo de Krebs (RAHN, et al., 1991).

O ciclo de Krebs ou ciclo dos ácidos tricarboxílicos (CAT) é composto por uma série de oito reações cíclicas e intramitocondriais descobertas por Hans Krebs em 1937, na qual quatro delas são oxidativas e liberam energia, que é conservada sob a forma de coenzimas reduzidas. Cada ciclo consome uma molécula de acetil CoA e duas de O_2 , e são formadas duas moléculas de CO_2 , três de NADH, uma de $FADH_2$ e uma de GTP (KREBS et al., 1953). O acetil CoA participa da primeira reação do CAT que é a sua condensação com oxaloacetato, dando origem a um composto de seis carbonos, o citrato

que através da aconitase vira isocitrato. A oxidação de isocitrato em α -cetogluturato origina uma molécula de CO_2 , reação esta dependente de NADH. Posteriormente, ocorre outra oxidação agora na presença da coenzima A, liberando mais uma molécula de CO_2 e a conversão de α -cetogluturato em succinil CoA, que possui uma ligação tioéster altamente energética. Na próxima etapa, quando esta ligação é quebrada para formar succinato, ocorre a liberação de energia livre para a síntese de GTP. O succinato, por sua vez, é oxidado a fumarato pela única enzima do ciclo ligada a membrana mitocondrial, a succinato desidrogenase (SDH). Nesse estágio ocorre a passagem de elétrons do succinato para a molécula flavina adenina dinucleotídeo (FAD). O fumarato é hidratado e convertido a malato, o qual sofre uma reação de oxidação, regenerando o oxaloacetato, que mais uma vez pode participar da reação de condensação com acetil CoA, dando continuidade ao ciclo (KREBS, 1953; VOET, 2000).

Morfologicamente, as mitocôndrias são organelas citoplasmáticas presentes na maioria das células eucarióticas que possuem uma forma cilíndrica e alongada com um diâmetro médio entre 0,2 a 2 μm . Possuem duas membranas altamente especializadas, uma externa, lisa, e outra interna, que apresenta invaginações formando as cristas mitocondriais (ALBERTS et al., 2004). Nestas cristas, ocorre o transporte de elétrons, a geração de um gradiente de prótons e a formação de ATP pela ATP sintase. O espaço entre as duas membranas tem grande importância fisiológica. Neste espaço se encontram enzimas com funções importantes dentro do metabolismo energético como citocromo c, creatina quinase e adenilato quinase. No seu interior ou matriz mitocondrial localiza-se o DNA mitocondrial, os ribossomos mitocondriais, os RNAs e várias enzimas, como as enzimas do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, exceto pela succinato desidrogenase, que é ligada a membrana interna, da β -oxidação de ácidos graxos, entre outros elementos (**Figura 5**) (FREY e MANNELLA, 2000). A membrana mitocondrial externa possui proteínas chamadas porinas, que são poros não específicos para solutos com massa molecular menor que 10 kDa, sendo livremente permeável a íons e outros metabólitos. Por outro lado, a membrana interna é muito mais seletiva, sendo impermeável a íons, o que acaba criando uma diferença de potencial entre a membrana interna e a matriz mitocondrial (KESSEL et al., 1997). Alterações nessa estrutura mitocondrial ocorrem quando há modificação do estado funcional da organela (HERTSENS e JACOB, 1987) e também podem ser passos iniciais de algumas formas de morte celular. Como exemplos, o inchaço mitocondrial com perda da integridade da

membrana externa pode ser um evento iniciador da morte celular necrótica ou apoptótica (KOWALTOWSKI et al., 2001)

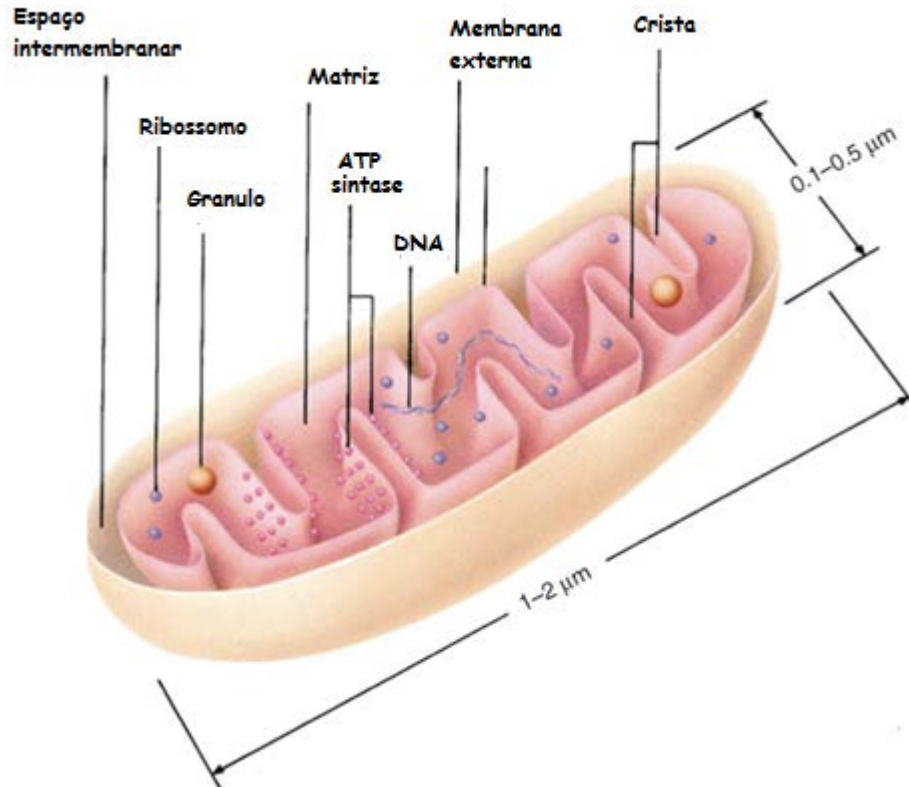


Figura 5. Estrutura interna mitocondrial (FREY e MANNELLA, 2000).

Também já foi estabelecido que o número e a morfologia das mitocôndrias são controlados pela velocidade dos processos de fusão e fissão (BEREITNER-HAHN e VOTH, 1994). As mitocôndrias são formadas a partir da divisão e crescimento de mitocôndrias preexistentes. E pelo fato das mitocôndrias estarem constantemente se fusionando e dividindo (fissão), um descontrole nesses processos leva a alterações na sua morfologia. A interrupção da fusão causa fragmentação da morfologia tubular normal em pequenas mitocôndrias em forma de bastões ou esferas. Já a interrupção da fissão gera longos filamentos tubulares interconectados (CHEN e CHAN, 2005).

Como relatado anteriormente, as mitocôndrias têm fundamental importância nos processos de produção de ROS (SOLAINI et al., 2010). Por sua vez, a superprodução ou acúmulo de ROS leva a disfunção mitocondrial (por lesar o DNA mitocondrial), a

oxidação de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. Assim, danos oxidativos induzidos por ROS parecem ser os principais responsáveis pela instabilidade genética mitocondrial que resulta em disfunção da organela (GOGVADZE et al., 2010). Na próxima sessão, o processo de estresse oxidativo causado por ROS será detalhado.

1.4.1 ESTRESSE OXIDATIVO

Estresse oxidativo é uma expressão usada para descrever vários processos deletérios resultantes de um desequilíbrio entre a formação excessiva de ROS e uma limitada defesa antioxidante. Aumentos descontrolados desses ROS conduzem a reações em cadeia com proteínas, lipídeos, polissacarídeos e DNA (DROGE, 2002).

Os antioxidantes agem prevenindo a formação ou detoxificando os radicais livres e sequestrando os ROS ou seus precursores (HALLIWELL, 1997). Os três principais sistemas redox encontrados nas células são: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatase NADPH/NADP, tioredoxina (TRX_{red}/TRX_{ox}) e glutathiona (GSH/GSSG) sendo o último o mais importante pois as concentrações de glutathiona são de 500 a 1000 vezes maiores do que de TRX e NADPH. Mudanças na glutathiona reduzida/oxidada refletem diretamente em alterações redox intracelular (SCHAFER e BUETTNER, 2001).

Além desses antioxidantes, o metabolismo alterado de glicose com o acúmulo de glicose 6-fosfato é indicado como um importante componente da desintoxicação metabólica por H_2O_2 (SPITZ et al., 2000 e ANDRINGA et al., 2006). A explicação para este fenômeno decorre do fato de que o aumento do metabolismo de glicose aumenta a capacidade de regenerar $NADP^+$ a partir de NADPH através da via das pentoses fosfato (NATH et al., 1995; LIN et al., 2003 e AHMAD et al., 2005). O NADPH produzido a partir da via das pentoses fosfato serve como fonte de elétrons para a desintoxicação de H_2O_2 através do sistema antioxidante da glutathiona (BERGGREN et al., 2001).

Múltiplos processos fisiológicos, tais como, envelhecimento, diferenciação e morte celular, função imunitária e várias doenças, como o câncer, estão relacionados com a concentração de ROS celular. É descrito na literatura, que em baixas concentrações, ROS pode induzir a proliferação celular, enquanto que em elevadas concentrações pode ativar vias de sinalização celular que conduzem à interrupção do ciclo celular e à morte celular por apoptose e/ou necrose (MCELIGOT, et al., 2005; LI

et al., 2007). Em baixas concentrações, ROS são considerados uma significativa classe de carcinogênicos, participando da iniciação, progressão e metástase das neoplasias. ROS gerados no ambiente intracelular podem produzir diretamente alterações em uma fita ou na dupla fita de DNA, oxidando as bases pirimidinas, purinas, e desoxirriboses, levando à mutagênese (AMES, 1983). Dados da literatura mostraram que peróxido de hidrogênio é produzido e excretado por células tumorais (SZATROWSKI e NATHAN, 1991), confirmando sua importância na propagação e invasão tumoral. Além disso, agregados de DNA alterados em genes podem ativar proto-oncogenes ou desativar genes supressores de tumor (NOWSHEEN et al., 2009).

Por outro lado, a alta concentração de ROS, promovida por algumas moléculas e fármacos, é considerada como um importante mecanismo de ação indutor de morte celular por fármacos antineoplásicos. Um exemplo é o quimioterápico paclitaxel (PTX), também conhecido por taxol, um eficaz agente utilizado para o tratamento de diversos tipos de tumores, incluindo o carcinoma de mama (HOLMES et al., 2010). Sua ação antitumoral consiste na estabilização dos microtúbulos, prevenindo a despolimerização e, conseqüentemente, inibindo a reestruturação do citoesqueleto durante a mitose (LIEBMANN et al., 1994). Entretanto, ALEXANDRE et al., (2006), observaram que o PTX é também capaz de promover um estado de estresse oxidativo celular, provocado pelo aumento na produção de ROS, o que configura um novo mecanismo de ação pelo qual o PTX promove a morte de células tumorais. Quando este age em conjunto com um conhecido inibidor da glicólise (2-deoxiglicose), ocorre um aumento ainda maior nos indicadores do estresse oxidativo, como H_2O_2 e GSSG, promovendo, conseqüentemente, um aumento na morte celular. Outros fármacos apresentaram efeito similar: o dicloroacetato e trióxido de arsênio em linhagem de câncer de mama (SUN et al., 2011), e a dexametasona em células β pancreáticas (ROMA et al., 2009).

Esses dados sugerem que o estresse oxidativo, caracterizado pelas altas concentrações de ROS, constitui um efetivo mecanismo de ação indutor da morte celular. Os diferentes tipos de morte celular serão abordados no próximo tópico.

1.5 MORTE CELULAR

O desenvolvimento do câncer está associado ao rompimento do equilíbrio entre o crescimento e morte celular. O balanço entre a taxa de proliferação e de morte celular

determina a taxa de crescimento do tumor. Alguma alteração entre esses dois fatores pode ser o elemento chave para a expansão descontrolada de tumores malignos e, posteriormente, sua capacidade de invasão (HAJRA e LIU, 2004; MESTER e REDEUILH, 2008). De modo geral, estímulos tóxicos ou deletérios a célula podem desencadear a morte celular por necrose ou apoptose, as quais são diferenciadas através de aspectos morfológicos e/ou através de vias bioquímicas celulares (KUWANA e NEWMEYER, 2003; FOSTER, 2008).

A necrose é evidenciada por aumento citoplasmático, ruptura da membrana plasmática, inchaço das organelas citoplasmáticas e condensação da cromatina nuclear (KROEMER et al., 2007). Durante a necrose, a célula aumenta de volume, as mitocôndrias dilatam-se, juntamente com o retículo endoplasmático, e há desagregação dos ribossomos (UCHIYAMA, 1995). Há alteração na permeabilidade da membrana, por diminuição nos níveis de ATP comprometendo, assim, a bomba de Na^+/K^+ e outros fenômenos que são ATP-dependentes (TRUMP et al., 1997). Isso resulta no rompimento de organelas e da membrana plasmática e liberação de componentes intracelulares, ocasionando uma reação inflamatória local. Ainda que o material necrótico seja removido por fagócitos, a inflamação causa danos locais significativos (KERR et al., 1995; BOUJRAD et al., 2007).

A apoptose é um processo natural de morte celular que tem características mais desejáveis que a necrose. É um fenômeno observado durante o desenvolvimento e a maturação celular ou em resposta a infecções patológicas ou a outros danos irreparáveis à célula (RAFF, 1992; STRASSER et al., 2000). É considerado um importante mecanismo homeostático para a manutenção de células e tecidos (NORBURY e HICKSON, 2001). A perda do controle do processo apoptótico contribui para o aparecimento de várias doenças, incluindo o câncer, além de outras patologias neurodegenerativas (ORTEGA-CAMARILLO et al., 2001). A apoptose é manifestada por redução do volume do núcleo e citoplasma, enrugamento da membrana (*blebbing*), condensação da cromatina e fragmentação nuclear (KERR et al., 1972; YASUHARA et al., 2003). As características bioquímicas incluem clivagem do DNA, externalização da fosfatidilserina e clivagem proteolítica de substratos intracelulares (MARTIN et al., 1995). A apoptose pode ser também desencadeada via mitocôndria. Através desse mecanismo, ocorre a liberação de citocromo c da mitocôndria para o citoplasma (KLUCK et al., 1997). O citocromo c liberado liga-se ao fator ativador de proteases apoptótico (Apaf 1) que, juntamente com a caspase 9, ativa caspase 3 e dispara a

apoptose (ZOU et al., 1997; BRAS et al., 2005). Como resultado das mudanças na membrana plasmática, as células apoptóticas são rapidamente fagocitadas antes do extravasamento do conteúdo intracelular e sem indução de resposta inflamatória. A apoptose também ocorre como um mecanismo de defesa durante reações imunes ou quando as células são danificadas por doenças ou agentes nocivos (NORBURY e HICKSON, 2001).

Dessa maneira, descobrir o mecanismo pelo qual o fármaco com atividade antitumoral promove a morte celular, seja por apoptose ou por necrose, é o objetivo deste trabalho.

1.6 CLOTRIMAZOL

O clotrimazol (CTZ) é um composto químico azólico, primeiramente sintetizado por BUCHEL et al., (1972), com ação fungistática, terapeuticamente importante, clinicamente seguro e tolerado por humanos (BURGESS e BODEY, 1972; BRUGNARA et al., 1995). Possui um anel imidazolínico ligado a uma molécula de bisfenil-(o-clorofenil)-carbinol com fórmula molecular $C_{22}H_{17}ClN_2$ (**Figura 6**) e massa molecular de 344,85g. Na sua fase sólida apresenta-se na forma de cristal branco que apresenta pouca solubilidade em água, sendo melhor solubilizado em solventes como o DMSO (dimetilsufóxido).

Este fármaco é útil no tratamento de infecções por dermatófitos, infecções fúngicas superficiais e várias infecções por *Candida albicans*, incluindo candidíase oral e vaginal. Seu amplo espectro e potente atividade foram confirmados em vários estudos (PLEMPEL e BARTMANN, 1972; SHADOMY et al., 1982). O CTZ possui diversas denominações comerciais, tais como Canesten[®] (Bayer), Gino-canesten[®] (Bayer), Micotrizol[®] (Eurofarma), Tricosten[®] (Farmion Lab), entre outras.

A ação antifúngica da classe dos azóis, entre eles o CTZ, deve-se a uma alteração na permeabilidade da membrana celular dos fungos causada pela inibição da síntese de ergosterol, um importante esterol que compõe a membrana celular dos fungos. Este esterol tem um papel importante na fluidez e na integridade da membrana, bem como na regulação do crescimento e proliferação celular; exercendo funções semelhantes as do colesterol em células animais. 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 estero1-14- α -demetilase, prejudicando a síntese do ergosterol na membrana citoplasmática, o que leva ao acúmulo de 14- α -metilesteróis. Os 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). A presença do ergosterol em membranas celulares de fungos bem como sua ausência em membranas animais, o tornou um alvo bastante útil para ação de fármacos antifúngicos (ROBERTS et al., 2003; BERGOLD e GEORGIADIS, 2004).

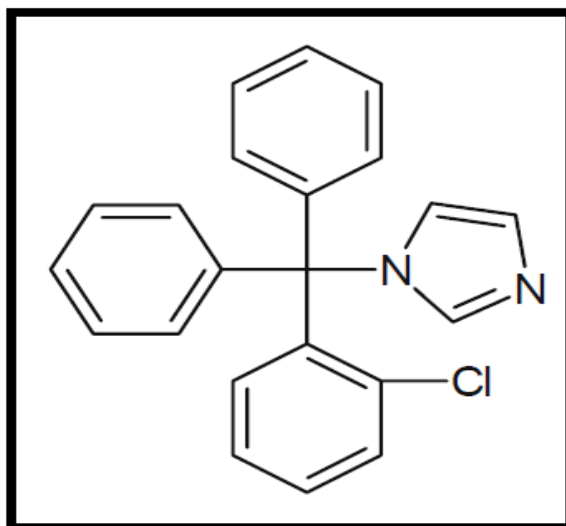


Figura 6. Estrutura química do clotrimazol.

Em 1993, o CTZ foi reconhecido como antagonista de calmodulina (CaM) (HEGEMANN et al., 1993). A CaM é uma proteína multifuncional ligadora de Ca^{2+} envolvida na regulação de inúmeros eventos celulares, inclusive no crescimento e proliferação celular (REDDY, 1994). De acordo com dados da literatura, os níveis de CaM em células cancerígenas são elevados, como também há uma correlação positiva entre a taxa de crescimento e os níveis de CaM em células cancerígenas. Os antagonistas de CaM estão associados à diminuição da viabilidade de vários tipos celulares (MAC NEIL et al., 1993). Baseado nesses achados e devido a evidências de

que a CaM estaria envolvida em infecções fúngicas, HEGEMANN et al., (1993) investigaram o efeito de diferentes antifúngicos sobre a atividade da CaM. Vários derivados azólicos foram testados, inclusive o CTZ, e o resultado obtido foi que esses fármacos foram capazes de inibir a atividade da CaM. Em contrapartida, antifúngicos pertencentes a outras classes químicas não apresentaram atividade inibitória. A partir desses resultados, os antifúngicos azólicos foram considerados antagonistas de CaM.

1.6.1 CLOTRIMAZOL NO TRATAMENTO DO CÂNCER

O caráter antagônico de CaM encontrado para os antifúngicos azólicos, estimularam o estudo destes agentes sobre o metabolismo energético de células cancerígenas, uma vez que estas células são caracterizadas por ter um metabolismo energético exacerbado necessário para a promoção do crescimento e proliferação tumoral.

Inicialmente, essas pesquisas foram desenvolvidas por um grupo de Israel coordenado por Rivka Beitner, na década de 90. Este grupo mostrou, através da publicação de vários artigos, a capacidade desses antagonistas de CaM em diminuir a viabilidade de linhagens tumorais. Estes estudos demonstraram que o CTZ diminuiu os níveis de glicose-1,6-bisfosfato, frutose 1,6-bisfosfato de células de melanoma B16 de maneira tempo e dose dependente (GLASS-MARMOR et al., 1996). A queda na concentração da glicose-1,6-bisfosfato leva a uma diminuição da atividade da PFK, que é refletida pela queda drástica dos níveis de frutose-1,6-bisfosfato, que além de ser produto da reação da PFK é também um ativador alostérico desta enzima. Essa redução está fortemente relacionada ao decréscimo do conteúdo de ATP celular. Sabe-se que o decréscimo nos níveis de ATP causa uma série de anormalidades celulares, uma vez que o mesmo é requerido para os processos dependentes de fosforilação, transporte e assim, sua queda pode levar à morte celular. Em células CCL229 de câncer de cólon humano, o CTZ promoveu a morte celular por apoptose, através do esgotamento de cálcio celular (ZHAO e SONG, 2002). Promoveu também o desligamento das enzimas glicolíticas PFK e aldolase do citoesqueleto de células de melanoma B16 (GLASS-MARMOR et al., 1997) e de células de Lewis de carcinoma de pulmão e de células CT-26 de adenocarcinoma do cólon (PENSO e BEITNER, 2002a). Esse desligamento promove a diminuição do nível de ATP e consequentemente da viabilidade celular (PENSO e

BEITNER, 2002b). Outro alvo para esse fármaco é a enzima hexocinase. A HK, como relatado anteriormente é, até então, a única enzima da via glicolítica capaz de se ligar a mitocôndria (BRDICZKA, 1991). A HK ligada a mitocôndria utiliza preferencialmente o ATP gerado mitocondrialmente, o que favorece a atividade da enzima (VIITANEN et al., 1984). PENSO e BEITNER, (1998) mostraram então que o CTZ, de maneira dependente da dose, promove o desligamento da HK da mitocôndria de células B16 de melanoma, o que diminui a viabilidade dessas células. Em 2005, MEIRA et al., mostraram que o CTZ 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. Essas mudanças ocorreram paralelamente ao desligamento da PFK e da aldolase dos filamentos de actina. Isto resultou na diminuição da viabilidade celular e dos níveis de ATP.

Em 2007, ZANCAN et al., investigaram o efeito direto do CTZ sobre a PFK purificada de músculo esquelético de coelho. O CTZ inibiu a atividade da enzima chave da glicólise através de alterações na sua estrutura quaternária: o fármaco induziu a formação de dímeros de PFK, reduzindo a população de tetrâmeros, os quais são mais ativos que os dímeros. Interessantemente, esse efeito foi independente da propriedade anti-CaM do fármaco, uma vez que seus efeitos não foram mimetizados pelo clássico antagonista de CaM, o composto 48/80. Através da análise da cinética da PFK na presença do CTZ foi observado a diminuição da afinidade da enzima pelos seus dois substratos, a frutose-6-fosfato e ATP (MARCONDES et al., 2010), efeito este inibido na presença da aldolase. Curiosamente, o inverso não é verdadeiro. A inibição da aldolase pelo CTZ não é alterado na presença da PFK (MARCONDES et al., 2011).

Recentemente, o CTZ inibiu a proliferação, migração e a via glicolítica de células câncer de mama, MCF-7 e MDA-MB-231 (FURTADO et al., 2012). Esses efeitos foram mais pronunciados na linhagem MDA-MB-231 do que na linhagem MCF-7. Este resultado revela que o efeito do CTZ aumenta com o aumento da agressividade da linhagem tumoral, visto que a MDA-MB-231 é uma linhagem tumoral metastática, e a MCF-7 não. Além de modelos de cultura de cultura célula, COELHO et al., 2011, utilizou extratos de tecidos mamários de pacientes em tratamento no Ambulatório de Ginecologia e submetido à cirurgia na mama no Hospital Clementino Fraga Filho (UFRJ), que apresentavam câncer de mama para avaliar o efeito do CTZ em sistemas mais complexos. Nessas condições, não somente a atividade enzimática da PFK foi comprometida, mas todo fluxo glicolítico, medido pela inibição do consumo de glicose

associado a baixa produção de lactato, sem contudo promover alterações significativas nos tecidos sadios (COELHO et al., 2011).

Diante de todo o exposto, o CTZ apresenta-se como uma molécula promissora no tratamento do câncer. E por isso, utilizamos esse fármaco para expandir nossos conhecimentos acerca do metabolismo tumoral.

Entretanto, o CTZ é uma molécula com grande caráter lipofílico. De fato, a solubilidade/dissolução constitui-se em fator essencial para efetividade dos fármacos independente da via de administração. Tal fato é considerado um desafio para a indústria farmacêutica já que mais de 40% das substâncias ativas hoje investigadas apresentam-se insolúveis ou pouco solúveis em meio aquoso (PRENTIS et al., 1998), como o CTZ. Várias técnicas têm sido empregadas para melhorar a solubilidade e a taxa de dissolução de fármacos pouco solúveis em água. Estas incluem a formulação com formas amorfas sólidas, microemulsões, dispersão sólida, formação de sais e de complexos solúveis em água. Através destas técnicas é possível aumentar a solubilidade aparente de compostos lipofílicos sem diminuir seu potencial terapêutico (LOFTSSON et al., 2005).

1.7. MICROEMULSÃO COMO UM PROMISSOR CARREADOR PARA MOLÉCULAS INSOLÚVEIS

Como a quimioterapia tem sido a principal base para a terapia do câncer, pesquisas extensivas estão sendo voltadas para o desenvolvimento de agentes antineoplásicos mais específicos, menos tóxicos e em terapias baseadas em mecanismos que envolvam vias moleculares essenciais dos tumores (GREEN, 2005). A maioria dos quimioterápicos atua inibindo a síntese de DNA ou mecanismos de replicação celular, sendo que a seletividade entre células normais e as tumorais é baixa e os efeitos colaterais são elevados. Além disso, a toxicidade desses fármacos limita seu uso, uma vez que muitos cânceres humanos apresentam-se quimioresistentes e ainda, podem causar danos no DNA de células normais (GARRETT e WORKMAN, 1999). Para superar tais limitações, corrobora-se a necessidade de buscar novas substâncias antitumorais e/ou novas abordagens terapêuticas capazes de auxiliar o tratamento do câncer (XU e MCLEOD, 2001).

O número de produtos farmacêuticos baseados em novos sistemas carreadores de fármacos tem aumentado significativamente nos últimos tempos e com tendência de crescimento para os próximos anos (VERMA e GARG et al., 2001). O planejamento e desenvolvimento de novos sistemas de transportes de moléculas visando o aumento da eficácia de fármacos existentes é um processo que continua crescendo na pesquisa farmacêutica. Recentemente, uma grande quantidade de estudos tem voltado sua atenção para o emprego de microemulsões (MEs) como sistema carreador de fármacos, principalmente depois que foi introduzido no mercado uma ME de uso oral, o Neoral®, carreador da ciclosporina (LAWRENCE, 1996). Contudo, desde sua introdução em 1943 por HOAR e SCHULMAN, as MEs atraem considerável atenção em vista de seu uso em muitos produtos, como tintas, refrigerantes, loções pós-barba, refrescantes bucais, substituintes do sangue, cosméticos e como carreadores de fármacos (BAKER et al., 1984; CONSTANTINIDES et al., 1995; TENJARLA, 1999), que é o objetivo deste trabalho.

As ME podem ser definidas como sistemas termodinamicamente estáveis e isotropicamente translúcidos de dois líquidos imiscíveis, estabilizados pela presença de tensoativos, e em alguns casos, de co-tensoativos. Estes sistemas podem ser do tipo óleo em água (O/A), onde uma pequena fase oleosa (fase dispersa) é intimamente dispersa em uma fase aquosa, que está em maior quantidade, também denominada de fase dispersante, ou (A/O), onde a fase dispersa é constituída por água ou componentes hidrofílicos, que são dispersos em uma fase dispersante oleosa ou hidrofóbica (PAUL e MOULIK, 2001; MOURA, 2008). Enquanto isso, as emulsões são dispersões opticamente turvas e leitosas e, normalmente, são obtidas por agitação mecânica devido a sua instabilidade termodinâmica (BEGWE et al., 2001; TENJARLA, 1999). Dessa forma, as MEs são diferentes das emulsões, pois, além de serem transparentes e termodinamicamente estáveis, apresentam um tamanho de gotículas na escala nanométrica. O tamanho típico de uma gotícula de ME fica entre 10 a 300 nm, valor este aproximadamente 100 vezes menor do que o tamanho médio das gotículas de emulsões, que fica em torno de 1 a 10 μm (KAWAKAMI et al., 2002a e 2002b).

Ao longo dos anos, as MEs foram investigadas por muitos outros autores que confirmaram a teoria de que fluidos macroscopicamente homogêneos podem ser formados sem que seja necessário adicionar energia quando se misturam adequadamente os seguintes componentes: tensoativo e/ou co-tensoativo, solvente orgânico hidrofóbico (fase óleo) e água. Desta forma, o antigo conceito de que água e

óleo não se misturam sofreu modificações significativas, tendo sido comprovado que a adição de um terceiro componente em um sistema composto por dois líquidos imiscíveis pode resultar no aumento da solubilidade destes líquidos. Se o terceiro componente for um tensoativo, haverá redução da tensão interfacial entre os líquidos imiscíveis, tornando-os capazes de se dispersarem um no outro (SHINODA, 1963; PRINCE, 1969).

As microemulsões do tipo O/A apresentam grande interesse farmacológico, principalmente no que diz respeito a solubilidade e carreamento de fármacos. Nestes sistemas, as cabeças polares dos tensoativos interagem com a água, enquanto que as caudas apolares se organizam ao redor da fase oleosa, formando estruturas estáveis denominadas micelas, responsáveis pela íntima dispersão entre as fases.

Devido as suas características únicas, tais como a facilidade de preparação por emulsificação e de esterilização por filtração, estabilidade termodinâmica, viscosidade adequada, transparência e a alta capacidade de solubilizar fármacos pouco solúveis em água na fase oleosa, a utilização de sistemas MEs vem deixando de ser uma possibilidade e está passando a ser uma realidade (LAWRENCE et al., 2000). As MEs também podem proporcionar uma modificação na biodisponibilidade e na diminuição da toxicidade dos fármacos, visto que esses sistemas apresentam-se como reservatórios capazes de liberar gradualmente os fármacos e direcionar para tecidos e células específicas do organismo e, além disso, dependendo de sua composição, podem ser aplicados, sem restrições, às vias de administração oral, ocular, parenteral, transdérmica, vaginal e retal (GUPTA et al., 2008).

As micelas consistem de MEs O/A onde as moléculas de origem lipídica ou orgânica se organizam no interior destas estruturas, organizadas em ambientes majoritariamente aquosos. O contrário é observado para micelas reversas: consistem de MEs A/O onde o microdomínio aquoso é retido no interior destas estruturas através da interação com as cabeças polares do tensoativo, interagindo dessa forma com o solvente orgânico através de suas caldas hidrofóbicas (ROCHE et al., 2013) (**Figura 7**). Ou seja, o papel do tensoativo/surfactante é fundamental para essa organização micelar.

Os surfactantes são moléculas anfipáticas, compostas por uma parte polar ou hidrofílica e uma cadeia carbônica apolar ou hidrofóbica, sendo que a parte polar pode ser carregada positiva ou negativamente, pode ser dipolar ou não carregada. Os surfactantes podem promover a solubilização e a emulsificação de materiais insolúveis e podem reduzir a tensão superficial da solução para facilitar o processamento

(GRIFFITHS et al., 2002). Isto evidencia uma importante propriedade dos surfactantes, que é a formação de um filme molecular, ordenado nas interfaces, que reduz a tensão interfacial e superficial. Uma característica fundamental que está diretamente ligada à ação dos surfactantes é que em meio aquoso, acima de uma determinada concentração, os surfactantes formam micelas, nos quais a porção lipofílica das moléculas fica orientada para o interior da micela enquanto apenas os grupos polares ficam na parte externa da micela em contato com a água. Forças eletrostáticas concentram compostos hidrofílicos junto à superfície de micelas enquanto compostos lipofílicos podem ser solubilizados em seu interior (MINATTI, 2005). Essa concentração é denominada concentração micelar crítica (CMC). O aumento da concentração de surfactante após este ponto tem pouco efeito na tensão superficial da solução na qual o surfactante está presente. Abaixo da CMC, o tensoativo está predominantemente na forma de monômeros, não formando, portanto, micelas.

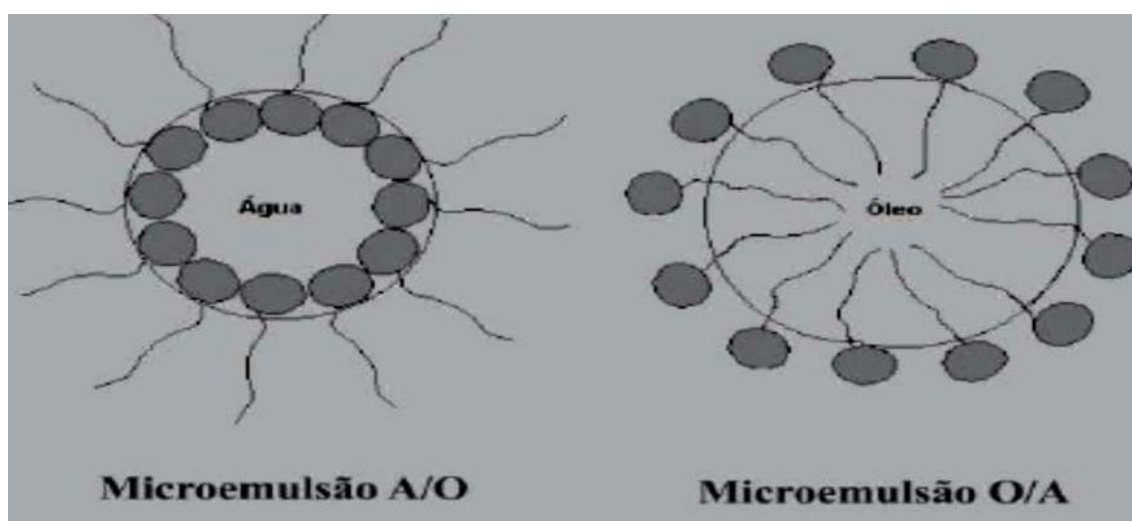


Figura 7. Estrutura das microemulsões (CORREA et al., 2005).

A CMC depende da estrutura do tensoativo (tamanho da cadeia do hidrocarboneto) e das condições do meio (concentração iônica, contra-íons, temperatura etc). Um tensoativo típico possui a estrutura R-X, onde R é uma cadeia de hidrocarboneto variando de 8–18 átomos e X é o grupo cabeça, polar ou iônico. Dependendo de X, os tensoativos podem ser classificados como não iônicos, catiônicos, aniônicos ou anfóteros (PELIZZETTI e PRAMAURO, 1985). O Tween 80 ou

polisorbato 80 ($C_{64}H_{124}O_{26}$) é um surfactante não-iônico, pouco tóxico para as membranas biológicas (REGE et al., 2002), constituído por ésteres de ácidos graxos de polioxietileno sorbitol sendo bastante conhecido e disponível comercialmente (BARWICZ, 1992; FENG, 2006). Por esses motivos aqui apresentados, este tensoativo foi escolhido para a formulação da microemulsão desenvolvida neste trabalho.

É importante ressaltar, que além da vantagem da melhoria da solubilização do CTZ em meio aquoso através da formulação dessas MEs, outras vantagens desse sistema são de suma importância para o tratamento do câncer. Devido a essas estruturas apresentarem tamanho nanométrico comparável ao de entidades biológicas, como o de células, vírus, moléculas, proteínas e até mesmo genes e DNA (FATTAL et al., 1998; CROMMELIN et al., 2003; PEEK et al., 2008; KHATRI et al., 2008), torna-as adequadas para serem utilizadas como sistemas de liberação de fármaco. Através desse sistema, podem-se superar defesas naturais como células do sistema imune e a degradação oxidativa prematura do fármaco protegendo-o, por exemplo, do trato gastrointestinal (TANG et al., 2009). Além disso, sem alterar a estrutura química do fármaco, o agente ativo pode ser mais estável do que quando administrado na forma livre (MAGILL, et al., 1990; CHEN et al., 1999; HENDRICKS et al., 2008). Outra importante vantagem que esse sistema pode apresentar é a liberação controlada do fármaco de forma sustentada e prolongada, evitando super ou subdosagens. Essa liberação controlada eleva a biodisponibilidade do fármaco e resulta em efeito terapêutico prolongado dentro de uma faixa segura, com alta eficácia e baixa toxicidade (JORI et al., 1993; ZHOU et al., 2009; TIGHIOUART et al., 2010). Dessa forma, o tratamento pode apresentar menores custos, pois menor quantidade de fármaco será necessária e maiores índices de aceitação pelo paciente, pois menos doses serão aplicadas em maiores intervalos de tempo.

1.8. CONSIDERAÇÕES FINAIS DA INTRODUÇÃO

A seletividade terapêutica ou a preferência em diminuir a viabilidade das células cancerígenas sem uma toxicidade significativa para as células normais é uma das considerações mais importantes na quimioterapia do câncer. Entender as diferenças biológicas entre as células normais e cancerígenas é essencial para o desenvolvimento de fármacos com atividade seletiva antitumoral. Assim, é necessária a busca de novos

fármacos e novas abordagens terapêuticas que atuem especificamente sobre células cancerígenas, causando menos danos as células não tumorais.

O clotrimazol constitui uma das mais recentes possibilidades, apresentando potentes efeitos antitumorais, como relatados anteriormente, contudo o estudo aprofundado do seu mecanismo de ação é de suma importância.

Além disso, devido a pobre solubilidade aquosa e a alta lipofilia do CTZ, este foi incorporado em um sistema de microemulsões. Esse sistema tem sido muito utilizado para o tratamento do câncer, como dito anteriormente, pois através da liberação prolongada do fármaco, tem-se, entre outras vantagens, a diminuição significativa da sua toxicidade e a maior eficácia terapêutica.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Com base no exposto anteriormente, o objetivo desse estudo foi investigar o potencial antitumoral do fármaco CTZ, incorporado em micelas, comparando com o CTZ na sua forma solúvel, usando como modelo experimental, a conhecida linhagem tumoral derivada de câncer de mama, MCF-7.

O alvo desse estudo foi o metabolismo glicolítico e mitocondrial dessas células, devido a importância energética dessas vias para o crescimento e proliferação tumoral.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolvimento e caracterização das microemulsões contendo CTZ:
 - ✓ Determinar o diâmetro médio das micelas;
 - ✓ Determinar a estabilidade térmica das micelas;
 - ✓ Determinar a estabilidade ao longo do tempo das micelas;

- Investigar o efeito do CTZ incorporado em micelas e solubilizado em DMSO nos seguintes pontos:
 - Estudo da atividade citotóxica *in vitro*:
 - ✓ Avaliar a viabilidade celular através da quantificação da atividade da LDH extravasada para o meio de cultura e pelo ensaio de MTT;
 - ✓ Analisar a morfologia das células da linhagem MCF-7 por três diferentes técnicas de microscopia: DIC, MEV e MO por coloração de giemsa;

 - Estudo do metabolismo de glicose:
 - ✓ Quantificar a atividade das enzimas chaves da glicólise: HK, PFK e PK;
 - ✓ Dosar a quantidade de lactato produzido;
 - ✓ Quantificar a atividade da enzima chave da via das pentoses: G6PDH;

- Estudo do metabolismo mitocondrial:
 - ✓ Quantificar a atividade da enzima chave do ciclo de Krebs: SDH;
 - ✓ Analisar a morfologia mitocondrial através de MET;
 - ✓ Avaliar o potencial transmembrânico mitocondrial;
 - ✓ Avaliar o quadro de estresse oxidativo da célula, através da quantificação de ROS, ATP e glutatona reduzida;

- Estudo do mecanismo de morte celular:
 - ✓ Avaliar morte celular induzida por necrose, através da avaliação da integridade das membranas celulares;
 - ✓ Avaliar morte celular induzida por apoptose, através da quantificação de DNA fragmentado e por detecção da externalização de fosfatidilserina;

- Estudo do comportamento da linhagem tumoral em baixa concentração de glicose:
 - ✓ Analisar o conteúdo de ATP, produção de ROS e viabilidade celular.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Materiais: DMEM, F12 e soros fetais bovino/equino foram obtidos da Gibco-Invitrogen Corporation (NY, USA). Clotrimazol, NAD^+ , NADH, ATP, hexocinase, glucose 6-fosfato desidrogenase, frutose 6-fosfato, aldolase, lactato desidrogenase, fosfoenolpiruvato, NADP^+ e glicose 6-fosfato foram obtidos da Sigma Chemical Co. MA, EUA. Todos os outros reagentes são de alto grau de pureza.

3.2 Preparo das microemulsões (MEs): As microemulsões foram preparadas pela adição sequencial de 18,5 ml H_2O , 500 μl Tween 80 e 1 ml CTZ diluído em DMSO, misturados suavemente em agitador magnético até a obtenção de uma solução límpida. O tipo de ME formada foi a óleo/água, onde as moléculas de CTZ ficaram localizadas no interior de reduzidas gotículas esféricas envolvidas por moléculas de tensoativos (Tween 80) em um meio aquoso. Nessas condições, a concentração molar final de CTZ foi de 5 mM.

3.3 Determinação do tamanho médio micelar: As microemulsões foram analisadas quanto ao tamanho médio de partículas via dispersão dinâmica de luz através do DLS Dynamo Pro Nanostar. Primeiramente, 3 mL das microemulsões foram centrifugadas, a fim de se certificar de que todo o CTZ havia sido incorporado. A microemulsão onde não houve formação de sobrenadante foi adicionada em cubeta de quartzo (3mL) e submetida a análises, primeiramente a 37°C , onde de 2 em 2h, médias de 10 valores de diâmetro/raio médio de partículas foram determinados. Deste modo, cada ponto dos gráficos resultantes contém média de 10 valores. O índice de refração do branco (Tween 80 + H_2O + DMSO) é de 1,334 e o índice de refração das micelas contendo CTZ é de 1,335. A estabilidade térmica (25°C até 50°C) e a estabilidade ao longo do tempo até 24 hs a 37°C das micelas também foram avaliadas por essa técnica.

3.4 Cultura de célula: A linhagem celular de câncer de mama MCF-7 e a linhagem de mioblasto C2C12 foram obtidas do Banco de Células do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, UFRJ. A linhagem de mama epitelial não tumorigênica MCF-10A foi gentilmente cedida pela Prof^a. Mitzi Brentani (Faculdade de Medicina da USP/SP). Estas foram mantidas em frascos de cultura e acondicionadas em estufa a 37°C com 5% de CO_2 . As linhagens MCF-7 e C2C12 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) em pH 7,4. A linhagem MCF-10A foi mantida em meio DMEM/F12 (Nutrient Mixture Ham) suplementado com 10% de soro fetal equino e 0,02 µg/mL fator de crescimento epidermal, 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, sendo subcultivadas a cada dois dias e mantidas em fase log de crescimento celular, de acordo com HOLLANDINO et al., 2001. O crescimento celular foi devidamente acompanhado por meio de observação em microscópio invertido. Para manter o estoque foi realizado o congelamento das células em tubos de criocongelamento a uma concentração de 2×10^6 células/mL com 10% de DMSO e estocado em nitrogênio líquido para uso futuro.

3.5 Determinação da viabilidade celular: A viabilidade celular (MCF-7, MCF-10A e C2C12) foi avaliada através da quantificação da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) extravasada para o meio de cultura e pelo ensaio de MTT. Após o tratamento indicado com CTZ solúvel e micelar por 24h, o meio de cultura foi retirado para a quantificação da atividade da LDH e as células foram utilizadas para o ensaio de MTT. A atividade da LDH foi determinada espectrofotometricamente através da redução do NAD^+ (absorvância em 340 nm) no espectrofotômetro VICTOR3 (PerkinElmer, EUA) (SCHWARTZ e BODANSKY, 1968). Para o ensaio de MTT, 0,5 mg/mL do reagente foi adicionado sobre as células e mantido ao abrigo da luz por 3h. Ao término dessa incubação, o sobrenadante foi descartado e os cristais de formazam produzidos foram dissolvidos em 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). A absorvância do corante foi medida no comprimento de onda de 570 nm com a subtração do *background* em 650 nm, utilizando-se o espectrofotômetro VICTOR3 (PerkinElmer, USA) (MOSMANN 1983; ODDIS e FINKEL, 1995).

3.6 Dosagem da atividade das enzimas chaves glicolíticas HK, PFK e PK e da enzima chave da via das pentoses a G6PDH: As células MCF-7 foram cultivadas em placas de 24 poços e crescidas até atingir confluência. Após o tratamento indicado com CTZ solúvel e micelar por 24h, as células foram tripsinizadas, centrifugadas (10 min x 5000 rpm) e ressuspensas em tampão 10 mM fosfato de potássio, pH 7,4. As concentrações de proteína das células lisadas foram mensuradas pela técnica de Lowry (LOWRY et al., 1951) e a atividade das enzimas medidas pelo método acoplado como

descrito por SPITZ et al., (2009) e ZANCAN et al., (2010). A atividade da PFK foi analisada em um meio de reação (MRC) contendo 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM NADH, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 1 mM de F6P, 2 mU/mL aldolase, 2 mU/mL triose fosfato isomerase e 2 mU/mL α -glicerofosfato desidrogenase. A atividade da HK foi analisada em MRC contendo 100 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM NAD⁺, 2 mM MgCl₂, 1 mM ATP e 2 mU/mL G6PDH. A atividade da PK foi medida em MRC contendo 100 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM NADH, 5 mM ADP, 120 mM KCl, 5 mM fosfoenolpivato (PEP), 5 mM MgCl₂ e 22 mU/mL lactato desidrogenase. A atividade da G6PDH foi avaliada em um MRC contendo 100 mM Tris-HCl pH 7,4, 5 mM MgCl₂, 2 mM NADP⁺ e 1 mM G6P. Estas enzimas foram determinadas espectrofotometricamente, onde a oxidação/redução de NADH/NAD⁺ e de NADPH/NADP⁺ foi acompanhada pela medida do decréscimo na absorvância em 340 nm no espectrofotômetro VICTOR3 (PerkinElmer, EUA).

3.7 Quantificação do conteúdo de ATP: As células MCF-7 foram cultivadas em placas de 96 poços e crescidas até atingir confluência. Após o tratamento indicado com CTZ solúvel e micelar por 24h, o meio de cultura foi retirado e os reagentes do Kit *ATP Lite (Luminescence ATP Detection Assay System – PerkinElmer, EUA)* adicionados, seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. Esse sistema é baseado na reação entre o ATP celular e a enzima luciferase de *Photinus pyralis* na presença do substrato D-luciferina. A luminescência obtida é proporcional a concentração de ATP celular e foi analisado pelo espectrofotômetro VICTOR3 (PerkinElmer, EUA).

3.8 Dosagem da produção de lactato: As células MCF-7 foram cultivadas em placas de 96 poços e crescidas até atingir confluência. Após o tratamento indicado com CTZ solúvel e micelar por 24h, o meio de cultura foi utilizado para avaliar a produção de lactato através do kit *EnzyChrom™ L-Lactate Assay* (BioAssay Systems, USA), seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. Este sistema é baseado na oxidação do lactato produzido na presença de NAD, onde o NADH formado reduz o reagente MTT a formazan. A intensidade da produção de cor, em 565 nm, é proporcional a concentração de lactato no meio mensurado no espectrofotômetro VICTOR3 (PerkinElmer, EUA).

3.9 Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\Psi$): As células MCF-7 foram cultivadas em placas de 12 poços e crescidas até atingir confluência. Após o

tratamento indicado com CTZ solúvel e micelar por 24h, as células foram tripsinizadas, centrifugadas (10 min x 5000 rpm) e ressuspensas em tampão PBS (1×10^6 células). A estas células foi adicionado o composto rodamina 123 a uma concentração final de 1mg/mL, deixando agir por 15 min ao abrigo da luz. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo Becton Dickinson FACS Calibur, 100.000 eventos foram analisados. A fluorescência da rodamina 123 foi captada pelo filtro FL-1: 530 ± 30 nm. Os dados foram analisados com o auxílio do programa “Windows Multiple Document Interface Flow Citometry Application” (WinMDI) (PERES e CURI, 2005).

3.10 Análise da produção de ROS: As células MCF-7 foram cultivadas em placas pretas de 96 poços e crescidas até atingir confluência. Posteriormente, as células foram incubadas com $50 \mu\text{M}$ de 2,7 diclorodihidro fluoresceína (DCHF) por 30 min e em seguida tratadas com CTZ solúvel e micelar por 24h. As amostras foram excitadas em 450 nm e a emissão da fluorescência foi medida em 530 nm, utilizando o espectrofotômetro VICTOR 3 (PerkinElmer, USA) (ROMA et al., 2009).

3.11 Quantificação da atividade da succinato desidrogenase: As células MCF-7 foram cultivadas em placas de 96 poços e crescidas até atingir confluência. Após o tratamento indicado com CTZ solúvel e micelar por 24h, o meio foi removido e a placa deixada durante 1 hora a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$. Em seguida, as células foram incubadas durante 20 min ao abrigo da luz em um MRC contendo 12.3 mM dietil-succinato, 0.2 mM 1-metoxi-5-metilfenazina metil sulfato, 1.2 mM nitroazul de tetrazólio (NBT) e 50 mM Tris-HCl pH 7,6. Foi usado 12.3 mM malonato, um inibidor competitivo da succinato desidrogenase, como controle positivo. A atividade dessa enzima foi determinada espectrofotometricamente utilizando NBT como um receptor de elétrons. A cor púrpura obtida pela formação do NBT reduzido é diretamente proporcional à atividade da enzima sendo mensurada no espectrofotômetro VICTOR3 (PerkinElmer, EUA) (PISTOLLATO et al., 2010).

3.12 Análise do ciclo celular: As células MCF-7 foram cultivadas em placas de 12 poços e crescidas até atingir confluência. Após o tratamento indicado com CTZ solúvel e micelar por 24h, as células foram tripsinizadas, centrifugadas (10 min x 5000 rpm) e ressuspensas em tampão PBS (1×10^6 células). A estas células foi adicionado iodeto de propídeo (PI) a uma concentração final de $10 \mu\text{g/ml}$ e 0,1% saponina (tampão de lise),

deixando agir por 45 minutos a 37 °C e ao abrigo da luz. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo Becton Dickinson FACS Calibur, onde 100.000 eventos foram analisados. A fluorescência do IP foi captado pelo filtro FL-3: acima de 670 nm. Os dados foram analisados com o auxílio do programa “Windows Multiple Document Interface Flow Citometry Application” (WinMDI) (PERES e CURI, 2005).

3.13 Avaliação da integridade da membrana celular por citometria de fluxo: As células MCF-7 foram cultivadas em placas de 12 poços e crescidas até atingir confluência. Após o tratamento indicado com CTZ solúvel e micelar por 24h, as células foram tripsinizadas, centrifugadas (10 min x 5000 rpm) e ressuspensas em tampão PBS (1×10^6 células). A estas células foi adicionado IP para uma concentração final de 1mg/ml, deixando agir por 15 min ao abrigo da luz. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo Becton Dickinson FACS Calibur, onde 100.000 eventos foram analisados. A fluorescência do IP foi captado pelo filtro FL-3: acima de 670 nm. Os dados foram analisados com o auxílio do programa “Windows Multiple Document Interface Flow Citometry Application” (WinMDI) (PERES e CURI, 2005).

3.14 Detecção de morte celular por anexina V: As células MCF-7 foram cultivadas em placas de 12 poços e crescidas até atingir confluência. Após o tratamento indicado com CTZ solúvel e micelar por 24h, as células foram tripsinizadas, centrifugadas (10 min x 5000 rpm), lavadas 2x com PBS e ressuspensas em tampão 10 mM HEPES, 140 mM NaCl e 2.5 mM CaCl_2 , pH 7,4 (1×10^6 células). Desta concentração foi retirada uma alíquota de 100 μl e adicionado 5 μl de anexina V (anexina V conjugada com Alexa Fluor[®] 488, Molecular Probes[™], Invitrogen) e 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PI. As amostras foram incubadas por 15 min em temperatura ambiente. Após este período foi adicionado 400 μl da solução tampão a 4°C. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo Becton Dickinson FACS Calibur, onde 100.000 eventos foram analisados. A fluorescência de excitação/emissão foi no comprimento de onda 495/519 nm, respectivamente. Os dados foram analisados com o auxílio do programa “Windows Multiple Document Interface Flow Citometry Application” (WinMDI) (PERES e CURI, 2005).

3.15 Quantificação do conteúdo de glutatona: As células MCF-7 foram cultivadas em placas de 12 poços e crescidas até atingir confluência. Após o tratamento indicado

com CTZ solúvel e micelar por 24h, as células foram tripsinizadas, centrifugadas (10 min x 5000 rpm) e ressuspensas em tampão específico. A quantificação de glutathiona foi realizada através do kit *Glutathiona Assay Kit* (BioVision, EUA). O produto fluorescente foi lido a 420 nm com excitação a 340 nm analisadas no espectrofotômetro VICTOR3 (PerkinElmer, EUA), seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante.

3.16 Microscopia de luz por coloração de Giemsa: As células MCF-7 foram plaqueadas sobre lamínulas circulares de 12 mm de diâmetro contidas em placas de 24 poços. Após o tratamento com CTZ micelar por 24h, as lamínulas foram lavadas com PBS e fixadas em 3,7% de bouin por 15 min. Após a fixação essas amostras foram lavadas duas vezes com etanol 70% e uma vez com H₂O tridestilada. Em seguida foram coradas com giemsa por overnight, desidratadas em soluções de acetona progressivamente substituídas por xilol e montadas sobre lâmina com Permount A. As amostras foram analisadas ao microscópio de ótico ZEISS Axioplan (GIEMSA, 1926).

3.17 Microscopia eletrônica de varredura (MEV): As células MCF-7 foram plaqueadas sobre lamínulas circulares de 12 mm de diâmetro, contidas em placas de 24 poços. Após o tratamento com CTZ micelar por 24h, as amostras foram lavadas em PBS e fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2, contendo 3,7% de sacarose durante 1 hora a temperatura ambiente. Após a fixação, as células em suspensão foram lavadas em PBS e pós-fixadas durante 40 minutos em solução de tetróxido de ósmio a 1% em cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2 com 0,8% de ferrocianeto de potássio e cloreto de cálcio 5 mM. As amostras foram então lavadas em PBS e desidratadas em séries crescentes de etanol de 15% até 95% e em mais duas etapas em etanol absoluto. Todas as etapas de desidratação foram realizadas durante 15 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram secas pelo método do ponto crítico em CO₂ em aparelho BAL-TEC CPD030 e as lamínulas de vidro foram montadas sobre suportes de alumínio com cola de prata e metalizadas com uma camada de 20 nm de ouro pelo método de *sputtering*, em aparelho Balzers Union FL-9496. A observação foi feita em um microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM 5310.

3.18 Microscopia de luz de contraste interferencial diferencial de Nomarski (DIC): As células MCF-7 foram plaqueadas sobre lamínulas circulares de 12 mm de diâmetro, contidas em placas de 24 poços. Após o tratamento com CTZ micelar por 24h, as

amostras foram lavadas em PBS e fixadas com 3,7% de formalina em PBS, pH 7,2 por 10 minutos a 4°C. Após o período de fixação, as lamínulas contendo as células foram lavadas com PBS e montadas sobre lâminas de vidro contendo solução de 0,2N de n-propil-galato diluído em glicerol 90% em PBS. As amostras foram analisadas ao microscópio ZEISS Axioplan.

3.19 Microscopia eletrônica de transmissão (MET): As células MCF-7 foram plaqueadas sobre lamínulas circulares de 12 mm de diâmetro, contidas em placas de 24 poços. Após o tratamento com CTZ micelar por 24h, as amostras foram lavadas em PBS e fixadas em 2,5% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2, 5 mM de cloreto de cálcio e 3,7% de sacarose durante 1 hora a temperatura ambiente. Após fixação essas amostras foram lavadas 2 vezes em PBS colhidas por raspagem da lâmina e pós-fixadas durante uma hora no escuro em solução de tetróxido de ósmio a 1% em cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2, 0,8% de ferrocianeto de potássio e 5 mM de cloreto de cálcio. As amostras foram desidratadas em séries crescentes de acetona e incluídas em resina PolyBed. A seguir a resina foi polimerizada durante 72 hs a 60°C. Secções ultra-finas (60 nm) foram obtidas em um ultramicrotomo Leica e contrastadas com acetato de uranila 5% durante 30 min em H₂O e em citrato de chumbo durante 5 min (REYNOLDS, 1963). As secções foram observadas em microscópio eletrônico de transmissão FEI Morgagni F-268.

3.20 Análise estatística dos resultados: Todos os resultados nas figuras são expressos como média ± erro padrão. A análise dos dados foi realizada usando o programa Sigma Plot (v. 10.0, Systat Inc. CA, USA) integrado com o *software* SigmaStat (v. 3.2, Systat Inc. CA, USA). Os valores para cada grupo foram comparados por testes de *t*-Student pareados ou não pareados, ou por análise de variância (ANOVA). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p \leq 0,05$

4. RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS MICELAS CONTENDO CTZ

Neste trabalho foi proposto a incorporação do fármaco CTZ em um sistema microemulsionado. Para a preparação das microemulsões, foi feita a mistura entre a fase orgânica, composto pelo CTZ diluído em DMSO e a fase aquosa (H₂O), que foram termodinamicamente estabilizadas pela presença de tensoativo, Tween 80. O sistema foi cuidadosamente homogeneizado até a obtenção de uma solução límpida. Neste caso, as moléculas lipossolúveis (moléculas de CTZ) ficaram localizadas no interior de reduzidas gotículas esféricas envolvidas por moléculas de tensoativo (Tween 80) em um meio contínuo de água, formando assim um sistema de microemulsão (ME) do tipo óleo/água (CONSTANTINIDES et al., 1995).

De acordo com a literatura, no campo farmacêutico, o termo nanopartícula tem sido aplicado para estruturas coloidais com diâmetro entre 1 a 1000 nm, usadas como sistemas de liberação de fármacos (KIP, 2004). Nosso primeiro objetivo então foi avaliar se a formulação que havíamos preparado era composta por gotículas na escala nanométrica, o que caracteriza a formação de uma microemulsão, ou se tratava-se de uma emulsão. Como relatado anteriormente, o tamanho médio de uma gotícula de ME fica entre 10 a 300 nm, um valor aproximadamente 100 vezes menor do que o tamanho médio das gotículas de emulsões, que é em torno de 1 a 10 µm (KAWAKAMI et al., 2002a e 2002b).

Para a determinação do diâmetro médio das micelas contendo ou não CTZ, foram realizadas medidas de espalhamento dinâmico de luz (DLS - *Dynamic Light Scattering*). O espalhamento dinâmico da luz é uma técnica bem conhecida para se determinar a distribuição de tamanho de partículas com diâmetros variando entre poucos nanômetros até micrometros (PAL et al., 2007). Nesta técnica, um feixe de laser incide sobre uma dispersão contendo partículas esféricas em movimento browniano, causando um efeito semelhante ao efeito Doppler quando a luz incide nas partículas em movimento, mudando o comprimento de onda da luz. Esta mudança está diretamente relacionada ao tamanho das partículas, ou seja, partículas menores causam maiores variações no comprimento de onda da luz, uma vez que possuem maior velocidade média do que as partículas maiores. Dessa maneira, é possível estimar a distribuição de

tamanho das partículas através da descrição do seu movimento no meio (BAR-ZIV et al., 1997; HARADA e ASAKAWA et al., 2008;)

Analisando o DLS das micelas desenvolvidas neste trabalho, observamos praticamente nenhuma alteração do tamanho médio entre as micelas vazias e as incorporadas com CTZ a 25°C. As primeiras apresentaram diâmetro médio de 17.1 nm (painel A) e as segundas, de 16.9 nm (painel B), o que indica a formação de um sistema microemulsionado (**Figura 8**). Observamos também uma distribuição de partícula bastante uniforme e homogênea com baixo índice de polidispersão.

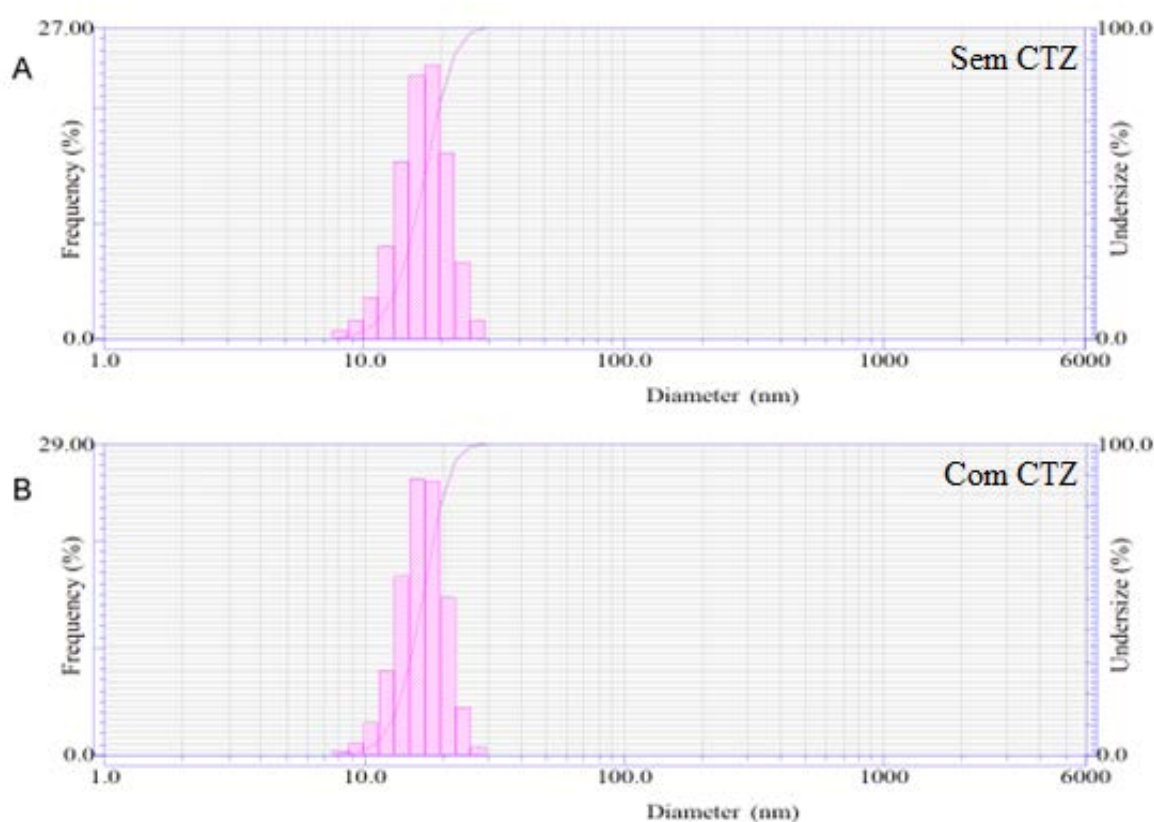


Figura 8 – Diâmetro médio das micelas vazias (sem CTZ) e com CTZ por espalhamento de luz dinâmico (DLS). A determinação do diâmetro médio das micelas pela técnica de DLS foi realizada conforme descrito no Material e Métodos. Paineil A: representa o diâmetro médio das micelas vazias sem CTZ. Paineil B: representa o diâmetro médio das micelas com CTZ. Os valores são a média \pm erro padrão de no mínimo três experimentos independentes ($n \geq 3$).

Nosso próximo passo foi avaliar a estabilidade dessas micelas frente ao aumento crescente de temperatura. A estabilidade térmica de uma formulação fornece

informações importantes sobre a temperatura ótima para o sistema de armazenamento, bem como para a liberação do fármaco. Essa análise foi avaliada mediante a variação do diâmetro médio das partículas com a variação de temperatura, que foi desde a temperatura ambiente de 25°C até 50°C. Na **Figura 9** podemos observar um comportamento crescente do tamanho micelar conforme o aumento de temperatura, a partir de 40°C. Além disso, observamos que as microemulsões com e sem o clotrimazol (painel A e B) apresentaram perfis semelhantes de estabilidade de acordo com a temperatura de análise de dispersão dinâmica de luz.

De fato, o tamanho micelar não sofreu alteração no intervalo de 25°C até 38°C, apresentando-se assim termicamente estável para a temperatura corporal de 37°C. No entanto, em temperaturas mais elevadas, acima de 38°C, ocorre uma desintegração do sistema de ME. Como a temperatura é mais elevada, existe uma maior fluidez do sistema, alterando a tensão superficial, o que facilita a saída do CTZ micelar dos núcleos micelares para o meio, gerando dessa forma o aumento do tamanho médio das micelas. Ou seja, nossos resultados revelam a grande estabilidade das micelas até 37°C, indicando que este sistema, provavelmente, não será danificado por essa variável no corpo ou, se armazenado sob estas condições.

Posteriormente, avaliamos a estabilidade dessas micelas ao longo do tempo, até 24h, que é o tempo de incubação das micelas na cultura de células. Conforme realizado para a estabilidade térmica, neste experimento a análise da estabilidade também foi avaliada mediante a variação do raio médio das partículas ao longo do tempo. Na **Figura 10**, observamos que ocorre um aumento do tamanho das micelas ao decorrer do tempo. Além disso, podemos observar que as microemulsões com e sem o clotrimazol (painel A e B) apresentaram perfis semelhantes de estabilidade de acordo com o tempo de análise de dispersão dinâmica de luz. Seguindo o mesmo raciocínio do gráfico anterior, esse aumento na dimensão micelar indica o extravasamento do CTZ para o meio, liberação esta importante para que o fármaco promova seu efeito. Notamos também, que aumentos sutis foram observados até 5h de análise e que a partir deste tempo, grandes aumentos são observados, onde há o rompimento destas estruturas, e a consequente quebra do sistema, gerando turvação no meio. Isso ocorre pelo fato de o clotrimazol não ser solúvel em água e ao ser desestruturado da microemulsão, o mesmo precipita em solução aquosa. Tais resultados são importantes, pois nas primeiras horas, a microemulsão propicia a solubilidade do CTZ em um veículo aquoso para a célula

alvo do fármaco, e com o passar do tempo, propicia a liberação do mesmo no local de ação, otimizando-se desta forma, seu efeito.

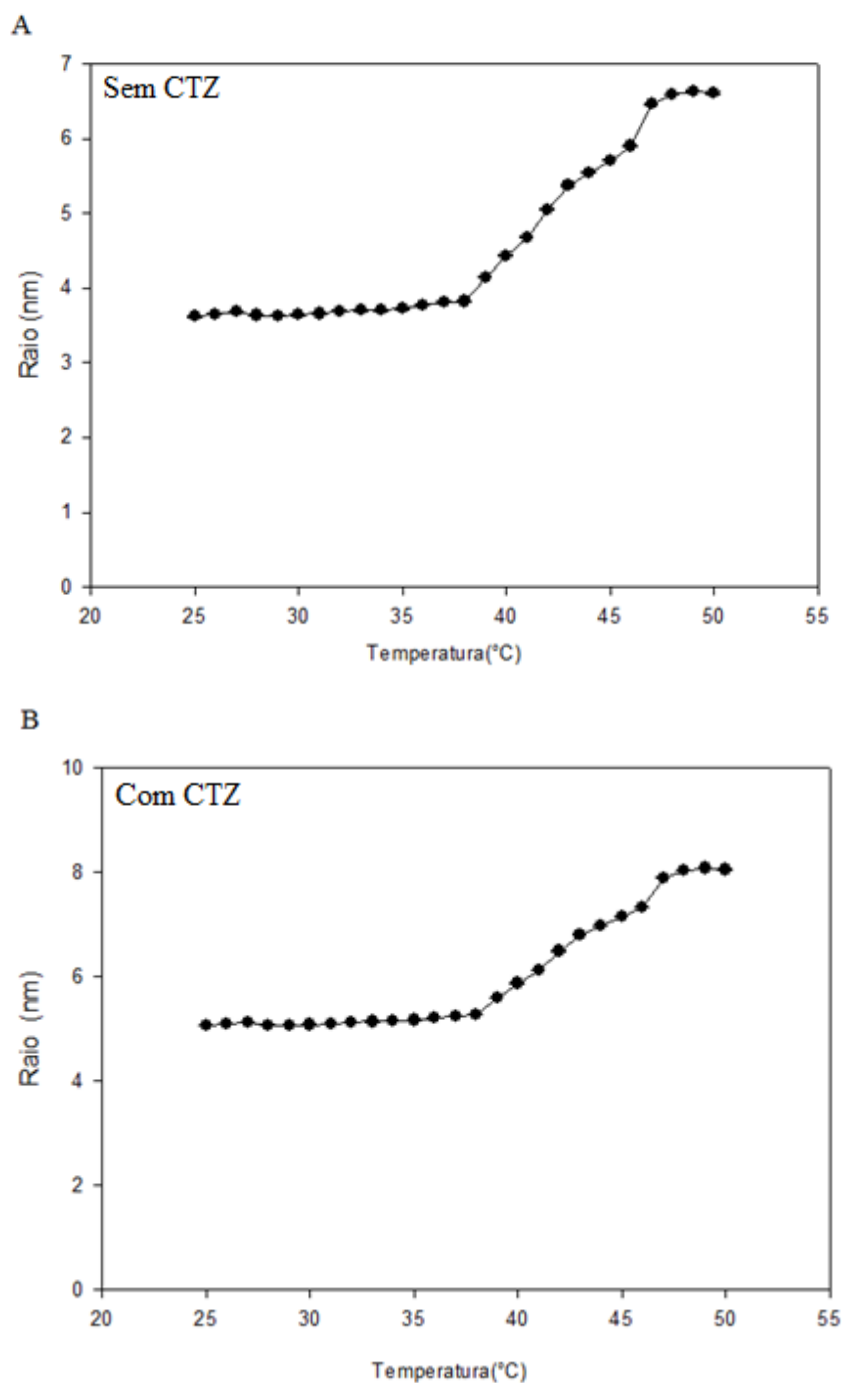


Figura 9 – Análise da estabilidade térmica das micelas por espalhamento de luz dinâmico (DLS). A determinação do raio médio das micelas pela técnica de DLS em condições crescentes de temperatura foi realizada conforme descrito no Material e Métodos. Painel A: micelas vazias sem CTZ. Painel B: micelas com CTZ. Os valores são a média \pm erro padrão de no mínimo três experimentos independentes ($n \geq 3$).

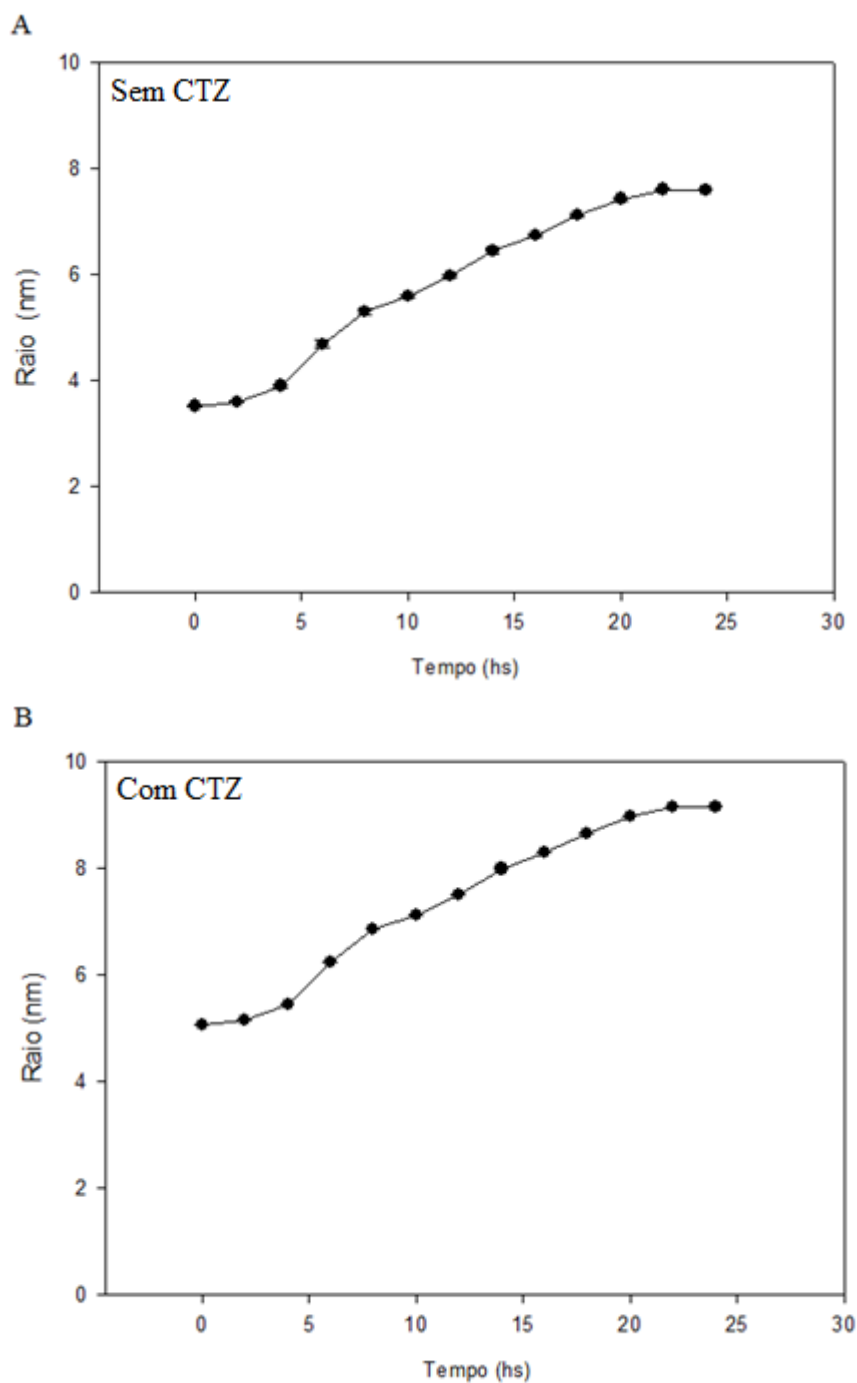


Figura 10 – Análise da estabilidade das micelas ao longo do tempo por espalhamento de luz dinâmico (DLS). A determinação do raio médio das micelas pela técnica de DLS em condições ao longo do tempo a 37°C foi realizada conforme descrito no Material e Métodos. Painel A: micelas vazias sem CTZ. Painel B: micelas com CTZ. Os valores são a média \pm erro padrão de no mínimo três experimentos independentes ($n \geq 3$).

4.2 ESTUDO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA *IN VITRO*

4.2.1 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

A linhagem celular MCF-7 tem sido largamente utilizada como modelo de estudo para diferentes fármacos com potencial antineoplásico (MEIRA et al., 2005; FURTADO et al., 2012; GOMEZ et al., 2013). Essa linhagem celular é proveniente de câncer de mama e segundo a descrição fornecida pela ATCC (American Type Culture Collection) estas foram obtidas de sítios de efusão pleural de uma mulher de 69 anos com adenocarcinoma de mama. Essas células podem ser facilmente mantidas em cultura devido a sua alta capacidade proliferativa. Assim, esse modelo *in vitro* é uma ferramenta valiosa para a investigação do funcionamento celular, pois consiste na manutenção e multiplicação de células vivas possibilitando a análise do metabolismo e do comportamento celular frente a um componente a ser testado.

Aqui, o objetivo inicial foi analisar se a incorporação do CTZ no interior de micelas aumentaria o efeito antitumoral do fármaco sobre a viabilidade celular. Como modelo experimental utilizamos a conhecida linhagem tumoral, MCF-7 e como controle não tumoral usamos duas diferentes linhagens, a linhagem de mioblastos, C2C12, e a linhagem de mama epitelial não tumorigênica MCF-10A. Para tal, duas diferentes metodologias para avaliar a viabilidade celular foram empregadas: ensaio de MTT e atividade da LDH extravasada para o meio de cultura. O ensaio de MTT é um método colorimétrico que se baseia na capacidade de células viáveis em reduzirem metabolicamente o sal de tetrazólio (MTT), por meio de enzimas desidrogenases, em cristais de formazan de cor azul púrpura que se acumula no citoplasma celular. Dessa forma, a redução do MTT a formazan, será diretamente proporcional à viabilidade celular (MOSMANN, 1983). O segundo método baseia-se na quantificação da atividade da LDH presente no meio de cultura. Esta é uma enzima citoplasmática e a sua presença no meio de cultura é indicativo de lise celular e, conseqüentemente, de morte celular (SCHWARTZ e BODANSKY, 1968).

Os resultados apresentados na **Figura 11** mostram que o efeito inibitório do CTZ sobre a viabilidade da linhagem tumoral MCF-7 é potencializado de maneira significativa quando este é incorporado no interior de micelas. É possível observar que este efeito aumenta conforme a concentração de CTZ testada (25, 50 e 100 μ M). No painel A da **Figura 11** a porcentagem de inibição promovido pelo CTZ solúvel foi de

25,63% para a concentração de 25 μM , de 39,81% para a concentração de 50 μM e de 52,25% para a concentração de 100 μM de CTZ. Já na presença do CTZ incorporado em micelas, os valores encontrados foram bem mais significativos do que os encontrados para o CTZ solubilizado em DMSO. A porcentagem de inibição para a concentração de 25 μM foi de 49,37%, o que revela um aumento de 23,74% (subtraindo 49,37% de 25,63%) na capacidade inibitória quando comparado ao CTZ solúvel na mesma concentração. Nas concentrações de 50 e 100 μM , o efeito inibitório foi de 61,73% e 76,14%, respectivamente. Esses resultados demonstram um aumento da eficácia do CTZ micelar de 21,92% para a concentração de 50 μM e 23,89% para a concentração de 100 μM . Fazendo uma média entre as três concentrações, o CTZ micelar foi 23,18% mais eficaz que o CTZ solúvel, resultado este totalmente satisfatório. Por exemplo, em vez de utilizar 100 μM do CTZ solúvel para promover uma média de 50% de inibição, basta utilizar 25 μM do mesmo fármaco, só que agora em um sistema de microemulsão. Assim, promove-se a mesma inibição, porém a quantidade de CTZ necessária é 5 vezes menor.

Esses dados são confirmados analisando a viabilidade celular através da atividade da LDH extravasada do meio de cultura (painel B da **Figura 11**), que mostrou resultados semelhantes.

Além disso, confirmamos que esses efeitos inibitórios observados no gráfico anterior (**Figura 11**) ocorreram devido a ação exclusiva do CTZ e não devido a algum componente da micela (Tween 80, DMSO ou H_2O), uma vez que o tratamento das células MCF-7 com as micelas sem CTZ, não promoveu nenhuma alteração da viabilidade (**Figura 12**). Ou seja, o sistema microemulsionado sem a presença do fármaco não promove qualquer toxicidade. Para essa análise, como não é possível calcular a concentração de micela vazia a ser utilizada, usamos os mesmos volumes que foram utilizados para os testes com a micela incorporada por CTZ.

Quando avaliamos o efeito do CTZ micelar sobre a viabilidade de linhagens não tumorais, as linhagens controle C2C12 (**Figura 13A**) e MCF-10A (**Figura 13B**), observamos que a integridade dessas linhagens foi mantida mesmo quando tratadas com concentrações de até 100 μM de CTZ micelar. Este resultado corrobora com outros dados previamente publicados pelo nosso grupo de pesquisa, onde foi mostrado a alta

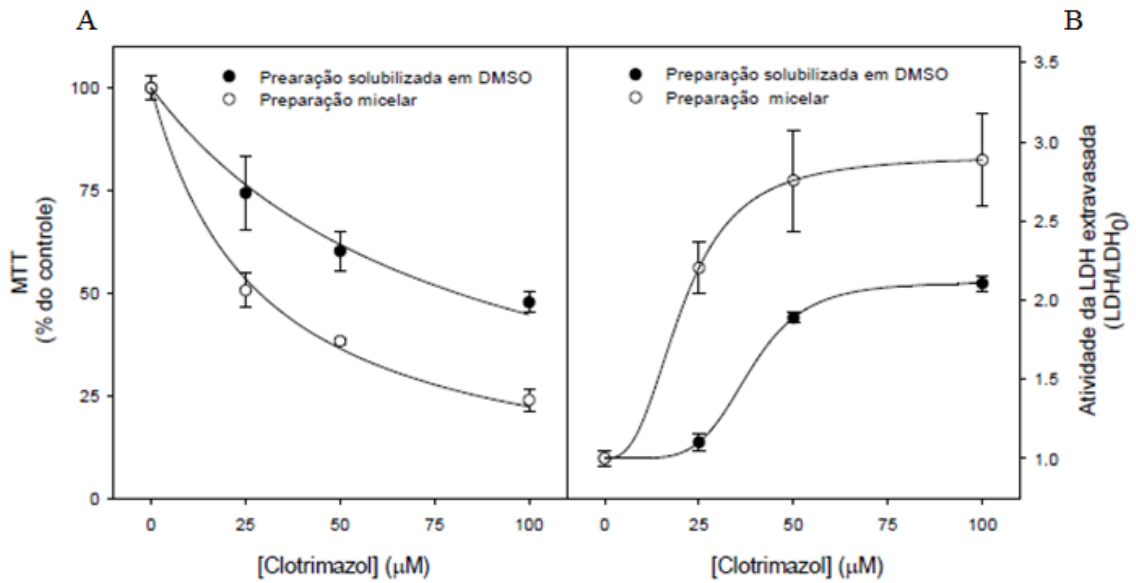


Figura 11 – Efeito do CTZ solúvel e micelar sobre a viabilidade celular da linhagem MCF-7. O ensaio de MTT (painel A) e a quantificação da atividade da LDH (painel B) na presença de 50 e 100 µM de CTZ solúvel (círculos pretos) e micelar (círculos brancos) por 24h, foi realizada conforme descrito no Material e Métodos. Os valores são a média ± erro padrão de no mínimo três experimentos independentes ($n \geq 3$).

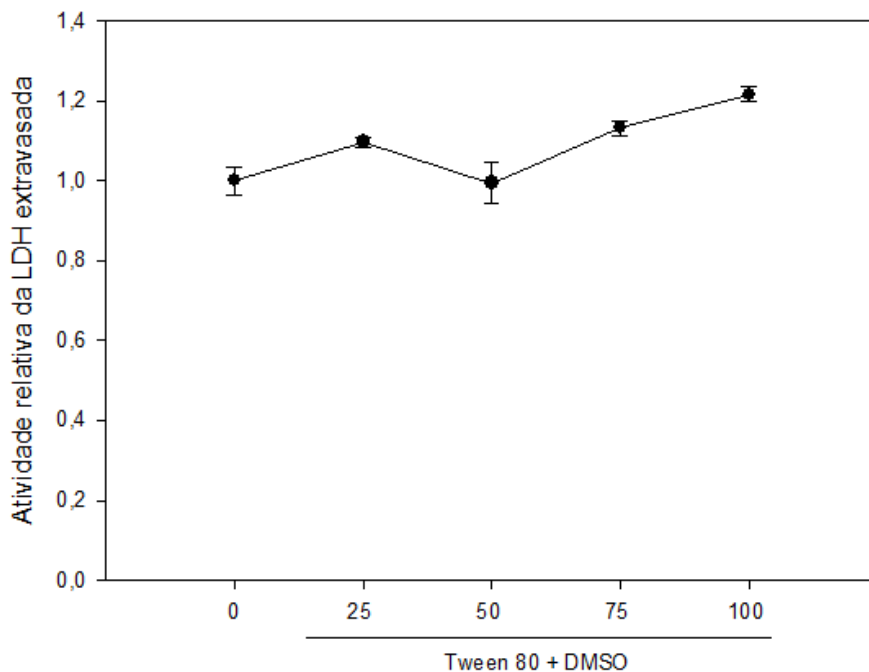


Figura 12 – Efeito da micela sem CTZ sobre a viabilidade celular da linhagem MCF-7. O ensaio de quantificação da atividade da LDH na presença da micela sem CTZ foi avaliado conforme descrito em Material e Métodos. Os valores representam a média ± erro padrão de no mínimo 3 experimentos ($n \geq 3$).

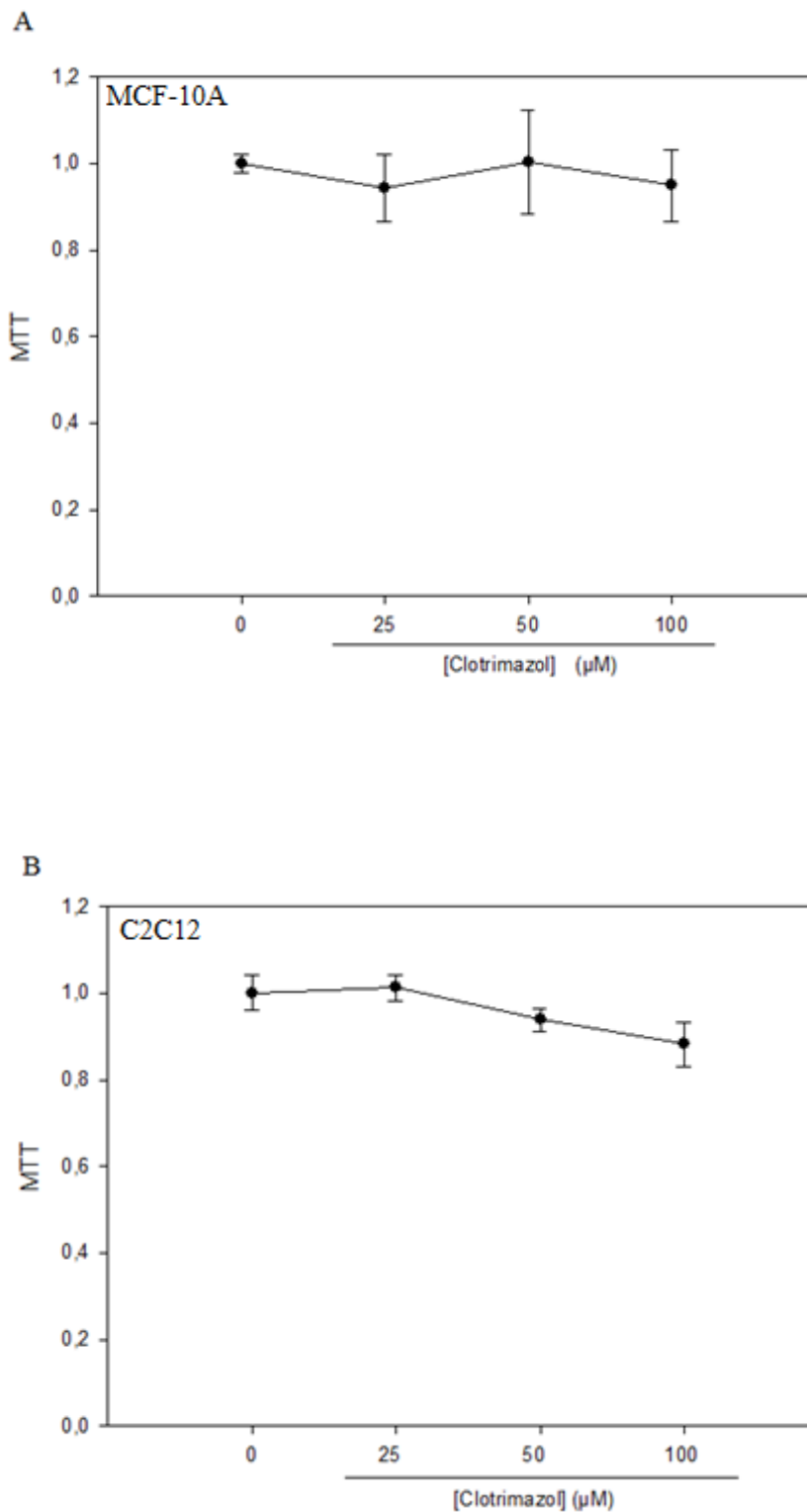


Figura 13 – Efeito do CTZ micelar sobre a viabilidade celular das linhagens não tumorais, MCF-10A e C2C12. O ensaio de MTT foi avaliado conforme descrito em Material e Métodos. Painel A: MCF-10A. Painel B: C2C12. Os valores representam a média \pm erro padrão de no mínimo 3 experimentos ($n \geq 3$).

Para finalizar esta primeira parte de resultados, analisamos a viabilidade celular da linhagem MCF-7 ao longo do tempo de incubação com o fármaco na sua forma micelar. Lembrando que o tempo de incubação das células com o CTZ, em todos os experimentos realizados até aqui, foi de 24h. A **Figura 14** mostra que a resposta ao fármaco além de ser dependente da concentração de CTZ usada, como visto nos gráficos anteriores, também é dependente do tempo de incubação, se mostrando gradual ao longo do tempo. Interessantemente, esse mesmo perfil é visto na **Figura 10**. Inicialmente, no tempo de 3h de incubação não observamos nenhum efeito inibitório sobre a viabilidade, nas duas concentrações testadas (**Figura 14**), como também não observamos alteração no tamanho das micelas (**Figura 10**). Com o decorrer do tempo é possível observar uma aumento do efeito inibitório (**Figura 14**) concomitante a uma alteração do tamanho das micelas, as quais tornam-se cada vez maiores (**Figura 10**). Esses resultados sugerem que a medida que o CTZ é liberado pelas micelas, ocorre a inibição da viabilidade celular, um efeito dependente do tempo de exposição e da dose do fármaco.

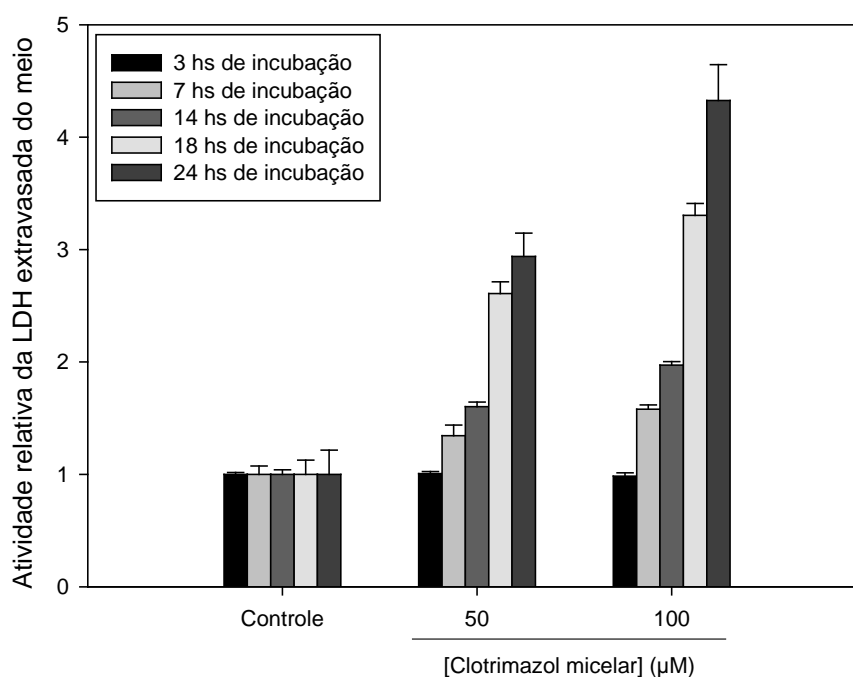


Figura 14 – Efeito do CTZ micelar sobre a viabilidade celular da linhagem MCF-7 ao longo do tempo. A viabilidade celular ao longo do tempo foi avaliada pela quantificação da atividade da LDH extravasada do meio de cultura na presença de 50 e 100 µM de CTZ micelar conforme descrito no Material e Métodos. Os valores representam a média \pm erro padrão de no mínimo 3 experimentos ($n \geq 3$).

4.2.2 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA CELULAR

A definição bioquímica para o câncer é a perda do controle dos mecanismos de proliferação, diferenciação e morte celular (MOFFAT et al., 2000). O CTZ solúvel inibe a migração e a proliferação de linhagens de câncer de mama, MCF-7 e MDA-MB-231 (FURTADO et al., 2012). Como esses mecanismos são diretamente dependentes da morfologia celular, resolvemos investigar se o CTZ micelar é responsável por induzir alguma alteração morfológica na linhagem tumoral MCF-7. Diversas técnicas microscópicas podem ser empregadas para a caracterização da morfologia celular, apresentando particularidades distintas. Para tal, três diferentes tipos de microscopia foram realizados: microscopia de luz por coloração de giemsa, microscopia de luz de contraste interferencial diferencial de Nomarski (DIC) e microscopia eletrônica de varredura.

Primeiramente, analisamos células controle e tratadas com 50 e 100 μM de CTZ micelar por microscopias de campo claro onde as células após o período de tratamento eram fixadas e coradas com giemsa ou processadas para microscopia de luz de contraste interferencial diferencial de Nomarski (DIC), gerando uma imagem com maior percepção da superfície celular. Nos controles (painel A das **Figuras 15 e 16**), as células apresentaram aspecto característico: com longos prolongamentos, formato estrelado e aderidas entre si e à superfície. Após 24h de incubação com CTZ micelar, a morfologia normal das células da linhagem MCF-7 foi alterada de maneira bem significativa. O tratamento com 50 μM e 100 μM de CTZ micelar (painel C e B das **Figuras 15 e 16**), promoveu a contração das projeções celulares, levando a um enrugamento da célula, gerando, desta forma, células fusiformes, já na menor concentração de CTZ utilizada, enquanto observamos formas totalmente arredondadas com o aumento da concentração de CTZ. Note um acúmulo do corante giemsa na extremidade celular da **Figura 15** (painel B e C) e a perda de comunicação celular (painel C) quando comparado com células controle nos painéis A. Estas contrações nas protuberâncias de membrana afetam a adesão celular, o que pode explicar a diminuição na viabilidade celular (**Figura 11**) e da proliferação e migração celular visto por FURTADO et al., (2012) com CTZ solúvel. Como controle, realizamos a incubação das células com micelas vazias, isto é sem CTZ, para investigar se estariam interferindo na morfologia celular

(*inset* do painel A das **Figuras 15 e 16**). Nota-se que não se observa diferenças morfológicas relevantes entre esses dois grupos.

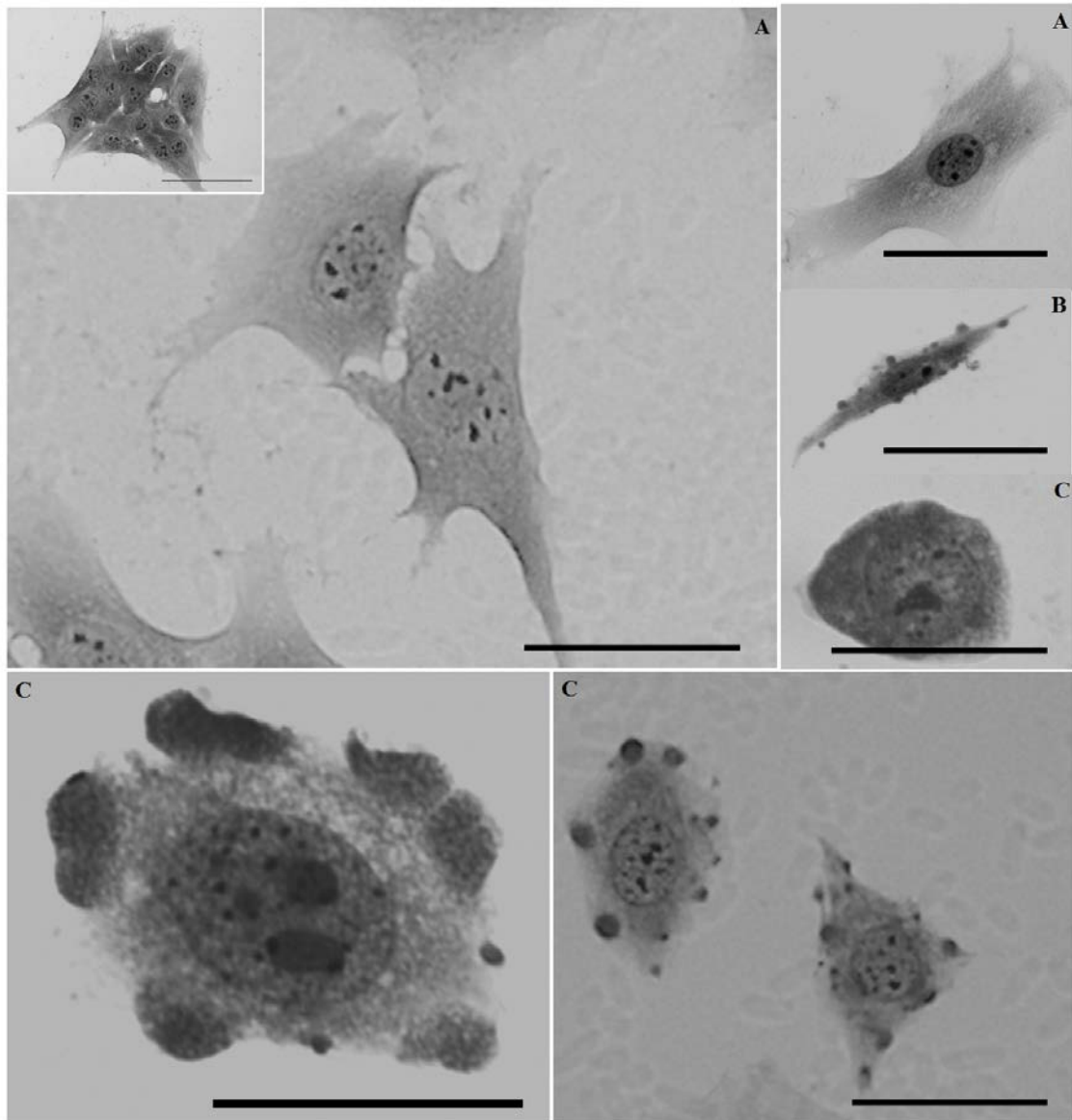


Figura 15. Microscopia de luz por coloração de Giemsa das células MCF-7 após o tratamento com CTZ micelar. A preparação para a microscopia foi feita como descrito em Material e Métodos. Painel A: células sem tratamento, *inset*: células tratadas com micelas sem CTZ. Painel B: células tratadas com 50 μM de CTZ micelar. Painel C: células tratadas com 100 μM de CTZ micelar.

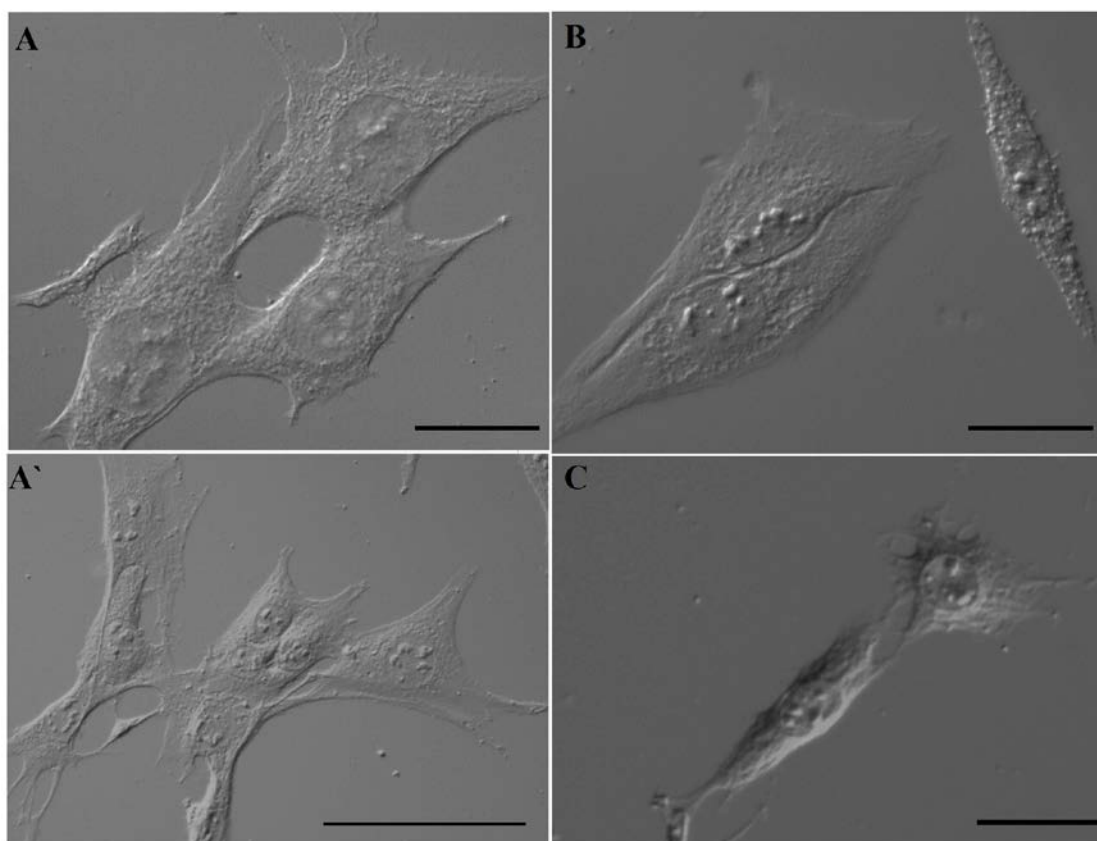


Figura 16. Microscopia de luz de contraste interferencial diferencial de Nomarski (DIC) das células MCF-7 após o tratamento com CTZ micelar. A preparação para a microscopia foi feita como descrito em Material e Métodos. Painei A: células sem tratamento. Painei A': células tratadas com micelas sem CTZ. Painei B: células tratadas com 50 μM de CTZ micelar. Painei C: células tratadas com 100 μM de CTZ micelar

Uma das limitações da microscopia de luz, entretanto, é o aumento máximo conseguido que fica em torno de 2.000 vezes. Como consequência, pequenos detalhes estruturais não são possíveis de serem detectados através desta técnica. Neste sentido, a microscopia eletrônica de varredura (MEV) permite alcançar aumentos muito superiores ao da microscopia ótica, produzindo imagens de alta resolução da superfície da amostra. Essas imagens tem uma aparência tridimensional característica, resultado direto da grande profundidade de campo. Neste trabalho, as imagens de MEV apresentam um aumento na faixa de 5.000 – 8.000 vezes.

Desta forma, analisamos as alterações morfológicas proporcionadas pelo tratamento com CTZ micelar por MEV. Células controle apresentaram a morfologia característica da linhagem MCF-7, como descritos anteriormente pela microscopia

ótica. Na **Figura 17**, notamos um grande número de vesículas na superfície celular, característico de células cancerígenas, pois são importantes na sinalização celular. Após o tratamento por 24h com CTZ micelar (painel B e C) observamos uma alteração na forma celular, sendo, por MEV, melhor visualizada a perda da aderência descrita anteriormente. Note uma diminuição significativa na presença de vesículas na superfície celular na presença de 100 μM de CTZ micelar (painel C).

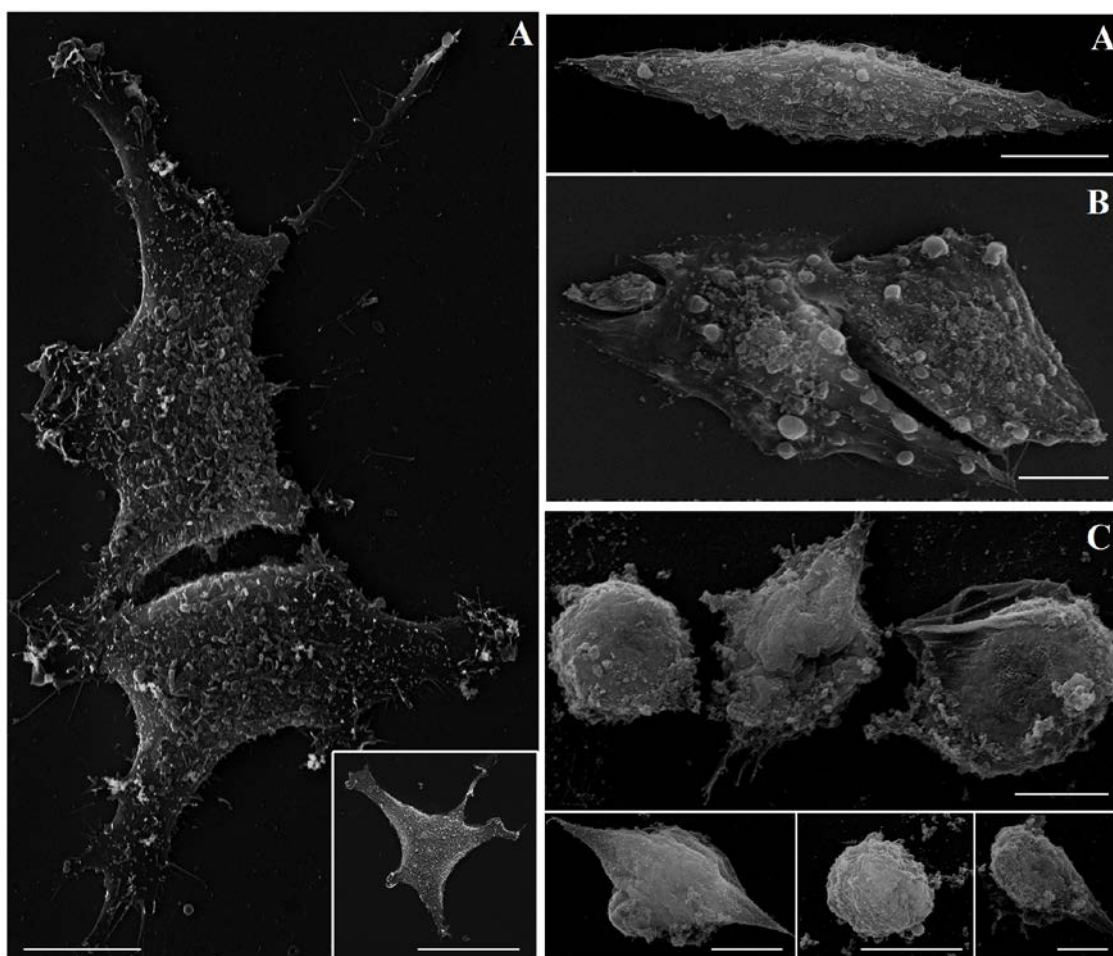


Figura 17. Microscopia eletrônica de varredura das células MCF-7 após o tratamento com CTZ micelar. A preparação para a microscopia foi feita como descrito em Material e Métodos. Painel A: células sem tratamento, *inset*: células tratadas com micelas sem CTZ. Painel B: células tratadas com 50 μM de CTZ micelar. Painel C: células tratadas com 100 μM de CTZ micelar.

Para finalizar esse grupo de resultados, as **Figuras 18 e 19** mostram um panorama geral do que já foi evidenciado nos gráficos anteriores. A **Figura 18** apresenta a microscopia eletrônica de varredura e a **Figura 19** mostra a microscopia ótica por coloração de giemsa. Nestas imagens podemos observar tanto as alterações morfológicas já mostradas anteriormente, como também a redução do número de células nos campos tratados com o CTZ micelar (painel B e C).

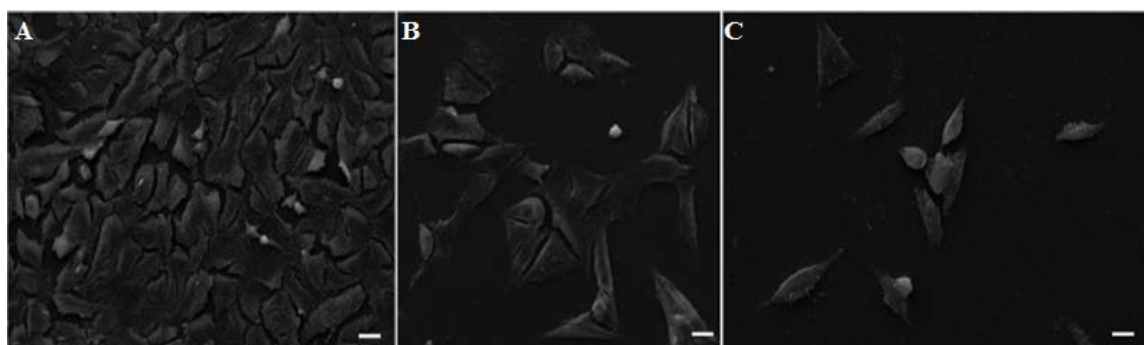


Figura 18. Panorama geral: microscopia eletrônica de varredura das células MCF-7 após o tratamento com CTZ micelar. A preparação para a microscopia foi feita como descrito em Material e Métodos. Painel A: controle. Painel B: células tratadas com 50 μM CTZ micelar. Painel C: células tratadas com 100 μM CTZ micelar.

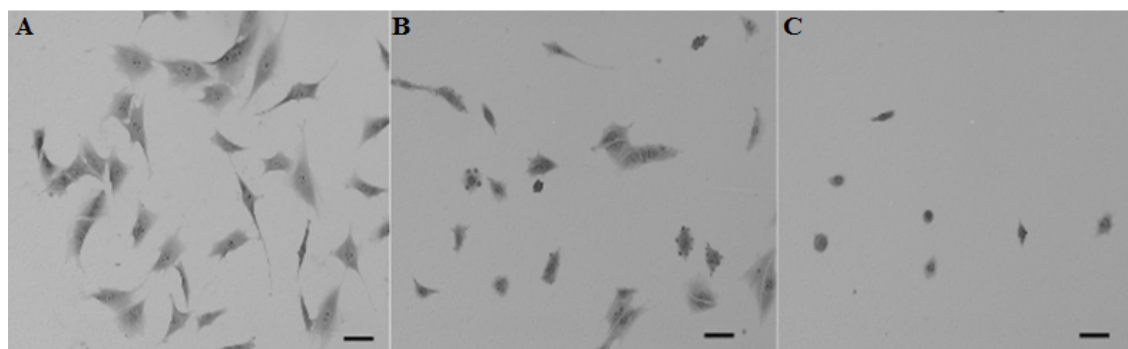


Figura 19. Panorama geral: microscopia ótica por coloração de Giemsa das células MCF-7 após o tratamento com CTZ micelar. A preparação para a microscopia foi feita como descrito em Material e Métodos. Painel A: células sem tratamento. Painel B: células tratadas com 50 μM CTZ micelar. Painel C: células tratadas com 100 μM CTZ micelar.

4.3 ESTUDO DO METABOLISMO DE GLICOSE

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, 2003). Além do que, a observação quase universal da glicólise aeróbica em cânceres humanos invasivos, sua persistência mesmo em 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). Por esses motivos, esta via tem se tornado um importante alvo para terapia antineoplásica.

Em publicações recentes do nosso grupo de pesquisa, foi mostrado que o CTZ na sua forma solúvel é capaz de inibir de forma direta a atividade das enzimas glicolíticas PFK e HK purificadas de músculo esquelético de coelho (ZANCAN et al., 2007; MARCONDES et al., 2010; MARCONDES et al., 2011; FURTADO et al., 2012). O fármaco também promove o desligamento da PFK do citoesqueleto de diversas linhagens tumorais (GLASS-MARMOR et al., 1997; PENSO e BEITNER, 2002a e 2002b, MEIRA et al., 2005) e de tecidos de carcinoma mamário (COELHO et al., 2011) e, dessa forma, diminui a sua atividade. Mais recentemente foi demonstrado que a atividade das três enzimas chaves da glicólise, HK, PFK e PK, é diminuída pela ação do CTZ em linhagens tumorais de mama humana, afetando assim todo o fluxo glicolítico. Essa diminuição do fluxo glicolítico é caracterizada pela diminuição da eficiência glicolítica, que corresponde a razão entre lactato produzido e glicose consumida (FURTADO et al., 2012).

Aqui, nosso objetivo foi verificar se o efeito inibitório do CTZ incorporado em micelas sobre a atividade de enzimas da via glicolítica é potencializado quando comparado a sua forma solubilizada em DMSO. Na **Figura 11** já foi visto que o sistema de microemulsão proposto neste trabalho aumentou significativamente a eficácia inibitória do CTZ sobre a viabilidade celular. Sobre a atividade das enzimas glicolíticas (**Figura 20**, painéis A, B e C) observamos inicialmente que as três enzimas são alvo do efeito inibitório do CTZ. A inibição da atividade da HK (painel A) pelo CTZ solúvel foi de 14,45% e 53,39% nas concentrações de 50 e 100 μ M, respectivamente. Entretanto, novamente o CTZ micelar se mostrou mais potente que o CTZ solúvel, promovendo

21,39% a mais de inibição na concentração de 50 μM e 41, 55% na concentração de 100 μM de CTZ. A única exceção a ação mais eficiente do CTZ micelar frente ao solúvel correspondeu a atividade da enzima PFK (painel B). Embora neste caso, o CTZ micelar não tenha apresentado maior efeito, o resultado não foi inferior ao do CTZ solúvel, sendo praticamente o mesmo para as duas formulações. Na concentração de 50 μM a porcentagem de inibição promovido pelo CTZ solúvel e micelar foi de 78,46% e 81,80%, respectivamente. Adicionalmente, na concentração de 100 μM do fármaco, a porcentagem de inibição promovido pelo CTZ solúvel e micelar foi de 90,58% e 88,53%, respectivamente. Apesar de não observamos diferença significativa, observamos a alta capacidade inibitória do CTZ sobre a PFK, que fica em torno de 90%. Por fim, a terceira e última enzima glicolítica a ser analisada foi a PK (painel C). Assim como observado para a enzima HK, a capacidade inibitória do CTZ micelar foi superior ao CTZ solúvel. Em dados numéricos isso representa um aumento de inibição de 17,79% e 21,28% nas concentrações de 50 μM e 100 μM , respectivamente.

A hipótese de Warburg consiste no fato de que as células tumorais exibem um metabolismo alterado caracterizado pelo aumento da captação de glicose e produção de lactato (WARBURG, 1956). Resultados previamente descritos mostraram a alta capacidade inibitória do CTZ sobre a atividade das enzimas chave da glicólise; nosso objetivo agora foi verificar como está a produção do produto final dessa via, o lactato. Desta maneira seria possível confirmar a capacidade do CTZ em alterar todo o fluxo glicolítico, comparando, principalmente, os resultados do CTZ solúvel com o micelar. No painel D da **Figura 20**, podemos observar a capacidade da CTZ em diminuir a produção de lactato em todas as concentrações testadas. Neste ensaio o CTZ micelar também se mostrou mais eficiente que o solúvel, tanto na concentração de 50 μM , promovendo o dobro da porcentagem de inibição, de 3,76% para 7,65%, como para a concentração de 100 μM , onde promoveu uma redução de 10,67%, enquanto que o fármaco solúvel só atingiu 7,98% de inibição da produção de lactato. Esses resultados indicam que o CTZ modula negativamente o metabolismo glicolítico de forma a reverter o fenótipo glicolítico encontrado em tumores. Essa significativa inibição sobre as enzimas chaves da glicólise, juntamente com a inibição da produção de lactato indica que o fármaco afeta principalmente o metabolismo fermentativo, que é característico de tumores.

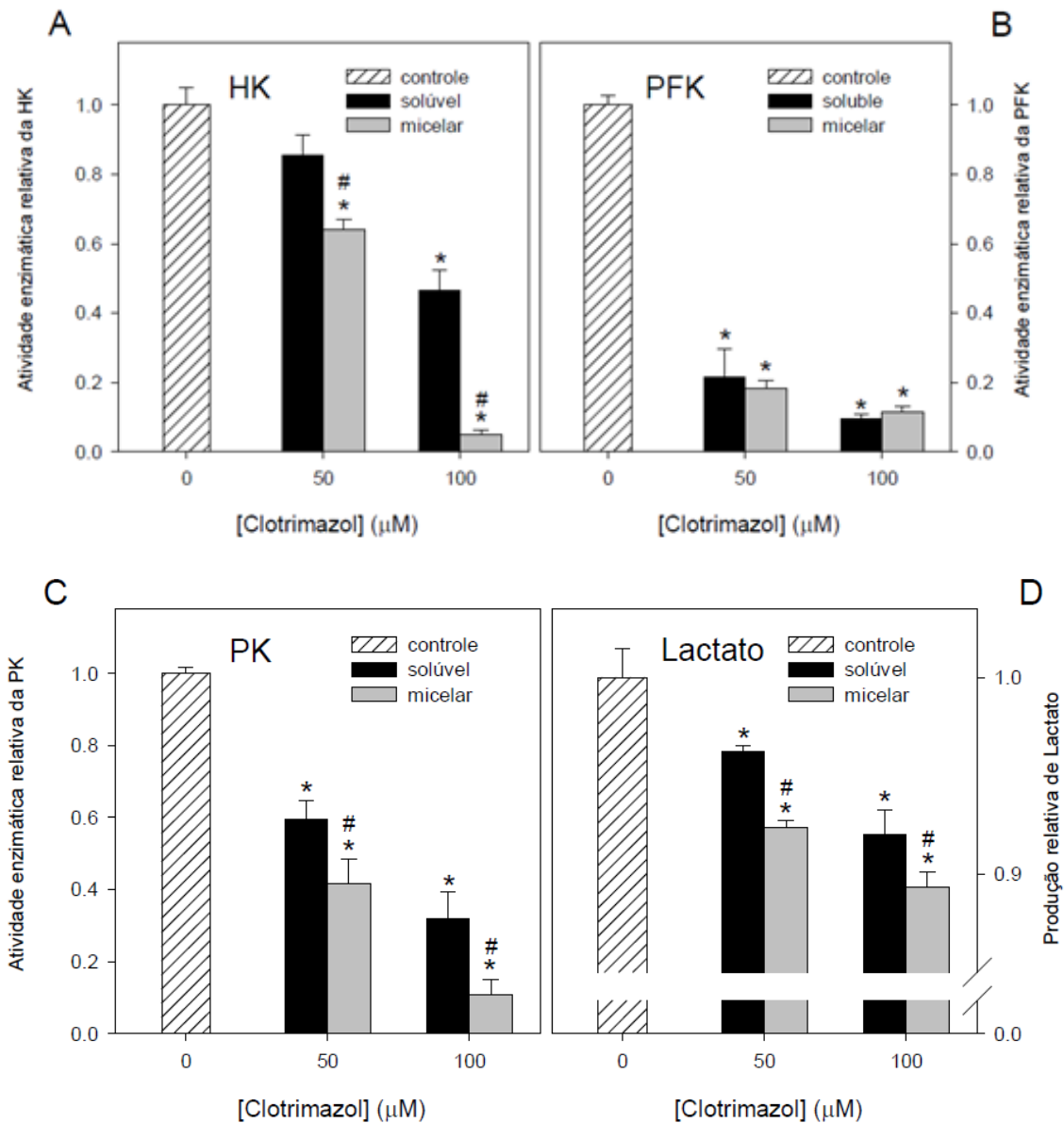


Figura 20. Efeito do CTZ solúvel e micelar sobre a atividade da via glicolítica. A atividade das enzimas glicolíticas HK (painel A), PFK (painel B), PK (painel C) e a produção de lactato (painel D) na presença de 50 e 100 μM de CTZ solúvel (barras pretas) e micelar (barras cinzas) por 24h, foi realizada através conforme descrito no Material e Métodos. Os valores são a média ± erro padrão de no mínimo três experimentos independentes ($n \geq 3$). * $p \leq 0,05$ comparando com o controle, na ausência do fármaco. # $p \leq 0,05$ quando comparado ao CTZ na sua forma solúvel.

Como previamente relatado, após a entrada da glicose na célula, esta será convertida, pela HK, em glicose 6-fosfato, o que garante a sua permanência dentro da célula. Esse produto pode seguir três caminhos: entrar na glicólise via fosfoglicose isomerase; ser convertida em glicose 1-fosfato pela fosfoglicomutase, que é a primeira etapa da síntese de glicogênio; ou ser metabolizada pela glicose 6-fosfato desidrogenase

(G6PDH), a primeira enzima da via das pentoses fosfato. Seguindo o terceiro caminho, há também a produção do cofator NADPH, que é o agente redutor mais importante da célula, sendo essencial para as reações antioxidantes mediadas por glutatona (ZHU et al., 2009). A G6PDH é uma enzima chave da via das pentoses que catalisa uma reação irreversível em condições fisiológicas, convertendo glicose 6-fosfato em 6 fosfogluconato. Dados da literatura mostram que a G6PDH além de desempenhar papel crítico na regulação do potencial redox, estimula a proliferação celular, através da produção de riboses, promovendo assim a biossíntese de nucleotídeos e ácidos nucleicos (TIAN, 1998).

Na **Figura 21**, observamos a alta capacidade inibitória do CTZ sobre a atividade catalítica da G6PDH, onde na concentração de 100 μM o efeito inibitório do CTZ micelar foi praticamente total e na concentração de 50 μM a inibição foi 75,55%. Por outro lado a inibição promovido pelo CTZ solúvel só conseguiu atingir 39,64% e 84,91% para 50 e 100 μM , respectivamente.

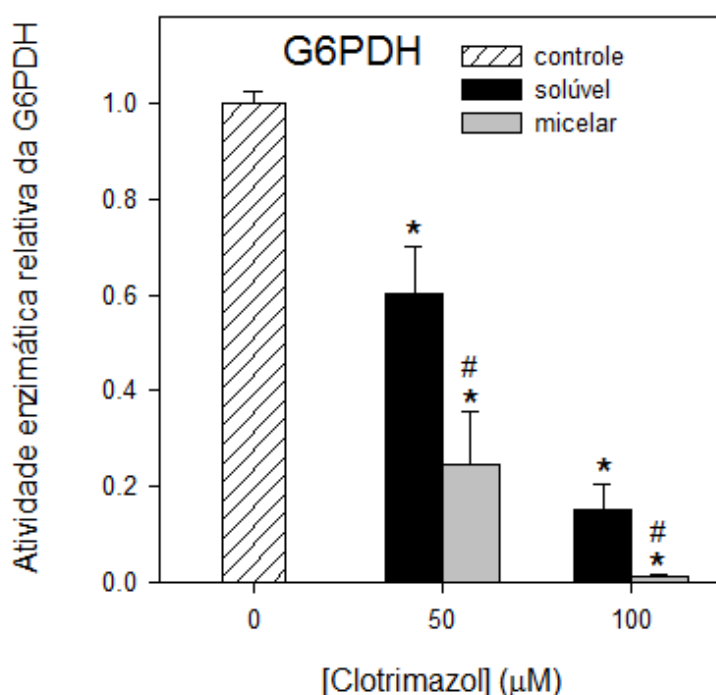


Figura 21. Efeito do CTZ solúvel e micelar sobre a atividade da enzima chave da via das pentoses, a G6PDH. A atividade enzimática da G6PDH na presença de 50 e 100 μM de CTZ solúvel (barras pretas) e micelar (barras cinzas) por 24h, foi realizada conforme descrito no Material e Métodos. Os valores são a média \pm erro padrão de no mínimo três experimentos independentes ($n \geq 3$). * $p \leq 0,05$ comparando com o controle, na ausência do fármaco. # $p \leq 0,05$ quando comparado ao CTZ na sua forma solúvel.

Com base nos resultados mostrados anteriormente, podemos pressupor que além da redução da atividade da G6PDH, ocorra também uma diminuição da regeneração de NADPH. Sendo assim, esses resultados estimularam a investigação dos efeitos inibitórios do CTZ sobre o metabolismo oxidativo mitocondrial. Visto a importância da mitocôndria, não só como uma organela produtora de ATP, mas também como produtora de ROS e assim indutora de um estado de estresse oxidativo (WALLACE, 1997; SOLAINI et al., 2010).

4.4 ESTUDO DO METABOLISMO MITOCONDRIAL

Após observar a capacidade do CTZ em bloquear a glicólise, resolvemos investigar seu potencial sobre outra importante via energética e de grande importância para a homeostasia celular, o metabolismo mitocondrial. É importante ressaltar que ao contrário dos estudos já publicados sobre o papel do CTZ solúvel sobre o metabolismo glicolítico, ainda não foram encontrados dados na literatura sobre estudos que relatem o efeito do CTZ sobre o metabolismo mitocondrial. O único estudo até então realizado sobre essa relação foi a capacidade do CTZ em promover o desligamento da isoforma 2 da HK da mitocôndria, resultando em uma diminuição da viabilidade celular. Primeiramente, este mecanismo de ação do CTZ foi observado por PENSO e BEITNER em 1998, mas posteriormente confirmado em vários estudos, que ainda relacionaram esse evento com a indução de morte celular por apoptose (MAJEWSKI et al., 2004; CHIARA et al., 2008; NEARY e PASTORINO, 2013),

Inicialmente, para avaliar o metabolismo aeróbico mitocondrial, a atividade enzimática da succinato desidrogenase (SDH) foi mensurada, uma vez que a atividade dessa enzima é considerada um indicador da atividade de todo o ciclo de Krebs (PISTOLLATO et al., 2010). Na **Figura 22**, o malonato (um inibidor competitivo da SDH) promoveu 25,78% de inibição sobre a atividade da SDH, um valor muito semelhante ao encontrado com 100 μ M de CTZ solúvel (24,09%) e com 50 μ M de CTZ micelar (24,38%). Isso significa que para atingir a média de 25% de inibição, em vez de utilizar 100 μ M do CTZ solúvel, esse mesmo resultado é alcançado com 50 μ M de CTZ micelar, ou seja, com apenas metade da concentração da formulação solúvel. Um valor

maior de inibição foi encontrado com 100 μM de CTZ micelar, que atingiu 35,25% de inibição da atividade da SDH.

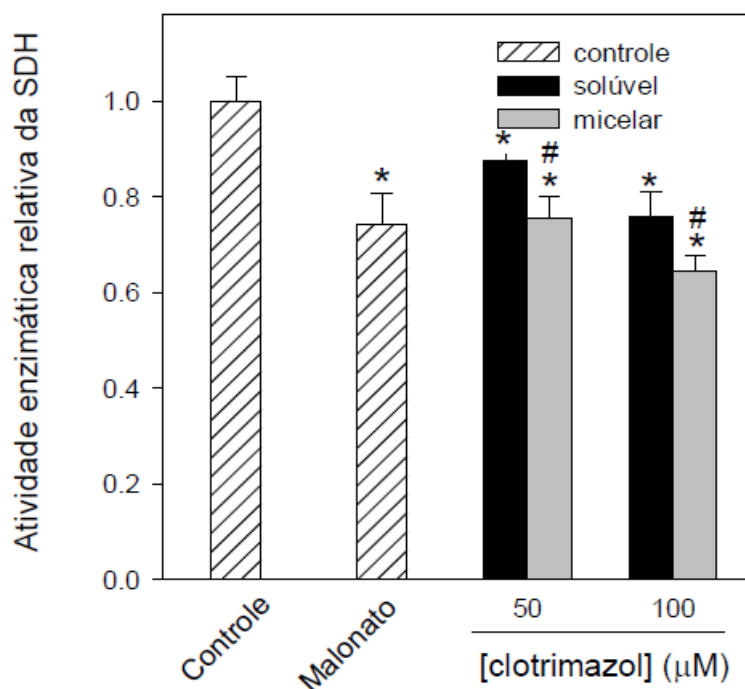


Figura 22. Efeito do CTZ solúvel e micelar sobre a atividade enzimática da SDH. A atividade da SDH na presença de 50 e 100 μM de CTZ solúvel (barras pretas) e micelar (barras cinzas) por 24h, foi avaliada conforme descrito no Material e Métodos. Os valores são a média \pm erro padrão de no mínimo três experimentos independentes. * $p \leq 0,05$ comparando com o controle, na ausência do fármaco. # $p \leq 0,05$ quando comparado ao CTZ na sua forma solúvel.

Posteriormente, analisamos a ultraestrutura de células controle e tratadas com CTZ micelar. A análise ao microscópio eletrônico de transmissão permitiu a análise ultraestrutural das mitocôndrias das células MCF-7 assim como as alterações induzidas após o tratamento com CTZ micelar. A análise de imagens obtidas ao microscópio eletrônico e estudos bioquímicos têm sido de grande valor para melhor conhecer a ultraestrutura e a fisiologia mitocondrial.

Micrografias do grupo controle sem nenhum tratamento (**Figura 23**, painel A) e tratadas com as micelas sem o CTZ (*inset* do painel A da **Figura 23**) apresentaram mitocôndrias com morfologia normal e intacta, onde é possível observar sua morfologia

típica, caracterizada por uma membrana dupla contendo uma matriz homogênea e um sistema paralelo de cristas. Por outro lado, as mitocôndrias do grupo tratado com 50 μM e 100 μM CTZ micelar, representados pelos painéis B e C, respectivamente, mostraram uma morfologia alterada da mitocôndria. Estas alterações consistem em um encurtamento e redução do número de cristas, como também uma diminuição da densidade da matriz, gerando imagens mais translúcidas, indicando esvaziamento do conteúdo no interior da organela. É possível observar também um intenso processo de vacuolização na presença do tratamento com CTZ, sendo estas mudanças mais evidentes na presença de 100 μM de CTZ micelar. Alterações na estrutura mitocondrial de células MCF-7 similares a estas foram induzidas pelo antioxidante lauril galato, que assim como CTZ, vem apresentando promissores efeitos antitumorais (CALCABRINI et al., 2006).

Considerando os efeitos promovidos pelo CTZ sobre a atividade da SDH e sobre a morfologia mitocondrial, pode-se sugerir que o potencial elétrico transmembranar mitocondrial também esteja sendo afetado. Durante o transporte de elétrons transferidos por substratos oxidáveis à cadeia respiratória, a mitocôndria é capaz de gerar um gradiente eletroquímico de prótons na membrana interna que conduz a síntese de ATP (MITCHELL, 1966). Este potencial é gerado pela diferença de cargas entre dois compartimentos aquosos separados pela membrana mitocondrial interna. Sendo que a manutenção deste gradiente eletroquímico é essencial para o equilíbrio das funções mitocondriais (NICHOLLS e FERGUNSON, 2002).

A análise desse potencial é feita através de uma técnica que se baseia na capacidade de um corante fluorescente específico se ligar diretamente a mitocôndria de células viáveis (JOHNSON et al., 1980). Alterações no potencial de membrana resultam em alterações na intensidade de fluorescência do corante. A sonda utilizada neste trabalho foi a rodamina 123, que é um corante fluorescente catiônico permeável a membrana celular, que é rapidamente sequestrado pela mitocôndria e tem sido amplamente usada como corante fluorescente de mitocôndria em células vivas (JOHNSON et al., 1980; RNOT et al., 1986) e em mitocôndria isolada (PETIT, 1992). Alterações no potencial mitocondrial transmembrânico levam ao efluxo da rodamina 123, gerando menor fluorescência (PERES e CURI, 2005).

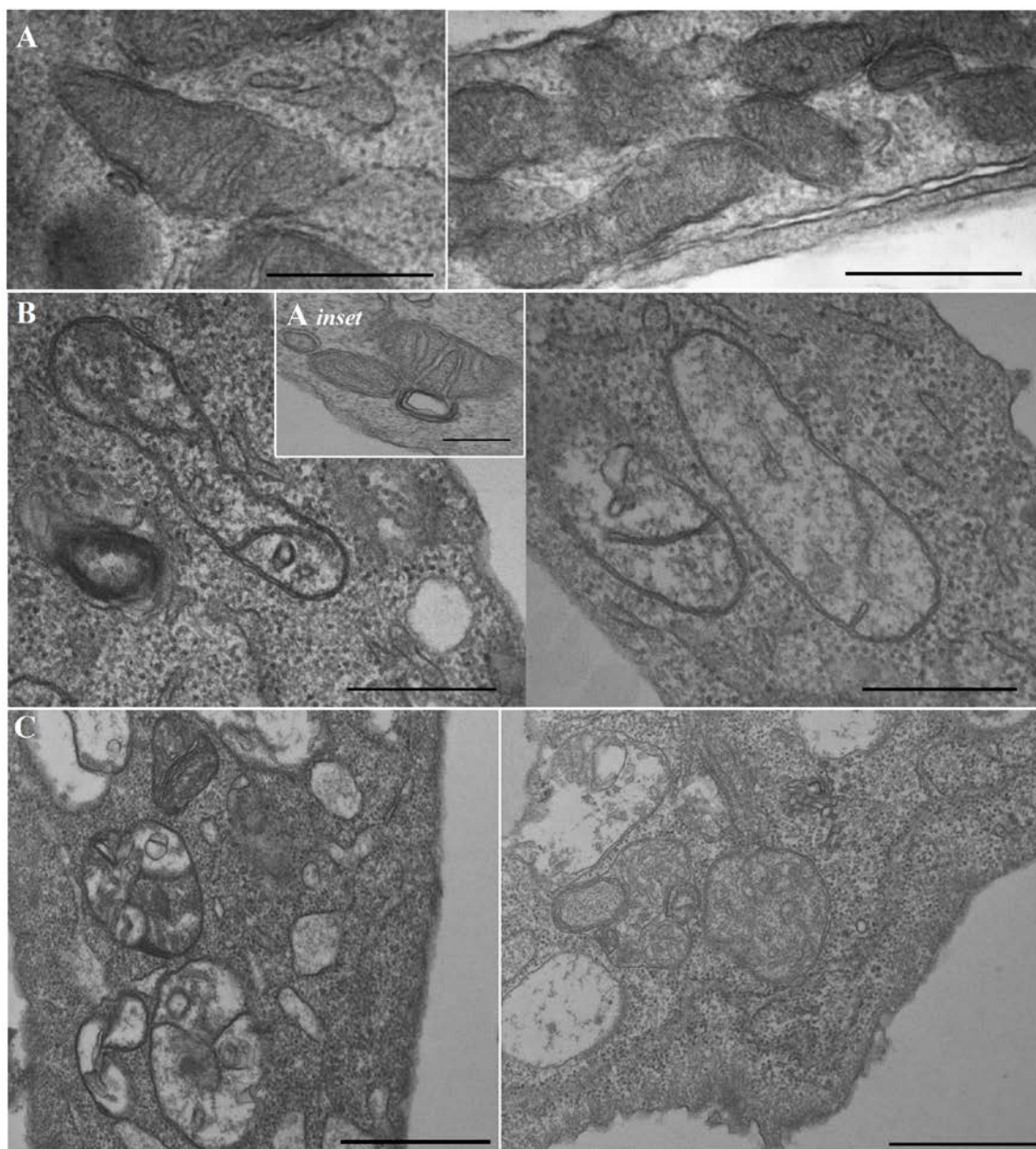


Figura 23. Microscopia eletrônica de transmissão da mitocôndria das células MCF-7 após o tratamento com CTZ micelar. A preparação para a microscopia foi feita como descrito em material e métodos. As Figuras 23A e 23A *inset* mostram as células MCF-7 sem tratamento e tratadas com as micelas sem CTZ (Tween 80 + DMSO + H₂O). As Figuras 23B e 23C mostram as células tratadas com 50 e 100 μ M de CTZ micelar, respectivamente.

De fato, é esse o fenômeno observado nas células MCF-7 quando tratadas com CTZ (**Figura 24**). Nota-se que todas as concentrações de CTZ testadas promoveram

uma alteração do potencial transmembrânico mitocondrial, uma vez que houve uma menor marcação da fluorescência do corante rodamina 123. O tratamento com 50 μM de CTZ promoveu uma redução de 8,67% (preparação solúvel) e de 11,56% (preparação micelar), no entanto, sem diferença estatística entre os tipos de formulação do CTZ. Por outro lado, 100 μM de CTZ micelar se mostrou mais potente que o CTZ solúvel em alterar o potencial transmembrânico, promovendo uma redução de 21,93%, enquanto o solúvel nessa mesma concentração promoveu somente uma redução de 14,56%.

Dessa forma, o CTZ alterou o potencial transmembrânico mitocondrial das células MCF-7, tornando-a despolarizada, quando comparado às células sem tratamento. E, além disso, o CTZ micelar foi mais potente que o solúvel na concentração de 100 μM CTZ.

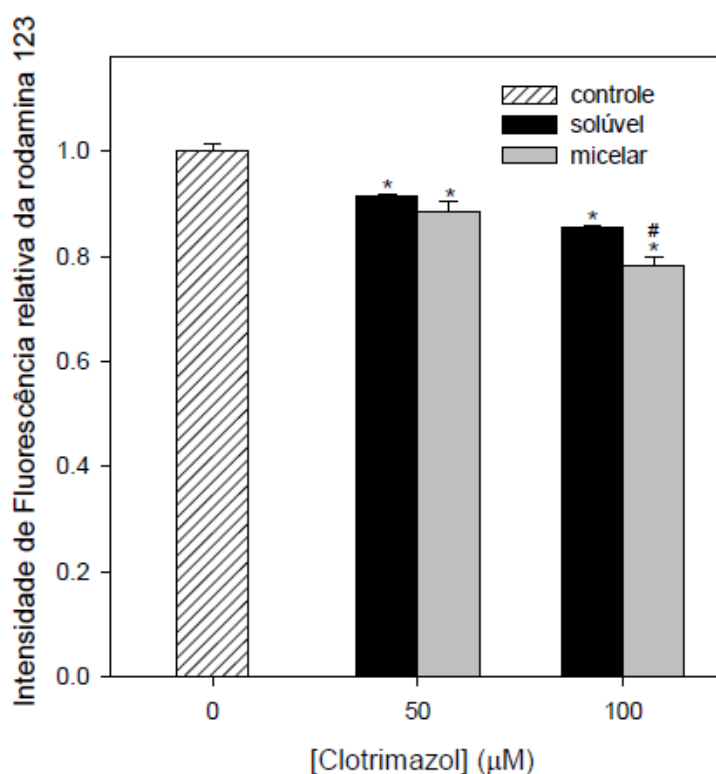


Figura 24. Análise do potencial transmembrânico mitocondrial na presença de CTZ solúvel e micelar. O potencial transmembrânico mitocondrial na presença de 50 e 100 μM de CTZ solúvel (barras pretas) e micelar (barras cinzas) por 24h, foi avaliada conforme descrito no Material e Métodos. Os valores são a média \pm erro padrão de no mínimo três experimentos independentes ($n \geq 3$). * $p \leq 0,05$ comparando com o controle, na ausência do fármaco. # $p \leq 0,05$ quando comparado ao CTZ na sua forma solúvel.

Até agora vimos, que o CTZ é capaz de alterar alguns pontos do metabolismo glicolítico e outros do metabolismo mitocondrial. Nosso próximo objetivo foi avaliar se essas alterações levam a célula a um quadro de estresse oxidativo. Para tal, três experimentos foram realizados: quantificação da produção de ATP, ROS e glutathione (Figura 25).

Dentre as funções das vias glicolítica e mitocondrial, podemos destacar o fornecimento de energia na forma de ATP. A produção de ATP seja pela glicólise (que é a principal fonte energética para as células tumorais - *efeito warburg*), seja pela via mitocondrial (que está reduzida em células tumorais), é imprescindível para o crescimento e proliferação tumoral (WARGURG, 1956). Nesse sentido, o objetivo agora foi avaliar o efeito do CTZ solúvel e micelar sobre a produção de ATP de células da linhagem tumoral MCF-7. Como visto no painel A da Figura 25, 50 μM de CTZ solúvel e micelar promoveu uma redução da produção de ATP em torno de 34%. Já na presença de 100 μM de CTZ micelar, houve 59,86% de redução na produção de ATP, enquanto que 100 μM de CTZ solúvel só conseguiu alcançar 48,10% de inibição. Ou seja, o CTZ foi capaz de reduzir o conteúdo intracelular de ATP, sendo o CTZ micelar, na concentração de 100 μM mais efetivo que o solúvel.

Após observar tantas alterações promovidas pelo CTZ sobre o metabolismo energético celular, resolvemos investigar o estado redox em que essas células da linhagem MCF-7 se encontram. Já é bem descrito na literatura que a cadeia respiratória mitocondrial está continuamente gerando ROS e que essas espécies promovem diversos danos a biomoléculas como proteínas, ácidos nucleicos e lipídios (KOWALTOWSKI e VERCESI, 1999). Neste sentido, nosso objetivo foi investigar se o CTZ solúvel e micelar alterou tanto o metabolismo mitocondrial a ponto de induzir a mitocôndria a uma maior produção de ROS.

A produção intracelular de ROS foi avaliada utilizando o diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH₂-DA). Esta molécula é uma sonda lipossolúvel não fluorescente que atravessa facilmente a membrana celular, sendo hidrolisada por esterases intracelulares a 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH₂). Estas são incapazes de atravessar a membrana celular, acumulando-se assim no interior das células. Na presença de ROS, a DCFH₂ é oxidada a 2',7'-diclorofluoresceína que apresenta fluorescência intensa (BASS et al., 1983). Esse corante reage com uma variedade de radicais e não- radicais, como os radicais hidroxil e nitroxil, peroxinitrito, ânion superóxido, assim como peróxido de hidrogênio, ou seja, revela o estresse oxidativo

celular de forma ampla (ROMA et al., 2009). No painel B da **Figura 25**, observamos que, de fato, após o tratamento das células tumorais (MCF-7) com CTZ, há um aumento na produção de ROS sendo este aumento de 1,98 e 3,18 vezes na presença de CTZ solúvel nas concentrações de 50 μ M e 100 μ M, respectivamente. No entanto, na presença de CTZ micelar, esse aumento foi significativamente maior: 2,92 e 4,66 vezes nas concentrações de 50 μ M e 100 μ M de CTZ, respectivamente.

Para finalizar este grupo de experimentos com o objetivo de caracterizar o estresse oxidativo celular, foi quantificado a concentração de glutathiona reduzida (GSH). A mais importante defesa contra as lesões oxidativas induzidas por ROS é a manutenção da homeostase pelo sistema glutathiona. A GSH é um tripeptídeo com grupo tiol livre presente em organismos aeróbicos e sintetizada na maioria das células. O tripeptídeo é formado pela condensação, ATP dependente, do ácido glutâmico à cisteína, catalizada pela g-glutamilcisteinil sintetase; a glicina é adicionada pela glutathiona sintetase. GSH é abundante no citosol, no núcleo e na mitocôndria das células, sendo o principal antioxidante solúvel nesses compartimentos. A GSSG (glutathiona oxidada) acumula-se dentro das células, e a razão GSH/GSSG é uma boa medida de estresse oxidativo no organismo, sendo mais alta a concentração de GSSG quanto maior o dano oxidativo (VALKO et al., 2007). A enzima glutathiona peroxidase catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e de outros hidroperóxidos lipídicos, utilizando GSH como um doador de elétrons. Desta forma, a glutathiona peroxidase reduz os níveis de peróxido consumindo GSH no processo. Por outro lado, a glutathiona redutase é a enzima responsável pela redução de GSSG a GSH. Essa enzima é importante para a manutenção dos níveis de GSH necessários para a atividade da glutathiona peroxidase (OTT et al., 2007). É importante ressaltar que a atividade da glutathiona redutase é dependente de NADPH e que o NADPH é formado através da reação catalisada pela G6PDH, sendo que esta última se encontra inibida pelo CTZ (**Figura 21**). Ou seja, provavelmente, menos NADPH está sendo formado, o que pode afetar a atividade da glutathiona redutase e assim comprometer a atividade antioxidante e a manutenção da homeostasia celular pelo sistema glutathiona.

De fato, observamos no painel C da **Figura 25** que 50 μ M de CTZ micelar promoveu 27,36% de redução do conteúdo de GSH, o que representa o dobro de inibição comparado ao CTZ solúvel. Na concentração de 100 μ M, o efeito do CTZ micelar também se mostrou superior, reduzindo em 52,65% o conteúdo de GSH, enquanto a mesma concentração de CTZ na forma solúvel, só atingiu 43,06%. Assim, a

partir de todos os resultados encontrados na **Figura 25**, podemos concluir que o estado de estresse oxidativo induzido pelo CTZ, caracterizado pela diminuição do conteúdo de ATP intracelular e principalmente pelo aumento de ROS, não consegue ser revertido pelo sistema antioxidante da glutathiona, uma vez que o conteúdo de GSH também sofre redução. Essa redução pode ser explicada em parte pela redução de NADPH fornecido, visto que já mostramos a inibição da G6PDH pelo CTZ (**Figura 21**).

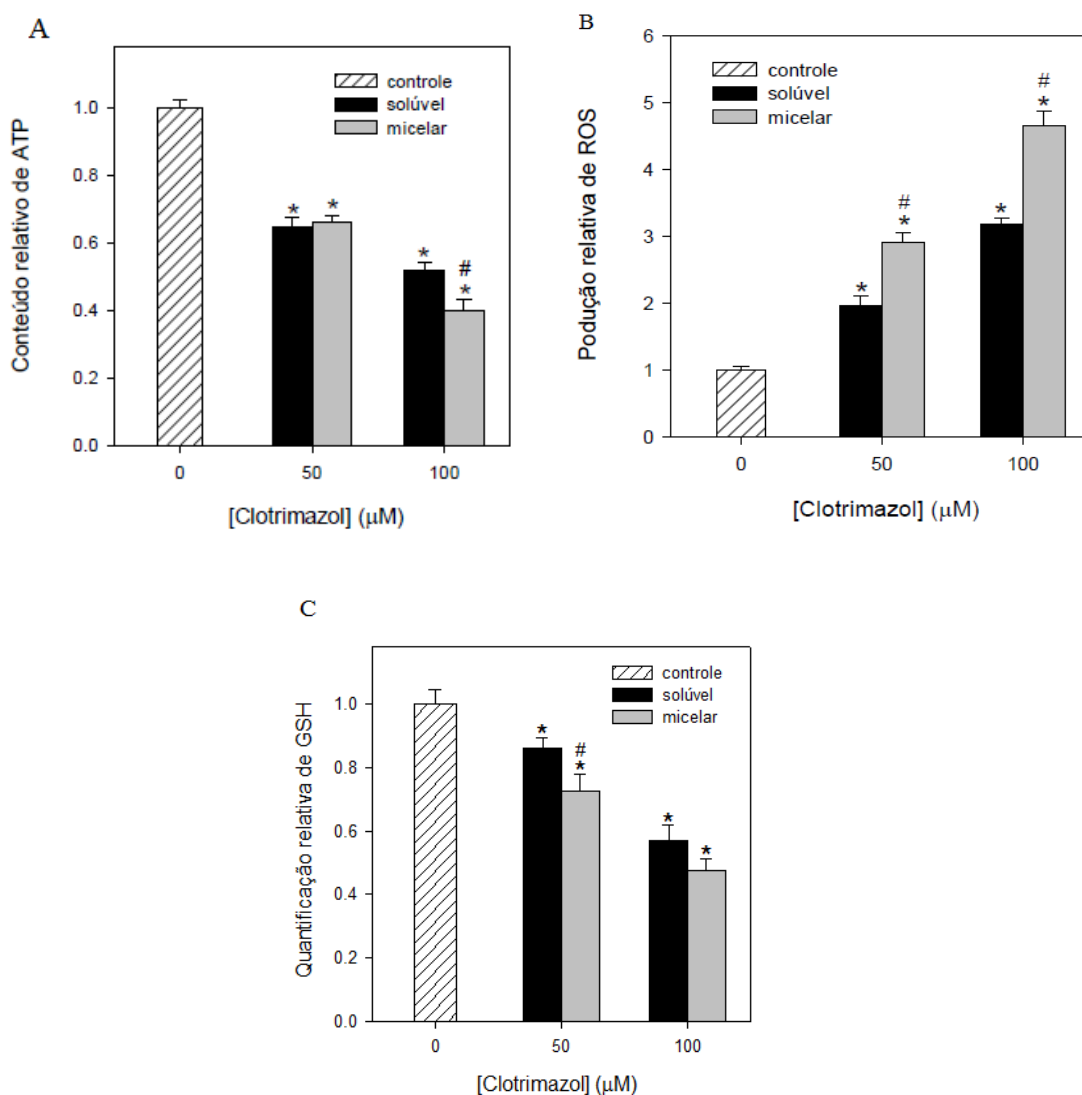


Figura 25. Estresse oxidativo induzido pelo CTZ solúvel e micelar. A produção de ROS (painel A), a produção de ATP (painel B) e a produção de glutathiona reduzida (GSH) (painel C) na presença de 50 e 100 μM de CTZ solúvel (barras pretas) e micelar (barras cinzas) por 24h, foi avaliada conforme descrito no Material e Métodos. Os valores são a média ± erro padrão de no mínimo três experimentos independentes ($n \geq 3$). * $p \leq 0,05$ comparando com o controle, na ausência do fármaco. # $p \leq 0,05$ quando comparado ao CTZ na sua forma solúvel.

4.5 ESTUDO DO MECANISMO DE MORTE CELULAR

Estudos do mecanismos de morte celular realizados com moléculas teste são usualmente realizados pelo citômetro de fluxo, um equipamento que permite separar células ativadas por fluorescência, oferecendo a possibilidade de análise de múltiplos parâmetros de um grande número de células dentro de um curto período de tempo (ALBERTS et al., 2004; TUSCHL et al., 2004). Vários protocolos podem ser utilizados em técnicas de citometria de fluxo, como por exemplo, análise do ciclo celular, da morte celular por necrose através da coloração com PI, da morte por apoptose por detecção da externalização de fosfatidilserina por ligação de anexina e através da detecção de DNA fragmentado (TUSCHL et al., 2004).

Nesta tese foram realizados três ensaios no citômetro de fluxo, além da análise do potencial transmembrânico mitocondrial, mostrado na seção anterior, que é um parâmetro indicador de morte celular por apoptose (CERÓN et al., 2010). Esses ensaios são: determinação da integridade de membrana, análise da fragmentação do DNA e detecção da externalização de fosfatidilserina por ligação de anexina V.

Primeiramente analisamos a morte celular induzida por necrose através do ensaio de determinação da integridade da membrana plasmática. Esse teste se baseia na capacidade do corante iodeto de propídeo se ligar ao DNA e emitir alta fluorescência quando excitado por laser. Células com membrana íntegra não permitem a entrada do corante e, portanto, as células viáveis apresentarão baixa fluorescência. Em contra partida, células com membrana rompida permitirão a entrada do corante que se ligará ao DNA, emitindo alta fluorescência (PERES e CURI, 2005). O efeito do CTZ solúvel e micelar sobre a integridade da membrana plasmática pode ser observado na **Figura 26**. Inicialmente, podemos observar que 50 μM de CTZ solúvel não promoveu alteração alguma na integridade da membrana celular, ao contrário do que foi observado para o CTZ micelar nessa concentração; este aumentou em 1,96 vezes a marcação para PI. Já em concentrações maiores, apesar de não ter diferença estatística entre a marcação do CTZ micelar e o solúvel, a indução da morte celular foi bem significativa, na ordem de 3,98 e 4,28 vezes maior que o controle na presença de 100 μM de CTZ solúvel e micelar, respectivamente. Ou seja, em conjunto, nossos resultados indicam a indução da morte celular por necrose pelo CTZ, principalmente em altas concentrações do fármaco.

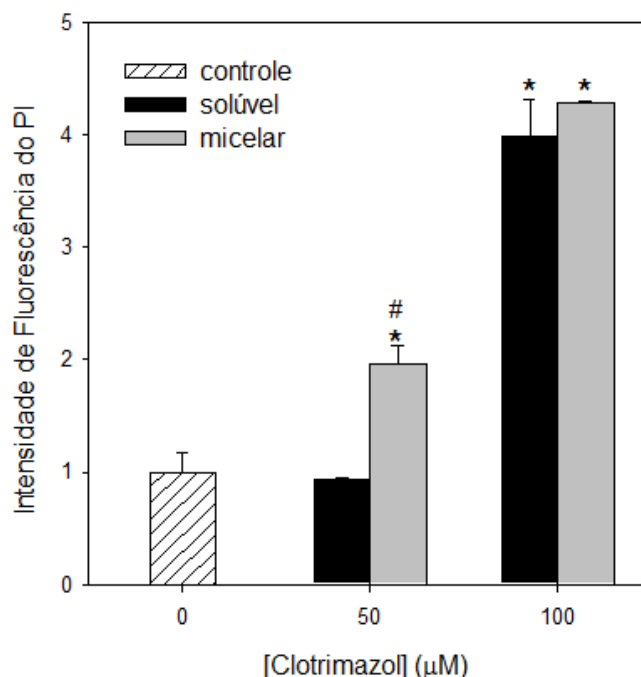


Figura 26. Determinação da integridade da membrana da célula MCF-7 na presença de CTZ solúvel e micelar. A integridade da membrana celular na presença de 50 e 100 μM de CTZ solúvel (barras pretas) e micelar (barras cinzas) por 24h foi avaliada através citometria de fluxo, conforme descrito no Material e Métodos. Os valores são a média ± erro padrão de no mínimo três experimentos independentes ($n \geq 3$). * $p \leq 0,05$ comparando com o controle, na ausência do fármaco. # $p \leq 0,05$ quando comparado ao CTZ na sua forma solúvel.

Posteriormente, duas análises para avaliação da morte celular induzida por apoptose foram realizadas. O primeiro teste foi a análise do ciclo celular. Este teste se baseia também na capacidade de ligação do PI ao DNA. Porém inicialmente a membrana plasmática das células é lisada por um detergente, neste caso a saponina, para que o PI possa se ligar ao núcleo. Células com conteúdo de DNA duplicado (G2M) emitirão alta fluorescência, enquanto que núcleos com condensação de cromatina e DNA fragmentado (DNA subdiploide) incorporam menor quantidade de PI e consequentemente emitirão menor fluorescência (PERES e CURI, 2005). Na **Figura 27**, observamos o efeito do CTZ solúvel (painel B) e do CTZ micelar (painel B) sobre o DNA das células MCF-7. M1 representa a marcação para DNA íntegro e M2 representa a marcação para DNA fragmentado. Desse modo, é possível observar que ambas as formulações de CTZ promoveram um aumento de marcação na região M2, que

corresponde ao DNA que perdeu a integridade. Porém, não houve diferença estatística entre as formulações, que apresentaram um aumento de 1,66 (CTZ solúvel) e 1,7 vezes (CTZ micelar) na marcação para PI (painel D). Esses resultados indicam, então, que o CTZ além de promover morte celular por necrose, induz também por apoptose. Para confirmar esses dados, um terceiro ensaio foi realizado, o de marcação de fosfatidilserina por anexina V, o qual é indicativo de morte por apoptose.

Na fase precoce da apoptose, as células translocam moléculas de fosfatidilserina para membrana plasmática externa, sinalizando para a fagocitose e ficando exposta a marcadores celulares como a anexina V (WATANABE et al., 2002). A anexina V apresenta alta afinidade de ligação a este fosfolípido (VAN GENDEREN et al., 2008). Ao utilizar-se anexina V marcada com Alexa Fluor para detecção de apoptose é possível avaliar os níveis de fosfatidilserina expostas na membrana celular externa que se associaram a anexina V, indicando a fase inicial de apoptose (apoptose precoce).

Na **Figura 28**, observamos o potencial efeito do CTZ solúvel (painel B) e do CTZ micelar (painel B) em induzir apoptose precoce. De fato, observamos no painel D, que representa a quantificação dos valores dos histogramas, um aumento significativo na intensidade de fluorescência da anexina V conjugada a Alexa Fluor. A concentração de 50 μ M de CTZ solúvel promoveu um aumento de 3,24 vezes, enquanto que o CTZ micelar promoveu um aumento de 4,44 vezes, ou seja, o CTZ micelar foi mais eficiente em induzir a apoptose nesse modelo, caracterizado pela alta marcação fluorescente da anexina V. Nos histogramas, esse efeito pode ser evidenciado pelo aumento da população de células no quadrante inferior a direita, que corresponde a marcação por anexina (painel B e C).

4.6 ESTUDO DO COMPORTAMENTO DA LINHAGEM TUMORAL EM BAIXA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE

Tumores sólidos, como o câncer de mama, apresentam um microambiente tumoral com metabolismo diferenciado dos tecidos normais, pois a medida que ocorre a proliferação, alguns dos vasos sanguíneos pré-existentes são obstruídos ou comprimidos. Paralelamente, ocorre a angiogênese, no entanto é bastante diferente

daquela vista em tecidos normais, apresentando vasos vazantes, com diâmetro irregular e paredes finas,

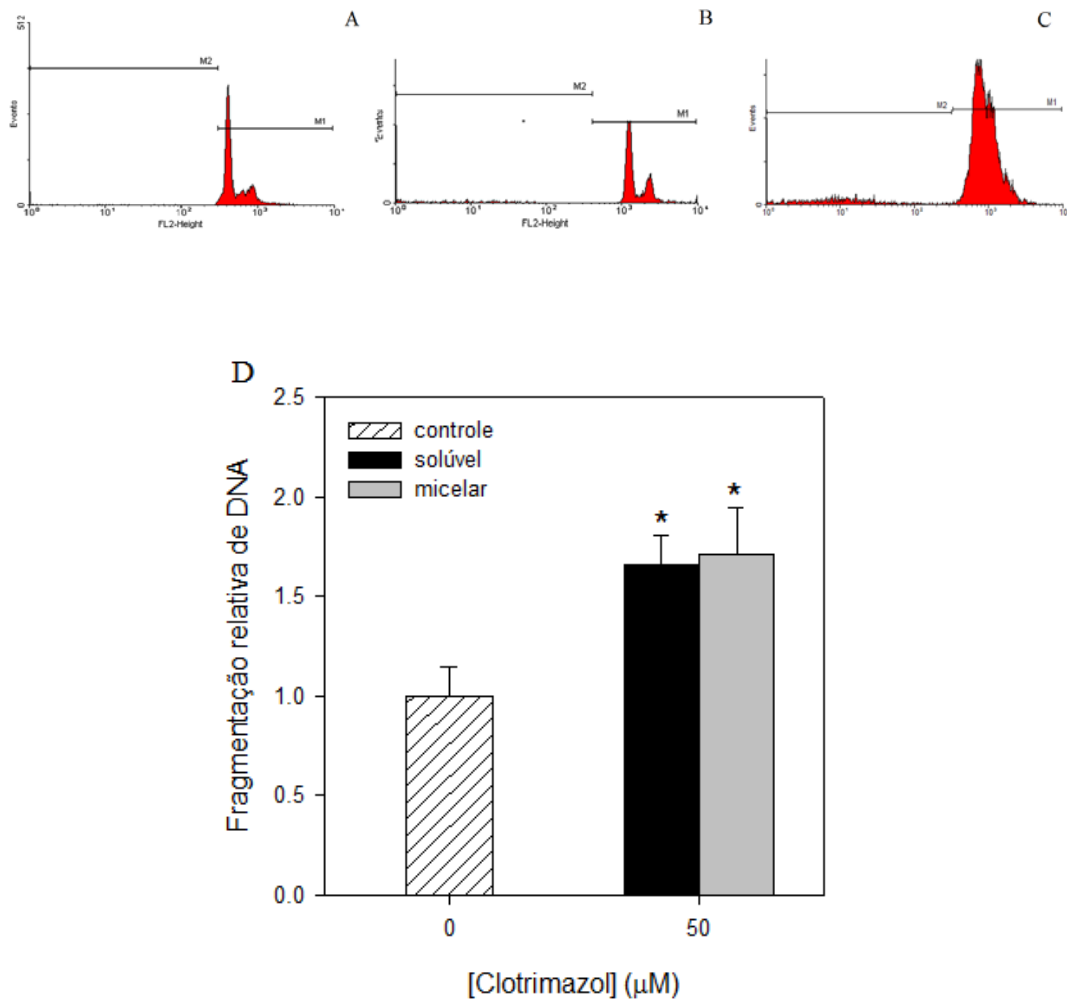


Figura 27. Análise do ciclo celular das células MCF-7 na presença de CTZ solúvel e micelar. A fragmentação do DNA na presença de 50 μ M de CTZ solúvel (barras pretas) e micelar (barras cinzas) por 24h foi avaliado através citometria de fluxo, conforme descrito no Material e Métodos. Painel A: controle. Painel B: 50 μ M de CTZ solúvel. Painel C: 50 μ M de CTZ micelar. Painel D: quantificação dos valores do controle e 50 μ M de CTZ solúvel e micelar. Os valores são a média \pm erro padrão de no mínimo três experimentos independentes ($n \geq 3$). * $p \leq 0,05$ comparando com o controle, na ausência do fármaco.

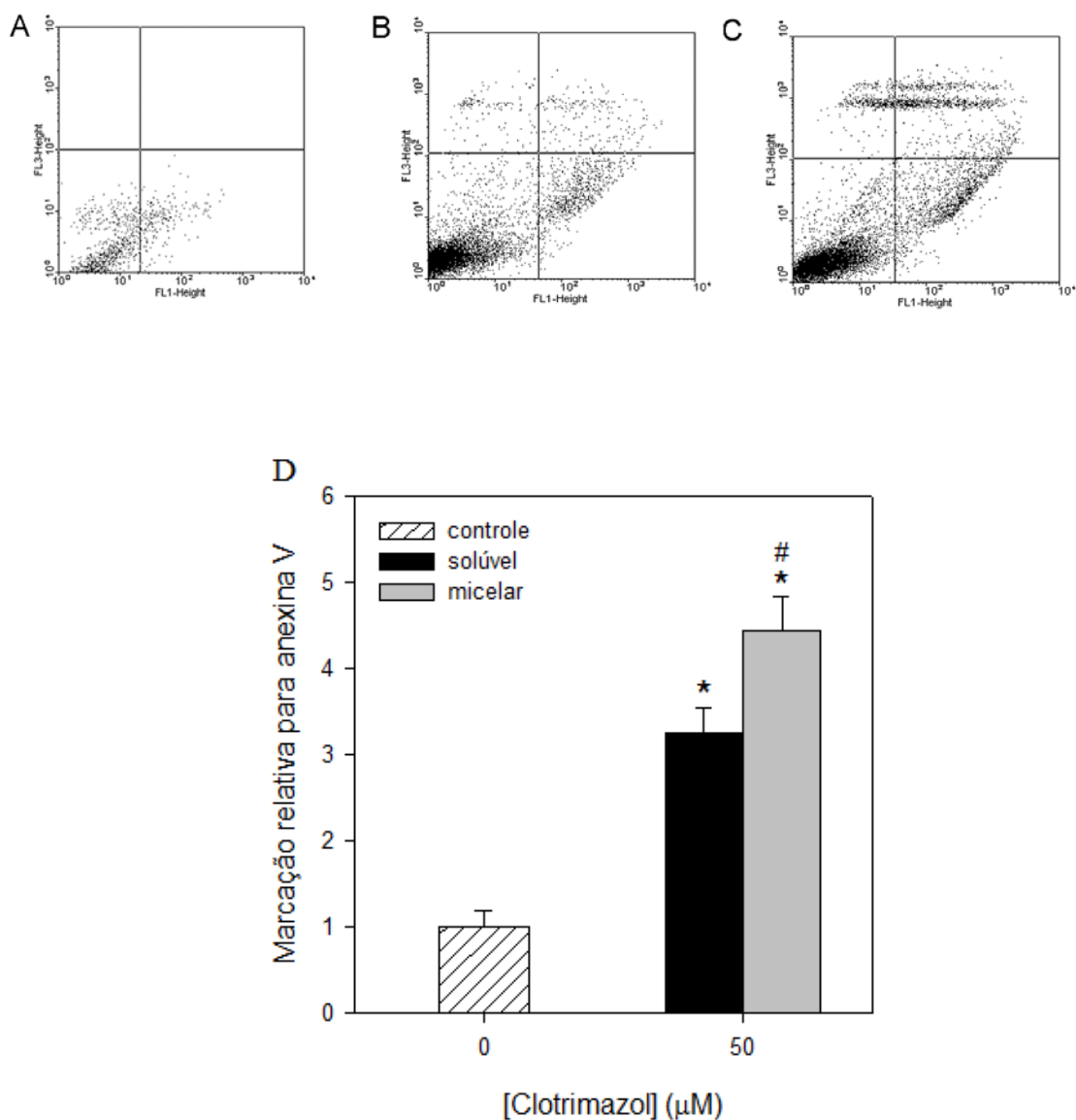


Figura 28. Intensidade de marcação para anexina nas células MCF-7 na presença de CTZ solúvel e micelar. A fragmentação do DNA na presença de 50 μM de CTZ solúvel (barras pretas) e micelar (barras cinzas) por 24h foi avaliado através citometria de fluxo, conforme descrito no Material e Métodos. Paineil A: controle. Paineil B: 50 μM de CTZ solúvel. Paineil C: 50 μM de CTZ micelar. Paineil D: quantificação dos valores do controle e 50 μM de CTZ solúvel e micelar. Os valores são a média \pm erro padrão de no mínimo três experimentos independentes ($n \geq 3$). * $p \leq 0,05$ comparando com o controle, na ausência do fármaco. # $p \leq 0,05$ quando comparado ao CTZ na sua forma solúvel.

com fluxo sanguíneo aberrante e áreas de necrose. Assim, os tumores sólidos são caracterizados por apresentar um microambiente tumoral frequentemente associado ao suprimento insuficiente de oxigênio e nutrientes como a glicose (MUELLER-KLIESER et al., 1988; VAUPEL et al., 1989; UNGEFROREN et al., 2011). No entanto, o entendimento de como as células tumorais se comportam no seu microambiente e como estas respondem ao tratamento com agentes anticâncer ainda é escasso. Neste contexto, nosso objetivo foi investigar o comportamento da linhagem tumoral MCF-7 exposta a uma privação de glicose. Para mimetizar esse ambiente, utilizamos 1,0 mM glicose, que representa a condição de baixa glicose e comparamos com o meio de cultura utilizado até então, que é o DMEM com 4,5 mM glicose. Os parâmetros analisados nessas condições foram: viabilidade celular, conteúdo intracelular de ATP e de ROS na presença de diferentes concentrações de CTZ micelar (0, 25, 50, 75 e 100 μ M).

Podemos observar na **Figura 29**, que tanto o efeito inibitório do CTZ micelar sobre a viabilidade celular (painel A), sobre a produção de ATP (painel B), como na indução da produção de ROS (painel C), foram potencializados na condição de baixa concentração de glicose. E esse efeito é observado em todas as concentrações de CTZ micelar testadas.

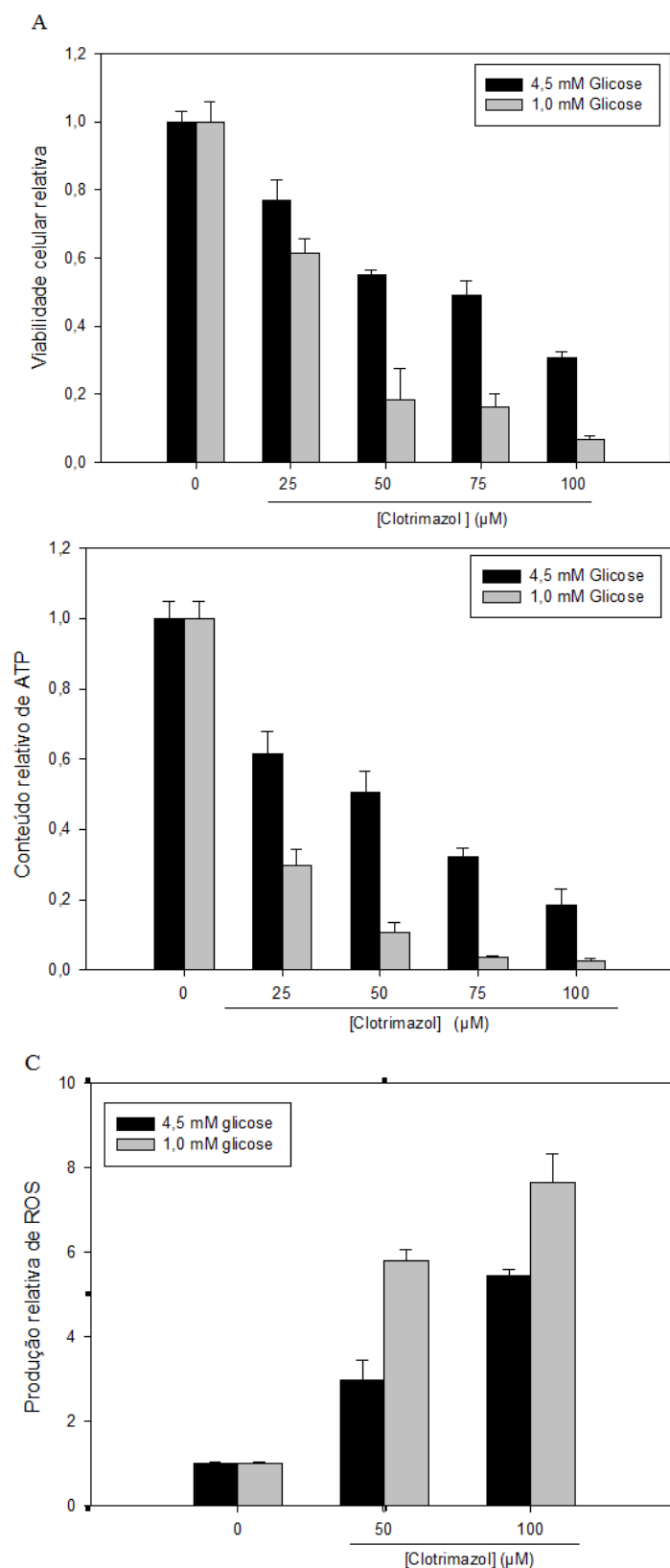


Figura 29. O efeito do CTZ micelar é potencializado em baixa concentração de glicose. A viabilidade celular (painel A), produção de ATP (painel B) e a produção de ROS (painel C) das células MCF-7 na presença de diferentes concentrações de CTZ micelar (0, 25, 50, 75 e 100 μM) e na presença de 4,5 mM glicose (barras pretas) e 1,0 mM glicose (barras cinzas) por 24h, foi avaliada conforme descrito em Material e Métodos. Os valores são a média ± erro padrão de no mínimo três experimentos independentes ($n \geq 3$).

05. DISCUSSÃO

Atualmente, o câncer tem sido a causa de um índice elevado de mortalidade em todo mundo. Os indicadores de morbimortalidade do câncer de mama na população feminina apontam a necessidade de maior atenção para esse problema. No atual panorama, nos deparamos com um elevado contingente de mulheres afetadas, com índices elevados de mortalidade e uma tendência crescente da morbidade (INCA, 2013). Apesar de haver quimioterapia e radioterapia como formas de tratamento para esta doença, estes se mostram insuficientes, uma vez que causam citotoxicidade em células normais e uma série de efeitos colaterais, o que diminui a qualidade de vida do paciente (HOSKIN e RAMAOTHY, 2008). Neste contexto, entender as diferenças biológicas entre as células normais e cancerígenas é essencial para o desenvolvimento de fármacos com atividade seletiva antitumoral. Aliado a isso, a busca de novos fármacos e novas abordagens terapêuticas que atuem especificamente sobre células cancerígenas, sem prejudicar ou causando menos danos as células não tumorais também são essenciais.

Neste sentido, a estratégia neste trabalho foi focar nesses 3 pontos: a busca por novos fármacos com ação antitumoral, a busca por abordagens terapêuticas mais inteligentes e eficientes e o estudo e entendimento de diferenças biológicas entre as células normais e tumorais.

Para o primeiro ponto, o clotrimazol constitui uma das mais recentes possibilidades, apresentando potentes efeitos antitumorais, demonstrado em diversas publicações (GLASS-MARMOR et al., 1996; GLASS-MARMOR e BEITNER, 1997; PENSO e BEITNER, 2002a e 2002b; ZHAO e SONG, 2002; KHALID et al., 2005; MEIRA et al., 2005; ZANCAN et al., 2007; MARCONDES et al., 2010; COELHO, et al., 2011; FURTADO et al., 2012). Para o desenvolvimento do segundo ponto, incorporamos este fármaco em micelas formando um sistema microemulsionado. Num primeiro plano, essa formulação resolveu o problema de solubilidade do CTZ em meio aquoso, já que esse fármaco é altamente hidrofóbico. A solubilidade é um fator essencial para a efetividade dos fármacos independente da via de administração. Tal fato é considerado um desafio para a indústria farmacêutica já que mais de 40% das substâncias ativas ultimamente investigadas apresentam-se insolúveis ou pouco solúveis em água (PRENTIS et al., 1998). Além disso, inúmeras outras vantagens são oferecidas por esse sistema: como exemplo, a liberação controlada do fármaco de forma sustentada

e prolongada. Esse mecanismo além de evitar super- ou subdosagens, eleva a biodisponibilidade do fármaco e resulta em efeito terapêutico prolongado dentro de uma faixa segura, com alta eficácia e baixa toxicidade (JORI et al., 1993; ZHOU et al., 2009; TIGHIOUART et al., 2010). Por fim, a última estratégia desse trabalho foi focar em diferenças biológicas marcantes entre as células normais e tumorais. Por muito tempo terapias antitumorais focaram em reversão de mutações e terapia gênica. Entretanto, esta abordagem se deparou como uma série de efeitos colaterais. Neste sentido, apesar da reprogramação metabólica aqui descrita emergir de diferentes maneiras, ela aparentemente ocorre de maneira consistente em virtualmente todos os tipos tumorais e distingue estas células das células saudáveis (WARBURG, 1956; HANAHAN E WEINBERG, et al., 2011). Para esta análise, o nosso alvo foram duas importantes vias metabólicas, a via glicolítica e a mitocondrial, não só pela importância energética, caracterizada pela alta produção de ATP, mas também por estarem intimamente ligadas a homeostase celular, como visto na Introdução. Estes estudos foram realizados em uma conhecida linhagem tumoral de carcinoma mamário, a MCF-7, considerado um importante modelo *in vitro* para o estudo do comportamento biológico das células tumorais (ENGEL e YOUNG, 1978).

Para a concretização destes objetivos, primeiramente as microemulsões contendo CTZ foram desenvolvidas e caracterizadas. Essas microemulsões são do tipo O/A, pois as moléculas de CTZ diluídas em DMSO se encontram no interior das gotículas que são envolvidas por moléculas de tensoativos em um meio aquoso, formando assim as estruturas micelares (CONSTANTINIDES et al., 1995). Através do método de espalhamento dinâmico de luz (DLS), o tamanho médio, a estabilidade térmica e a estabilidade ao longo do tempo dessas micelas foram determinados. As micelas contendo CTZ apresentaram um diâmetro médio de 16,9 nm, caracterizando assim a obtenção de uma microemulsão (**Figura 8**), pois apresentou gotículas com escala nanométrica (KAWAKAMI et al., 2002a e 2002b). Além disso, essas micelas apresentaram grande estabilidade térmica até 37°C, sugerindo que este sistema, provavelmente, não será danificado por essa variável no corpo ou se armazenado sob estas condições (**Figura 9**). Já o ensaio de estabilidade ao longo do tempo confirmou que, de fato, o CTZ é liberado gradualmente ao longo do tempo, visto o aumento da dimensão micelar. Esse aumento, provavelmente por desintegração do sistema de microemulsão, corresponde a liberação do CTZ micelar dos núcleos micelares para o

meio, o qual, de fato, se apresentou turvo após o término desse experimento (**Figura 10**).

A redução do tamanho da partícula a uma escala nanométrica conduz a um aumento da área de superfície das partículas e, conseqüentemente, aumento da biodisponibilidade (LIVERSIDGE e CUNDY, 1995; DOUROUMIS e FAHR, 2006). Partículas que apresentam dimensões nanométricas são adequadas para serem administrados através de diferentes vias como oral, parenteral, endovenosa e tópica (CUI et al., 2006; LI e HUANG, 2008). Sabe-se que a biodistribuição de partículas com diâmetro entre 0,01 e 1,0 μm é facilmente conduzida através dos vasos sanguíneos (KAWASHIMA, 2001; KRANZ e BODMEIER, 2008). Tecidos tumorais e órgãos como fígado, baço e medula óssea, apresentam paredes capilares descontínuas, ausência de lâmina basal e grande número de poros que favorecem o uso dos sistemas transportadores de fármacos (DAVIS et al., 2008; PARK et al., 2010). Além disso, tecidos tumorais não possuem sistema linfático, conseqüentemente, após a partícula penetrar nestes tecidos dificilmente ela será eliminada antes que ocorra a completa liberação do fármaco (YEZHELYEV, 2006).

Após formulação e caracterização dos sistemas microemulsionados contendo CTZ, estes foram testados quanto a sua capacidade de modular o metabolismo energético de células tumorais (MCF-7) *in vitro*. Nossos resultados revelaram que, em ensaios de viabilidade celular, pode-se verificar que o fármaco incorporado em micelas se apresentou muito mais eficiente do que a sua forma não nanoestruturada (**Figura 11**). Isso demonstra que a microemulsão apresentou-se como uma alternativa para aumentar a eficiência terapêutica do fármaco protegendo-o de sua degradação em meio biológico. Além disso, para que estas nanopartículas possam circular o tempo suficiente dentro do organismo elas devem ser biocompatíveis, ou seja, elas não podem ser reconhecidas como um “corpo estranho”. Por esse motivo o tensoativo escolhido foi o Tween 80, uma molécula não-iônica que não apresenta toxicidade para as membranas biológicas (REGE et al., 2002).

Testes de citotoxicidade em cultura de células são úteis e necessários para definir a citotoxicidade basal, isto é, a habilidade intrínseca de um composto de causar morte celular como consequência de danos as funções básicas celulares (EISENBRAND et al., 2002). Muitos métodos de análise podem ser usados para medir o nível de citotoxicidade celular. As análises por captação e exclusão de corantes em células, assim como a atividade enzimática liberada por células e ensaios colorimétricos

(MTT) tem sido amplamente utilizados para avaliar a citotoxicidade, como observado em publicações recentes (MEIRA et al., 2005, ROMA et al., 2009, ZANCAN et al., 2010, FURTADO et al., 2012; GOMEZ, et al., 2013).

Dados recentemente publicados mostraram que o CTZ na sua forma solubilizada em DMSO é capaz de reduzir a viabilidade de linhagens derivadas do câncer de mama, MCF-7 e MDA-MB-231, sem, entretanto, afetar a viabilidade da linhagem não tumoral, MCF10A, o que evidencia a sua alta especificidade (MEIRA et al., 2005, FURTADO et al., 2012). Esse perfil também foi observado em sistemas mais complexos, como em tecidos tumorais mamários humanos adquiridos de pacientes em tratamento no Ambulatório de Ginecologia e submetido à cirurgia na mama no Hospital Clementino Fraga Filho (UFRJ). Neste caso, somente o tecido mamário tumoral sofreu os efeitos deletérios do CTZ, enquanto o tecido de mama normal permaneceu íntegro. FURTADO et al., (2012) mostraram ainda que o caráter inibitório do CTZ é maior em linhagens tumorais metastáticas (MDA-MB-231) do que linhagens tumorais não metastáticas (MCF-7).

Na **Figura 12**, através dos testes de citotoxicidade *in vitro*, foi possível observar que o tratamento das células MCF-7 por 24h com as micelas vazias (sem o CTZ), em nada alterou a integridade celular. Ou seja, os componentes da micela não são tóxicos para as células. As partículas se mostraram também seletivas, pois ambas as linhagens celulares não tumorais avaliadas, MCF-10A e C2C12, permaneceram íntegras após tratamento por 24hs com CTZ micelar (**Figura 13**). A ausência de efeito inibitório do CTZ sobre a linhagem controle MCF10-A não pode ser atribuída ao fato desta linhagem crescer em um meio de cultura (DMEM/F12 com 10% de SFH) diferente ao das linhagens MCF-7 e C2C12 (DMEM com 10% de SFB). Experimentos controle envolvendo a análise da viabilidade da linhagem MCF10-A crescida em meio DMEM/F12, mas tratadas com CTZ por 24h em meio DMEM foram realizados e os resultados encontrados não foram diferentes daqueles aqui apresentados (dados não mostrados). A escolha por manter o meio DMEM/F12 para esta linhagem é de assegurar que esta linhagem estaria em condições ótimas de crescimento. Além disso, foi visto que o efeito inibitório do CTZ sobre a viabilidade celular da linhagem MCF-7 foi dependente da dose e também do tempo de incubação (**Figura 14**).

Vários ensaios de citotoxicidade estão atualmente disponíveis, cada um deles usando uma abordagem específica para detectar diferentes aspectos da viabilidade celular, como a integridade da célula, proliferação e funções metabólicas. Dessa forma,

para enriquecer os dados apresentados até aqui foram realizadas análises do efeito do CTZ micelar sobre a morfologia celular por meio de microscopia ótica por coloração de giemsa, microscopia ótica de contraste interferencial diferencial de Nomarski (DIC) e microscopia eletrônica de varredura. Estes experimentos foram propostos com o objetivo de se avaliar efeitos na morfologia celular e aspectos do comportamento das células da linhagem MCF-7 em cultura após a administração dos tratamentos com CTZ micelar. Nas **Figuras 15, 16 e 17** observamos claramente a capacidade do CTZ micelar em promover marcantes alterações morfológicas, caracterizadas pela contração das projeções celulares, gerando desta forma células fusiformes, na menor concentração de CTZ utilizada (50 μ M), até formas totalmente arredondadas com o aumento da concentração de CTZ. Células com aspecto arredondado sugerem início de um processo de morte celular, comprovado pela redução do número de células observado nas **Figuras 18 e 19**, e pela diminuição da viabilidade celular na **Figura 11**.

Posteriormente, a estratégia de ter o metabolismo energético como alvo para tratamento de neoplasias foi posto em prática, através da análise do metabolismo glicolítico e mitocondrial. Para a análise do metabolismo de glicose foi avaliado o efeito do CTZ micelar e solúvel sobre a atividade da via glicolítica (**Figura 20**) e sobre a atividade da enzima chave da via das pentoses, a G6PDH (**Figura 21**). A atividade da via glicolítica foi mensurada através da atividade das três enzimas chaves da glicólise: HK, PFK e PK, e através da quantificação da produção de lactato, que é o produto final do metabolismo aeróbico característico de tumores (WARBURG, 1956). O CTZ, independente da formulação, foi capaz de promover a inibição de todos esses pontos da glicólise. Entretanto, a única exceção a ação mais eficiente do CTZ micelar frente ao solúvel correspondeu a atividade da PFK, onde a de inibição foi semelhante ao CTZ solúvel. É importante frisar que enquanto a inibição observada para a HK e PK não chega a 50%, o observado para a PFK é muito maior (90%). Por isso, não foi possível observar diferenças entre a formulação micelar e o solúvel. Além disso, isto indica que o principal alvo do CTZ em tumores é a PFK, como indicado em trabalhos anteriores do nosso grupo (ZANCAN et al., 2010, FURTADO et al., 2012).

É importante ressaltar que a diminuição da produção de lactato não só representa a diminuição do fluxo glicolítico e, conseqüentemente, a reversão do *efeito warburg*, mas também representa a criação de um ambiente desfavorável para o seu crescimento, uma vez que a produção de lactato pelas células tumorais promove um microambiente de caráter ácido, contribuindo para a degradação da matriz extracelular, para a

movilidade das células, aumentando assim o processo invasivo e metastático (GILLIES et al., 2002; RAGHUNAND et al., 2004).

Da mesma maneira observada nos efeitos sobre a glicólise, o CTZ incorporado em micelas foi mais eficiente em inibir a atividade da enzima chave da via das pentoses, a G6PDH (**Figura 21**). Na concentração de 100 μM o efeito inibitório do CTZ micelar foi praticamente total e, na concentração de 50 μM de CTZ, a inibição foi de 75,55%. Por outro lado, a inibição promovida pelo CTZ solúvel só conseguiu atingir 39,64% e 84,91% para 50 e 100 μM , respectivamente. A inibição dessa enzima, em especial, tem grande relevância para todo o metabolismo, porque além de permitir a oxidação total da glicose em uma série de reações independentes da via glicolítica, é fonte de pentoses para a síntese de ácidos nucleicos e, principalmente, fornece NADPH extramitocondrial, um importante poder redutor para atividade antioxidante mediada por glutatona. Esses achados estimularam a investigação do metabolismo oxidativo mitocondrial.

Sobre o metabolismo mitocondrial, diferentes parâmetros foram analisados. Dados da literatura relatam que além de fornecer mais de 95% da energia utilizada pela célula, em condições normais, por meio da fosforilação oxidativa, a mitocôndria desempenha diferentes funções na regulação de vários processos celulares. As mitocôndrias participam da modulação do estado redox celular, da regulação osmótica, do controle de pH, da sinalização celular e, sobretudo, da manutenção da homeostase de cálcio. Devido a essa diversidade de funções, a mitocôndria é uma organela alvo de várias situações lesivas e agentes tóxicos, estando envolvida nos mecanismos de dano e morte celular (WALLACE et al., 1997). Sendo o CTZ um promissor agente antitumoral, novos mecanismos de ação desse fármaco foram aqui investigados no ambiente mitocondrial. Relembrando que em todos esses parâmetros a comparação entre CTZ solúvel e micelar foi feita.

O primeiro ponto estudado foi o potencial transmembrânico mitocondrial. Este potencial de membrana de ordem de 180 mV contribui para o armazenamento de energia livre disponível para a consequente reação de síntese de ATP no complexo V, que ocorre através do acoplamento de ADP mais fosfato inorgânico (LEHNINGER et al., 1995). Ou seja, qualquer alteração nesse potencial pode prejudicar a síntese de ATP. De fato, o CTZ é capaz de promover de forma significativa uma perturbação desse potencial, sendo que o CTZ micelar foi mais potente que o CTZ solúvel somente na concentração de 100 μM CTZ (**Figura 23**). Consequentemente, a produção de ATP também foi reduzida e, conforme observado no ponto anterior, o CTZ micelar só se

mostrou mais eficiente que o CTZ solúvel na concentração de 100 μM (**Figura 25**, painel A).

Para avaliar o metabolismo aeróbico mitocondrial, a atividade enzimática da succinato desidrogenase (SDH) foi mensurada, uma vez que a atividade dessa enzima é considerada um indicador da atividade de todo o ciclo de Krebs (PISTOLLATO et al., 2010). Essa enzima promove a oxidação do succinato para formar fumarato e FADH_2 . Essa enzima necessita de FAD ligada covalentemente. Nas células de mamíferos, a enzima está firmemente ligada à membrana mitocondrial interna, sendo um componente da succinato ubiquinona, um complexo multiprotéico que participa da cadeia mitocondrial transportadora de elétrons (KREBS, 1953). Como controle negativo, neste trabalho, foi usado 12,3 mM de malonato (PISTOLLATO, 2010). O malonato é um inibidor reversível da SDH, devido a sua semelhança estrutural com o substrato da enzima, o succinato (MARAGOS e SILVERSTAIN, 1995). É descrito na literatura que o malonato ao inibir a SDH, leva a uma interrupção da fosforilação oxidativa e, por consequência, a uma depleção nos níveis de ATP. Nessas condições, ocorre uma despolarização pela falência de várias ATPases, principalmente da $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ (GREENE et al., 1993), que mantêm a tensão e o gradiente de íons através da membrana plasmática. Em outro trabalho, a inibição da SDH levou a disfunção mitocondrial, geração de ROS e apoptose (DEDEOGLU et al., 2002). Na **Figura 22**, a atividade da enzima chave do ciclo de Krebs, a SDH, foi avaliada. O malonato (inibidor competitivo da SDH) promoveu 25,78% de inibição sobre a atividade da SDH, um valor muito semelhante ao encontrado com 100 μM de CTZ solúvel (24,09%) e com 50 μM de CTZ micelar (24,38%). Isso significa que para atingir a média de 25% de inibição, em vez de utilizar 100 μM do CTZ solúvel, esse mesmo resultado é alcançado com 50 μM de CTZ micelar, ou seja, com apenas metade da concentração da formulação solúvel. Para enriquecer novamente o nosso estudo, foi realizado a MET para análise ultraestrutural das mitocôndrias das células. De fato, várias alterações foram observadas com o tratamento com o CTZ micelar, dentre elas: redução e encurtamento das cristas, diminuição da densidade da matriz, além de um intenso processo de vacuolização (**Figura 23**).

Como consequência de tantas alterações do metabolismo energético observadas após o tratamento com o CTZ, não é surpresa se esperar que este fármaco promova um estado de estresse celular. O estado redox não foi somente alterado pelo aumento na produção de ROS (**Figura 25**, painel B), mas também pela depleção de mecanismos de

defesa antioxidante devido a redução do conteúdo de glutathione reduzida (**Figura 25**, painel C). Nesse dois pontos, ambas as concentrações de CTZ micelar (50 μ M e 100 μ M) foram mais potentes em induzir essas alterações do que o CTZ solúvel.

Até o momento, porém, o mecanismo de morte celular induzido pelo fármaco era desconhecido. Algumas suposições, relatadas por diferentes grupos de pesquisa (MAJEWSKI et al., 2004; CHIARA et al., 2008; NEARY e PASTORINO, 2013), indicavam morte celular induzida por apoptose devido ao fato do CTZ promover o desligamento da enzima HK da mitocôndria e, assim, ocasionar a liberação de citocromo c e, conseqüentemente, induzir a apoptose. Neste trabalho e neste modelo, o CTZ foi capaz de promover morte celular tanto por processos apoptóticos (pelo fato de promover fragmentação de DNA - **Figura 26**, e marcação de anexina V por ligação a fosfatidilserina - **Figura 27**); como também, morte celular induzida por necrose (pela marcação de PI através do ensaio de determinação da integridade da membrana celular - **Figura 28**).

Por último, analisamos o efeito do CTZ em condições que mimetizassem o microambiente tumoral. De fato, os tumores sólidos são caracterizados por apresentar um microambiente tumoral frequentemente associado ao suprimento insuficiente de oxigênio e nutrientes como a glicose (MUELLER-KLIESER et al., 1988 e VAUPEL et al., 1989; UNGEFROREN et al., 2011). Por esse motivo, analisamos a viabilidade celular, a produção de ROS e o conteúdo intracelular de ATP em condições nutricionais de baixa concentração de glicose (1,0 mM). Nestes experimentos, observamos de forma global, que o efeito inibitório do CTZ micelar foi potencializado nessa condição, quando comparado com a condição padrão (4,5 mM de glicose) (**Figura 29**).

Como dito anteriormente, a cultura de células é um modelo *in vitro* que permite estudar crescimento, diferenciação e morte celular e, além disso, efetuar manipulações genéticas necessárias ao perfeito conhecimento da estrutura e funções dos genes (ENGEL e YOUNG, 1978). Ou seja, é uma expressão que designa todos os processos biológicos que tem lugar fora dos sistemas vivos, em um ambiente controlado e fechado. Por outro lado, experimentos *in vivo*, significa que ocorre ou tem lugar dentro de um organismo. A experimentação animal se reveste de uma importância incalculável nas pesquisas científicas, contribuindo sobremaneira para o desenvolvimento da ciência e tecnologia (HEYWOOD, 1987). Nesse sentido, Raquel coelho et al., (2011) em sua tese, resolveram investigar o efeito do CTZ em tumores em modelo *in vivo*. Para o desenvolvimento de tumores mamários em ratas foi utilizado o composto N-nitro-N-

metilureia (MNU), um agente alquilante, altamente tóxico, carcinogênico e mutagênico (PERSE et al., 2009). O tratamento com 125 mg/Kg de CTZ promoveu uma menor incidência ao desenvolvimento de tumores induzidos por MNU quando comparados ao controle, diminuindo também a frequência de animais com tumores, assim como o tamanho e o número de tumores por rato.

Já vimos aqui, que um dos grandes problemas na terapia do câncer é a falta de seletividade que acaba provocando a morte de células e tecidos normais. Nesse sentido o CTZ vem apresentando promissores resultados, pois em publicações recentes (COELHO et al., 2011; FURTADO et al., 2012), como também nesta tese, vem se mostrando altamente seletivo para as células/tecidos tumorais. Aliando a esse grande problema, está a resistência a múltiplas drogas (MDR), sendo atualmente junto com o problema da falta de seletividade, um dos principais obstáculos no tratamento quimioterápico de pacientes com câncer. Dentre os vários mecanismos MDR identificados, o mais bem caracterizado envolve a expressão do produto do gene MDR-1 de 170 KDa, conhecido como a glicoproteína P (GOTTESMAN et al., 1993; JURANKA et al., 1989). Esta proteína funciona como uma bomba de efluxo dependente de energia, capaz de transportar drogas para o exterior da célula, diminuindo a concentração intracelular a níveis subletais (BELLAMY, 1996). De fato, muitos quimioterápicos tem o seu uso restrito devido a resistência específica que alguns tumores desenvolvem e a resistência a múltiplas drogas. Como exemplo, temos um dos quimioterápicos de primeira escolha para o tratamento de diversos tipos de tumores, o paclitaxel, que apresenta um mecanismo de ação semelhante ao observado para o CTZ. 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). Promove um estado de estresse oxidativo, provocado pelo aumento na produção de ROS (ALEXANDRE et al., 2006), como observado neste trabalho para o CTZ. Entretanto, o CTZ, diferentemente do paclitaxel, é capaz de inibir a proteína associada a resistência a multidrogas (KLOKOUSAS et al., 2001). Esse fato pode justificar parte da alta eficiência do CTZ 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 a quimioterapia. Neste sentido, a utilização do CTZ apresenta vários benefícios: o fato de ser capaz de reverter quadros de resistência à drogas permitindo dessa forma ser prescrito para o tratamento de tumores resistentes,

além de apresentar-se também como um fármaco com ação seletiva sobre células tumorais

O fato de o CTZ ter como alvo o metabolismo energético de células tumorais, é um dos motivos do seu sucesso como agente antitumoral. A reprogramação metabólica característica das células tumorais tornou o estudo do seu metabolismo uma questão chave da investigação em biologia do câncer. Muitos trabalhos colocam o metabolismo energético tumoral como um novo alvo para o tratamento de neoplasias, como em publicações recentes: *Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens* (MATTHEW e HEIDEN, 2011); *Glycolysis inhibition for anticancer treatment* (PELICANO et al., 2006); *targeting glucose metabolism for cancer therapy* (HAMANAKA e CHANDEL, 2102).

Por fim, com base nos resultados apresentados nessa Tese podemos concluir que o conhecimento atual sobre as propriedades do CTZ, indica um futuro promissor para o uso desta molécula contra o câncer. E, além disso, a nossa proposta de incorporá-lo em um sistema manométrico micelar, aumentou significativamente seu potencial antitumoral, além de mascarar e reverter a sua baixa solubilidade aquosa. Esta conclusão reforça a possibilidade de uso deste fármaco na prática clínica oncológica.

06. CONCLUSÕES

- ✓ Na grande maioria dos pontos estudados, o CTZ incorporado dentro de micelas foi mais potente e eficaz que o CTZ solubilizado em DMSO;
- ✓ Sobre a viabilidade celular da linhagem MCF-7, o CTZ micelar, produzido neste trabalho, foi 23,18% mais potente/eficaz do que a sua forma solubilizada em DMSO;
- ✓ Seu efeito é devido exclusivamente a presença da molécula de CTZ e não por qualquer outro componente da micela (Tween 80 ou DMSO);
- ✓ O efeito do CTZ foi específico para linhagem tumoral, não promovendo nenhum efeito inibitório sobre a viabilidade de linhagens não tumorais, a MCF-10A e C2C12;
- ✓ Sobre o metabolismo de glicose: o CTZ diminuiu a atividade da via glicolítica, caracterizado pela diminuição da atividade das três enzimas chaves da glicólise (HK, PFK e PK) e da produção de lactato. Além disso, também promoveu a redução na atividade catalítica da enzima chave da via das pentoses fosfato, a G6PDH;
- ✓ Sobre o metabolismo oxidativo mitocondrial: o CTZ promoveu uma despolarização mitocondrial, diminuiu a atividade da enzima chave do ciclo de Krebs, a SDH. Além disso, promoveu alterações na morfologia normal das mitocôndrias, promovendo um encurtamento e redução do número de cristas, como também uma diminuição da densidade da matriz;
- ✓ Sobre a morfologia celular da linhagem MCF-7, o CTZ micelar alterou a morfologia normal das células, promovendo uma diminuição dos prolongamentos (enrugamento), tornando-as arredondadas, o que dificulta a adesão célula-célula;
- ✓ Como consequência dos efeitos observados, o CTZ induziu um estado de estresse oxidativo à célula, caracterizado pelo aumento na produção de ROS e diminuição no conteúdo intracelular de ATP e glutatona reduzida;
- ✓ Os ensaios de mecanismo de morte celular demonstraram que o CTZ induziu a morte celular tanto por processos apoptóticos, como por necrose;
- ✓ Em condições nutricionais de baixa concentração de glicose (1mM), o efeito inibitório do CTZ micelar sobre a viabilidade celular, conteúdo de ATP e

produção de ROS foi potencializado quando comparado a condição padrão de 4,5 mM de glicose;

- ✓ Em conjunto nossos resultados revelam que houve êxito na incorporação do CTZ em sistemas nanométricos micelares, devido aos seus superiores efeitos inibitórios sobre o metabolismo energético de células tumorais quando comparado aos efeitos do CTZ solubilizado em DMSO. Assim, este sistema microemulsionado apresenta-se como uma alternativa para aumentar a eficiência terapêutica, a qual pretende-se aplicar em ensaios futuros;
- ✓ Além disso, acreditamos que o estudo bioquímico e farmacológico do metabolismo energético característico de tumores seja consolidado como um importante alvo para ação de xenobióticos.

7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD I.M, AYKIN-BURNS N, SIM JE. **Mitochondrial O_2^- and H_2O_2 mediate glucose deprivation-induced cytotoxicity and oxidative stress in human cancer cells.** J. Biol. Chem. v. 280, p. 4254–4263, 2005.

ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K e WALTER P. **Biologia Molecular da Célula**, 4ª edição, Porto Alegre, Artmed, 2004.

ALEXANDRE, J.; BATTEUX, F.; NICCO, C.; CHEREAU, C.; LAURENT, A.; GUILLEVIN, L.; WEILL, B.; GOLDWASSER, F. **Accumulation of hydrogen peroxide is an early and crucial step for paclitaxel-induced cancer cell death both in vitro and in vivo.** Int. J. Cancer v. 119, p. 61141–61148, 2006.

AMES BN. **Dietary carcinogens and anticarcinogens.** Science v. 221, p. 1256-1264, 1983.

ANDRINGA K.K., COLEMAN M.C., AYKIN-BURNS N., HITCHLER M.J., WALSH S.A., DOMANN F.E., SPITZ D.R. **Inhibition of glutamate cysteine ligase activity sensitizes human breast cancer cells to the toxicity of 2-deoxy-D-glucose.** Cancer Res. v. 66, p. 1605-1610, 2006.

ARONOFF SL, BERKOWITZ K, SHREINER B, WANT L. **Glucose metabolism and Regulation: Beyond Insulin and Glucagon.** Diabetes Spectrum v. 17, p. 183-190, 2004.

ASHRAFIAN H. **Cancer's sweet tooth: the Janus effect of glucose metabolism in tumorigenesis.** Lacet v. 367, p. 618-623, 2006.

BAKER RC, FLORENCE AT, TADROS TF, WOOD RM. **Investigations into the Formation and Characterization of Microemulsions .1. Phase-Diagrams of the Ternary-System Water Sodium Alkyl Benzene Sulfonate Hexanol and the Quaternary System Water Xylene Sodium Alkyl Benzene Sulfonate Hexanol.** J Colloid Interface Sci. v. 100, p. 311-331, 1984.

BARWICZ J, CHRISTIAN S, GRUDA I. **Effects of the Aggregation State of Amphotericin B on Its Toxicity to Mice.** Antimicrob Agents Chemother v. 36, p. 2310-2315, 1992.

BAR-ZIV, R., MELLER, A., TLUSTY, T., MOSES, E., STAVANS, J., SAFRAN, S. A., **Localized Dynamic Light Scattering: Probing Single Particle Dynamics at the Nanoscale.** Physical Reiews Letters. v. 78, p. 154-157, 1997.

BASS DA, PARCE JW, DECHATELET LR, SZEJDA P, SEEDS MC, THOMAS M. **Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation.** J. Immunol. v. 130, p. 1910-1917, 1983.

BAYLEY, J.P.; DEVILEE, P. **The Warburg effect in 2012**. Current Opinion Oncology, v. 24, p. 62-67, 2012.

BEITNER, R., NORDENBERG, J., COHEN, T.J. **Correlation between the levels of glucose 1,6-diphosphate and the activities of phosphofructokinase, phosphoglucomutase and hexokinase, in skeletal and heart muscles from rats of different ages**. Int. J. Biochem. v. 10, p. 603-608, 1979.

BELL GL, KAYANO T, BUSE JB, BURANT CF, TAKEDA J, LIN D. **Molecular biology of mammalian glucose transporters**. Diabetes Care v. 13, p. 198-200, 1990.

BELLAMY WT. **P-glycoprotein and multidrug resistance**. Annu Rev Pharmacol Toxicol v. 36, p. 161-183, 1996.

BEREITNER HAHN J. VOTH M. **Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion and fission of mitochondria**. Microsc res Tech v 27, p. 198.219, 1994.

BERGGREN MI, HUSBECK B, SAMULITIS B, BAKER AF, GALLEGOS A, POWIS G. **Thioredoxin peroxidase-1 (peroxiredoxin- 1) is increased in thioredoxin-1 transfected cells and results in enhanced protection against apoptosis caused by hydrogen peroxide but not by other agents including dexamethasone, etoposide, and doxorubicin**. Arch Biochem Biophys v. 392, p. 103–109, 2001.

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

BICKERS, D.R., LOWRY, D.R. **Carcinogenesis: a fifty-year historical perspective**. J. Inves. Dermatol. v. 92, p. 121S-131S, 1989.

BOUJRAD H, GUBKINA O, ROBERT N, KRANTIC S, SUSIN SA. **AIF-mediated programmed necrosis: a highly regulated way to die**. Cell Cycle. v. 6, p. 2612-2619, 2007.

BRAS, M., QUEENAN, B.; SUSIN, S.A. **Programmed Cell Death via Mitochondria: Different Modes of Dying**. Biochemistry v. 70, p. 231-239, 2005.

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

BROOKS, G.A. **Intra-and extra-cellular lactate shuttles**. Medicine and Science in Sports and Exercise v. 32, p. 790-799, 2000.

BRUGNARA, C., ARMSBY, C.C., SAKAMOTO, M., RIFAI, N., ALPER, S.L., PLATT, O. **Oral-administration of clotrimazole and blockade of human erythrocyte Ca⁺⁺-activated K⁺ channel: the imidazole ring is not required for inhibitory activity**. J. Pharm. Exp. Ther. v. 273, p. 266–272, 1995.

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

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

BUSTAMANTE E, MORRIS HP, PEDERSEN PL. **Energy metabolism of tumor cells. Requirement for a form of hexokinase with a propensity for mitochondrial binding.** *J Biol Chem.* v. 256, p. 8699-8704, 1981.

CAIRNS, R. A.; HARRIS, I. S.; MAK, T. W. **Regulation of cancer cell metabolism.** *Nature*, v. 11, p. 85-95, 2011.

CALCABRINI A, GARCÍA-MARTÍNEZ JM, GONZÁLEZ L, TENDERO MJ, ORTUÑO MT, CRATERI P, LOPEZ-RIVAS A, ARANCIA G, GONZÁLEZ-PORQUÉ P, MARTÍN-PÉREZ J. **Inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human breast cancer cells by lauryl gallate.** *Carcinogenesis.* v. 27, p. 1699-1712, 2006

CARLING D. **The AMP-activated protein kinase cascade – a unifying system for energy control.** *Trends Biochem Sci.* v. 29, p. 18-23, 2004.

CERÓN J.M., MORENO J.C., PUERTOLLANO E., CIENFUEGOS G.A, PUERTOLLANO M.A., PABLO M.A. **The antimicrobial peptide cecropin A induces caspase independent cell death in human promyelocytic leukemia cells.** *Peptide* v. 31, p. 1494-1503.

CHEN H. CHAN D.D. **Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission.** *Human Molecular Genetics* v. 14, p. R283.289, 2005.

CHEN W, LU DR. **Carboplatin-loaded PLGA microspheres for intracerebral injection: formulation and characterization.** *Journal of Microencapsulation* v. 16, p. 551-563, 1999.

CHIARA F, CASTELLARO D, MARIN O, PETRONILLI V, BRUSILOW WS, JUHASZOVA M, SOLLOTT SJ, 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. e1852, 2008.

COELHO, R.G.; CALAÇA, I.D.; CELESTRINI, D.D.; CORREIA, A.H.; COSTA, M.A.; SOLA-PENNA, M. **Clotrimazole disrupts glycolysis in human breast cancer without affecting non-tumoral tissues.** *Mol. Genet. Metab.* v. 4, p. 394-398, 2011.

CONSTANTINIDES PP, YIV SH. **Particle-Size Determination of Phase-Inverted Water-in-Oil Microemulsions under Different Dilution and Storage-Conditions.** *Int J Pharm.* v. 115, p. 225-234, 1995.

CORREA, M.A.; SCARPA, M. V.; FRANZINI, M.C.; OLIVEIRA, A.G. **On the incorporation of the non-steroidal anti-inflammatory naproxen into cationic O/W microemulsions.** Colloids and Surfaces B. v. 43, p. 108-114. 2005.

CROMMELIN DJA, STORM G, JISKOOT W, STENEKES R, MASTROBATTISTA E, HENNINK WE. **Nanotechnological approaches for the delivery of macromolecules.** Journal of Controlled Release v. 87, p. 81-88, 2003.

CROWLEY L.V. **An Introduction to Human Disease: Pathology and Pathophysiology Correlations.** Jones and Bartlett Publishers Inc. 6^a edição, 2004.

CUI F, SHI K, ZHANG LQ, TAO AJ, KAWASHIMA Y. **Biodegradable nanoparticles loaded with insulin-phospholipid complex for oral delivery: Preparation, in vitro characterization and in vivo evaluation.** Journal of Controlled Release v. 114, p. 242-250, 2006.

DAVIS ME, CHEN Z, SHIN DM. **Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer.** Nature Reviews Drug Discovery v. 7, p. 771-782, 2008.

DEBERARDINIS, R.J., LUM, J.J., HATZIVASSILIOU, G., AND THOMPSON, C.B. **The biology of cancer: Metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation.** Cell Metab. v. 7, p. 11–20, 2008.

DEDEOGLU A, FERRANTE RJ, ANDREASSEN OA, DILLMANN WH, BEAL MF. **Mice overexpressing 70-kDa heat shock protein show increased resistance to malonate and 3-nitropropionic acid.** Exp Neurol. v. 176, p. 262-265, 2002.

DENKO, N.C. **Hypoxia, HIF1 and glucose metabolisms in the solid tumour.** Nat. Rev. Cancer v. 8, p. 705-713, 2008.

DIAZ-RUIZ R, URIBE-CARVAJAL S, DEVIN A, RIGOULET M. **Tumor cell energy metabolism and its common features with yeast metabolism.** Biochim Biophys Acta. v. 1796, p. 252-265, 2009.

DOUROUMIS, D.; FAHR, A. **Nano- and micro-particulate formulate of poorly water-soluble drugs by using a novel optimized technique.** Eur. J. Pharm. Biopharm., v.63, p. 173-175, 1996.

DRODGE W. **Free radicals in the physiological control of cell function.** Physiol. Rev. v. 82, p. 47-95, 2002.

DZEJA, P.P., HOLMUHAMEDOV E.L., OZCAN, C., PUCAR D., JAHANDIR A., TERZIC A. **Mitochondria: gateway for citoprotection.** Circ. Res. Baltimore v. 89, p. 744-746, 2001.

DZEJA, P.P., REDFIELD M.M., BURNETT J.C., TERZIC A. **Failing energetic in failing hearts.** Curr. Cardiol. Rep. Philadelphia v. 2, p. 212-217, 2000.

EISENBRAND G, POOL-ZOBEL B, BAKER V, BALLS M, BLAAUBOER BJ, BOOBIS A, CARERE A, KEVEKORDES S, LHUGUENOT JC, PIETERS R, KLEINER J. **Methods of in vitro toxicology**. Food Chem Toxicol. 40: 193-236. Review, 2002.

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: 319-322, 2003.

ENGEL LW, YOUNG NA. **Human breast carcinoma cells in continuous culture: a review**. Cancer Res. Review v. 38, p. 4327-4339, 1978.

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**. Journal of Biological Chemistry v. 274, p. 25386–25392, 1999.

FANTIN V.R., St.PIERRE J., LEDER P., FANTIN. **Attenuation of LDH.A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance**. Cancer Res v. 9, p. 425–434, 2006.

FATTAL E, VAUTHIER C, AYNIE I, NAKADA Y, LAMBERT G, MALVY C, COUVREUR P. **Biodegradable polyalkylcyanoacrylate nanoparticles for the delivery of oligonucleotides**. Journal of Controlled Release v. 53, p. 137-143, 1998.

FENG J, ZENG Y, MA C, CAI X, ZHANG Q, TONG M, YU B, XU P. **The Surfactant Tween 80 Enhances Biodesulfurization**. Appl Environ Microbiol v. 72, p. 7390-7393, 2006.

FERREIRA, C. G., ROCHA, J. C. **Oncologia Molecular**. São Paulo: Atheneu, 2004.

FERREIRA, L.M.R. **Cancer metabolism: The Warburg effect**. Experimental Molecular Pathology, v. 89, p. 372-380, 2010.

FOSTER I. **Cancer: A cell cycle defect**. Radiography v. 14, p. 144-149, 2008.

FREY TG, MANNELLA CA. **The internal structure of mitochondria**. Trends Biochem Sci. v. 25, p. 319-324, 2000.

FURTADO CM, MARCONDES MC, SOLA-PENNA M, DE SOUZA ML, ZANCAN P. **Clotrimazol preferentially inhibits human breast cell proliferation, viability and glycolysis**. PLoS One v. 7, p e30462, 2012.

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

GARRETT, MD.; WORKMAN, P. **Discovering novel chemotherapeutic drugs for the third millennium**. European Journal Cancer v. 99, p. 280-284, 1999.

GEORGIEV, V.S. **Membrane transporters and antifungal resistance.** Currente Drug Targeting v.1, p. 261-284, 2000.

GIEMSA G **Arch. Schiffs. Trop.**, 30: 334, 1926.

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

GLASS-MARMOR L, BEITNER R **Detachment of glycolytic enzymes from cytoskeleton of melanoma cells induced by calmodulin antagonists.** EurJPharmacol v. 328, p. 241-248, 1997.

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

GLASS-MARMOR L, MORGENSTERN H, BEITNER R. **Calmodulin antagonists decrease glucose 1,6-bisphosphate, fructose 1,6-bisphosphate, ATP and viability of melanoma cells.** Eur J. Pharmacol v. 313, p. 265-271, 1996.

GOGVADZE, V.; ZHIVOTOVSKY, B.; ORRENIUS, S. **The Warburg effect and mitochondrial stability in cancer cells.** Molecular Aspects of Medicine, v. 31, p. 60-74, 2010.

GOMEZ LS, ZANCAN P, MARCONDES MC, RAMOS-SANTOS L, MEYER-FERNANDES JR, SOLA-PENNA M, DA SILVA D. **Resveratrol decreases breast cancer cell viability and glucose metabolism by inhibiting 6-phosphofructo-1-kinase.** Biochimie. v. 95, p. 1336-1343, 2013.

GONG, L.; CUI, Z.; CHEN, P.; HAN, H.; PENG, J.; LENG, X. **Reduced survival of patients with hepatocellular carcinoma expressing hexokinase II.** Medical Oncology, v. 29, p. 909-914, 2012.

GOTTESMAN MM, PASTAN Y. **Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter.** Annu Rev Biochem v. 62, p. 385-427, 1993.

GREEN, M.R. **Targeting targeted therapy.** New England Journal of Medicine v. 350, p. 2191-2193, 2005.

GREENE JG, PORTER RH, ELLER RV, GREENAMYRE JT. **Inhibition of succinate dehydrogenase by malonic acid produces an "excitotoxic" lesion in rat striatum.** J Neurochem. v. 61, p. 1151-1154, 1993.

GRIFFITHS, P. C.; CHEUNG, A. Y. F. **Interaction between surfactants and gelatin in aqueous solutions,** Materials Science and Technology, v. 18, p. 591-599, 2002.

GRIGUER, C.E., OLIVA, C.R., GILLESPIE, G.Y. **Glucose metabolism heterogeneity in human and mouse malignant glioma cell lines.** J Neurooncol v. 74, p. 123–133, 2005.

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

GUPTA, R.K., OESTERLING, R.M., MILDVAN, A.S. **Magnetic resonance studies of the proximity and spatial arrangement of propionyl coenzyme A and pyruvate on a biotin-metalloenzyme, transcarboxylase.** Biochemistry v. 15, p. 2881-2887, 1976.

GUPTA S, MOULIK SP. **Biocompatible microemulsions and their prospective uses in drug delivery.** J Pharm Sci. v. 97, p. 22-45, 2008.

GUYTON AC, HALL JE. **Tratado de fisiologia médica.** 10^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

HAJRA, K. M.; LIU, J. R. **Apoptosome dysfunction in human cancer.** Apoptosis v. 9, p. 691-704, 2004.

HALLIWELL B. **Antioxidants: the basics what they are and how to evaluate them.** Adv. Pharmacol. v. 38, p. 3-20, 1997.

HAMANAKA R.B., CHANDEL N.S. **Targeting glucose metabolism for cancer therapy.** J. Exp. Med. v. 209, 211-215, 2012.

HANAHAN D, WEINBERG RA. **Hallmarks of cancer: the next generation.** Cell (Review) v. 144, p. 646-674, 2011.

HANAHAN, D, WEINBERG, RA. **The hallmarks of cancer.** Cell (Review) v. 100, p. 57–70, 2000.

HARADA, Y., ASAKAWA, T. **Dynamics and dynamic light-scattering properties of Brownian particles under laser radiation pressure.** Pure and applied Optics. v. 7, p. 1001-1002, 2008.

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.** J. Invest. Dermatol. v. 100, p. 343-346, 1993.

HENDRICKS JL, CHIKAR JA, CRUMLING MA, RAPHAEL Y, MARTIN DC. **Localized cell and drug delivery for auditory prostheses.** Hearing Research v. 242, p. 117-131, 2008.

HERTSENS RC, JACOB WA. **Freeze-fracture study of heart mitochondria in the condensed or orthodox state.** Biochim Biophys Acta. v. 894, p. 507-514, 1987.

HEYWOOD R. **The use of animals in testing.** ATLA v. 14, p. 329-333, 1987.

HOAR TP, SCHULMAN JH. **Transparent water-on-oil dispersions, the oleopathic hydro-micelle.** Nature. v. 152, p. 102-103, 1943.

HOLANDINO C, VEIGA VF, RODRIGUES ML, MORALES MM, CAPELLA MAM, 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.

HOLMES, F. A.; WALTERS, R. S.; THERIAULT, R. L.; FORMAN, A. D.; NEWTON, H.; YASUDA, H.; KARIN, M.; KIKUGAWA, K. **Phase II trial of taxol, active drug in the treatment of metastatic breast cancer.** J. Natl. Cancer Inst. v. 83, p. 1797-1805, 1991.

HOSKIN D. W., RAMAMOORTHY A **Studies on anticancer activities of antimicrobial peptidies.** Biochimica et Biophysica Acta v. 1778, p. 357-375, 2008.

HSU, P.P.; SABATINI, D.M. **Cancer Cell Metabolisms: Warburg and Beyond.** Cell v. 134, p. 703-707, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER **Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil.** Disponível no site: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2013/>. Acessado em Agosto de 2013.

JOHNSON L.V. WALSH M.L. CHEN L.B. **Localization of mitochondria in living cells with rodamine 123.** PNAS v. 77, p. 990-994, 1980.

JONES, R.G., THOMPSON, C.B. **Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth.** Genes Dev. v. 23, p. 537-548, 2009.

JORI G, REDDI E. **The Role of Lipoproteins in the Delivery of Tumor-Targeting Photosensitizers.** International Journal of Biochemistry v. 25, p. 1369-1375, 1993.

JURANKA PF, ZASTAWNY RL, LING V. **P-glycoprotein: multidrug-resistance and a superfamily of membrane-associated transport proteins.** FASEB J v. 3, p. 2583-2592, 1989.

KAWAKAMI K, YOSHIKAWA T, MOROTO Y, KANAOKA E, TAKAHASHI K, NISHIHARA Y, MASUDA K. **Microemulsion formulation for enhanced absorption of poorly soluble drugs - I. Prescription design.** J Controlled Release. v. 81, p. 65-74, 2002a.

KAWAKAMI K, YOSHIKAWA T, HAYASHI T, NISHIHARA Y, MASUDA K. **Microemulsion formulation for enhanced absorption of poorly soluble drugs - II. In vivo study.** J Controlled Release. v. 81, p. 75-82, 2002b.

KAWASHIMA Y. **Preface nanoparticulate systems for improved drug delivery.** Advanced Drug Delivery Reviews v. 47, p. 1-2, 2001.

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

KERR, J. F.R.; GOBE, G. C.; WINTERFORD, C. M.; HARMON, B. V. **Anatomical methods in cell death.** *Methods Cell Biol.* v. 46, p. 1-27, 1995.

KESSEL D, LUO Y, DENG Y, CHANG CK. **The role of subcellular localization in initiation of apoptosis by photodynamic therapy.** *Photochem Photobiol.* v. 65, p. 422-426, 1997.

KHALID MH, SHIBATA S, HIURA T. **Effects of clotrimazole on the growth, morphological characteristics, and cisplatin sensitivity of human glioblastoma cells in vitro.** *J Neurosurg.* v. 90, p. 918-927, 1999.

KHALID MH, TOKUNAGA Y, CAPUTY AJ, WALTERS E. **Inhibition of tumor growth and prolonged survival of rats with intracranial gliomas following administration of clotrimazole.** *J Neurosurg.* v. 103, p. 79-86, 2005.

KHATRI K, GOYAL AK, GUPTA PN, MISHRA N, VYAS SP. **Plasmid DNA loaded chitosan nanoparticles for nasal mucosal immunization against hepatitis B.** *International Journal of Pharmaceutics* v. 354, p. 235-241, 2008.

KHERLOPIAN AR, SONG T, DUAN Q, NEIMARK MA, PO MJ, GOHAGAN JK, LAINE AF. **A review of imaging techniques for systems biology.** *BMC Syst Biol.* v. 2, p. 74, 2008.

KIP, J. E. **The role of solid nanoparticle technology in the parenteral delivery of poorly watersoluble drugs.** *Int. J. Pharm.,* v. 285, p. 109-122, 2004.

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*, 268: 6569-6577, 2011.

KLUCK, R.M.; BOSSY-WETZEL, E.; GREEN, D.R.; NEWMAYER, D.D. **The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis.** *Science* v. 275, p. 1132-1136, 1997.

KOWALTOWSKI AJ, CASTILHO RF, VERCESI AE. **Mitochondrial permeability transition and oxidative stress.** *FEBS Lett.* v. 495, p. 12-15, 2001.

KOWALTOWSKI, A.J.; VERCESI, A.E. **Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress.** *Free Radical Biology e Medicine*, New York, v. 26, p. 463-471, 1999.

KRANZ H, BODMEIER R. **Structure formation and characterization of injectable drug loaded biodegradable devices: In situ implants versus in situ microparticles.** *European Journal of Pharmaceutical Sciences* v. 34, p. 164-172, 2008.

KREBS HA, RUFFO A, JOHNSON M, EGGLESTON LV, HEMS R. **Oxidative phosphorylation.** *Biochem J.* v. 54, p. 107-116, 1953.

KROEMER, G., POUYSSEGUR, J. **Tumor cell metabolism: cancer's Achilles Heel.** *Cancer Cell* v. 13, p. 472-482, 2008.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; BRENNER, C. **Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death.** *Physiol. Rev.* v. 87, p. 99-163, 2007.

KUWANA, T.; NEWMAYER, D. D. **Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis.** *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 15, p. 691-699, 2003.

LAWRENCE MJ. **Microemulsions as drug delivery vehicles.** *Curr Opin Colloid Interface Sci.* v. 1, p. 826-832, 1996.

LAWRENCE MJ, REES GD. **Microemulsion-based media as novel drug delivery systems.** *Adv Drug Delivery Rev.* v. 45, p. 89-121, 2000.

LEHNINGER AL, NELSON DL COX MM. **Princípios da bioquímica.** São Paulo: Sarvier 2ª Ed, 1995.

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* v. 268, p. 10888-10894, 1993.

LI SD, HUANG L. **Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles.** *Molecular Pharmaceutics* v. 5, p. 496-504, 2008.

LI Y, SCHELLHORN HE. **New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C.** *J Nutr.* V. 137, p. 2171-2184, 2007.

LIEBMANN, J.; COOK, J. A.; FISHER, J.; TEAGUE, D.; MITCHELL, J. B. **In vitro studies of taxol as a radiation sensitizer in human tumor cells.** *J. Natl. Cancer Inst.* v. 86, p. 441-446, 1994.

LIN X, ZHANG F, BRADBURY CM. **2-Deoxy-D-glucoseinduced cytotoxicity and radiosensitization in tumor cells is mediated via disruptions in thiol metabolism.** *Cancer Res.* v. 63, p. 3413-3117, 2003.

LIVERSIDGE, G.G.; CUNDY, K. C. **Particle size reduction for improvement of oral bioavailability of hydrophobic drugs: I. Absolute oral bioavailability of nanocrystalline danazol in beagle dogs.** *Int. J. Pharm.*, v.125, p. 91-97, 1995.

LOFTSSON, T.; HREINSDOTTIR, D.; MASSON, M. **Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs.** *International Journal of Pharmaceutics.* v. 302, p. 18-28, 2005.

LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** *Journal of Biological Chemistry* v. 193, p. 265-275, 1951.

MAC NEIL S, DAWSON RA, CROCKER G, TUCKER WF, BITTNER B, SINGLETON JG, HUNTER T, TIERNEY DF. **Antiproliferative effects on**

keratinocytes of a range of clinically used drugs with calmodulin antagonist activity. Br J Dermatol. v. 128, p.143-150, 1993.

MAGILL M. **Microencapsulation for the personal care industry.** Cosmetics and Toiletries v. 105, p. 59-62, 1990.

MAJEWSKI N, NOGUEIRA V, BHASKAR P, COY PE, SKEEN JE, GOTTLÖB K, CHANDEL NS, THOMPSON CB, ROBEY RB, HAY N. **Hexokinase-mitochondria interaction mediated by Akt is required to inhibit apoptosis in the presence or absence of Bax and Bak.** Mol Cell. v. 16, p. 819-830, 2004.

MARAGOS WF, SILVERSTEIN FS. **The mitochondrial inhibitor malonate enhances NMDA toxicity in the neonatal rat striatum.** Brain Res Dev Brain Res. v. 88, p. 117-121, 1995.

MARCONDES C.M., SOLA-PENNA M., TORRES G.S.R., ZANCAN P. **Muscle-Type 6-Phosphofructo-1-kinase and Aldolase Associate Conferring Catalytic Advantages for Both Enzymes** IUBMB Life v. 63, p. 435–445, 2011

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 PA, FLORES-RODRÍGUEZ FL, 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 J. v. 273, p. 1975–1988, 2006.

MARTIN SJ, REUTELINGSPERGER CP, MCGAHON AJ, RADER JA, VAN SCHIE RC, LAFACE DM, GREEN DR. **Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl.** J Exp Med. v. 182, p. 1545-1556, 1995.

MATTOS, L.L.; MACHADO, J.N.; SUGIYAMA, M.M.; BOZZETTI, R.M.; PINHAL, M.A.S. **Tecnologia aplicada na detecção de marcadores tumorais.** Arq. Med. ABC. v. 30, p. 19-25, 2005.

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.

MCELIGOT AJ, YANG S, MEYSKENS FL JR. **Redox regulation by intrinsic species and extrinsic nutrients in normal and cancer cells.** Annu Rev Nutr. v. 25, p. 261-295, 2005.

MEIRA, D.D., MARINHO-CARVALHO, M.M., TEIXEIRA, C.A., VEIGA, V.F., DA POIAN, A.T., HOLANDINO, C., FREITAS, M.S., SOLA-PENNA, M. **Clotrimazole**

decreases human breast cancer cells viability through alterations in cytoskeleton-associated glycolytic enzymes. *Mol. Genet. Metab.* v. 84, p. 354-362, 2005.

MESTER, J.; REDEUILH, G. **Proliferation of breast cancer cells: regulation, mediators, targets for therapy.** *Anticancer Agents Med Chem*, v. 8, p. 872-885, 2008.

MINATTI, E. **Um novo modelo para a interação entre polímeros neutros hidrossolúveis e surfactantes.** Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Departamento de Química, Florianópolis, 2005.

MITCHELL, P. **Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation.** *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, London v. 3, p. 445-502, 1966.

MOFFAT, J.; HASHIMOTO, M.; KOJIMA A.; KENNEDY, D.O.; MURAKAMI, A. KOSHIMIZU, K.; OHIGASHI, H.; MATSUIYUASA, I. **Apoptosis induced by 1'-acetoxychavicol acetate in Ehrlich ascite tumor cells is associated with polyamine metabolism and caspase-3- action.** *Carcinogenesis*, v.21, p. 2151-2157, 2000.

MORENO-SÁNCHEZ, R.; RODRÍGUEZ-ENRÍQUEZ, S.; MARÍN-HERNANDEZ, A.; SAAVEDRA, E. **Energy metabolism in tumor cells.** *FEBS J.* v. 274, p. 1393-1418, 2007.

MOSMANN, T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays.** *J. Immunol. Meth.* v. 65, p. 55-63, 1983.

MUELLER-KLIESER, W. WALENTA, S. PASCHEN, W KALLINOWSKI, F. VAUPEL, P. **Metabolic imaging in microregions of tumors and normal tissues with bioluminescence and photon counting,** *J. Natl. Cancer Inst.* v. 80, p. 842-848, 1988.

NATH KA, NGO EO, HEGGEL RP, CROATT AJ, ZHOU B, NUTTER LM. **α -Ketoacids scavenge H₂O₂ in vitro and in vivo and reduce menadione-induced DNA injury and cytotoxicity.** *Am. J. Physiol.* v. 268, p. C227-C236, 1995.

NEARY CL, PASTORINO JG. **Akt inhibition promotes hexokinase 2 redistribution and glucose uptake in cancer cells.** *J Cell Physiol.* v. 228, p. 1943-1948, 2013.

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

NICHOLLS D. FERGUNSON S.J. **Bioenergetics 2.** 3ª edição. San Diego: Academic Press, v. 255, 2002.

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 tumor types.** *Nature* v. 342, p. 705-708, 1989.

NORBURY C.J., HICKSON I.D **Cellular responses to DNA damage**. Annual Review Pharmacology Toxicology v. 41, p 367-401, 2001.

NOWSHEEN S, WUKOVICH RL, AZIZ K, KALOGERINIS PT, RICHARDSON CC, PANAYIOTIDIS MI, **Accumulation of oxidatively induced clustered DNA lesions in human tumor tissues**. Mutat Res. v. 674, p. 131-136, 2009.

ODDIS CV, FINKEL MS **Cytokine-stimulated nitric oxide production inhibits mitochondrial activity in cardiac myocytes**. Biochem Biophys Res Commun v. 213, p. 1002–1009, 1995.

ORTEGA-CAMARILLO, C.; DÍAZ-FLORES, M.; AVALOS-RODRÍGUEZ, A.; VERGARA-ONOFRE, M.; ROSALES-TORRES, A.M. **Apoptosis and its biomedical significance**. Gac. Med. Mex. v. 137, p. 563-577, 2001.

OTT, M.; GOGVADZE, V.; ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B. **Mitochondria, oxidative stress and cell death**. Apoptosis v. 12, p. 913-922, 2007.

PAL, A., SHAH, S., DEVI, S. **Preparation of silver, gold and silver-gold bimetallic nanoparticles in w/o microemulsion containing tritonX-100**. Colloids and Interface Science A. v. 302, p. 483-487, 2007.

PARK JH, VON MALTZAHN G, XU MJ, FOGAL V, KOTAMRAJU VR, RUOSLAHTI E, BHATIA SN, SAILOR MJ. **Cooperative nanomaterial system to sensitize, target, and treat tumors**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America v. 107, p. 981-986, 2010.

PAUL, B. K.; MOULIK, S. P. **Uses and applications of microemulsions**. Current Science, v. 80, p. 990-1001, 2001.

PEDERSEN, P.L. **Warburg, me and hexokinase 2: Multiple discoveries of key molecular events underlying one of cancer most common phenotypes, the “Warburg Effect”, i.e., elevated glycolysis in the presence of oxygen**. J. Bioenerg. Biomembr. v. 39, p. 211-222, 2007.

PEEK LJ, MIDDAUGH CR, BERKLAND C. **Nanotechnology in vaccine delivery**. Advanced Drug Delivery Reviews v. 60, p. 915-928, 2008.

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

PELIZZETTI, E., PRAMAURO, E. **Analytical applications of organized molecular assemblies**. Analytica Chimica Acta v. 169, p. 1-29, 1985.

PENSO, J., BEITNER, R. **Detachment of glycolytic enzymes from cytoskeleton of Lewis lung carcinoma and colon adenocarcinoma cells induced by clotrimazole and its correlation to cell viability and morphology**. Mol. Genet. Metab. v. 76, p. 181-188, 2002a.

PENSO, J., BEITNER, R. **Clotrimazole decreases glycolysis and the viability of lung carcinoma and colon adenocarcinoma cells.** Eur. J. Pharmacol. v. 451, p. 227-235, 2002b.

PENSO, J., BEITNER, R. **Clotrimazole and bifonazole detach from mitochondria of melanoma cells.** European Journal of Pharmacology v. 342, p. 113-117, 1998.

PERES C M; CURI R. **Como cultivar células.** Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A. p. 283, 247-248, 2005.

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

PETIT P.X. **Flow cytometric analysis of rhodamine 123 fluorescence during modulation of the membrane potential in plant mitochondria.** Plant Physiology. v. 98, p 279-286, 1992.

PISTOLLATO F, ABBADI S, RAMPAZZO E, VIOLA G, DELLA PUPPA A, CAVALLINI L, FRASSON C, PERSANO L, PANCHISION DM, BASSO G. **Hypoxia and succinate antagonize 2-deoxyglucose effects on glioblastoma.** Biochem Pharmacol. v. 80, p. 1517-1527, 2010.

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

PRENTIS, R.A.; LIS, Y. WALKER, S.R. **Pharmaceutical innovation by the seven U.K.- owned pharmaceutical companies (1964-1984).** Br. J. Clin. Pharmacol. v.25, p. 387-396, 1998.

PRINCE, L.M. **A theory of aqueous emulsions. Mechanism of film curvature at the oil/water interface.** Journal of Colloid and Interface Science, v.29, p. 216-221, 1969.

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

RAFF, M.C. **Social controls on cell survival and cell death.** Nature v. 356, p. 397-400, 1992.

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.

RAHN, C.A.; BOMBICK, D.W.; DOOLITTLE, D.J. **Assessment of mitochondrial membrane potential as an indicator of cytotoxicity.** Fundam. Appl. Toxicol v. 16, p. 435-448, 1991.

REDDY, G.P.V. **Cell cycle: regulatory events in G1-->S transition of mammalian cells.** J. Cell. Biochem. v. 54, p. 379-386, 1994.

REGE, B.D. KAO JP, POLLI JE **Effects of nonionic surfactants on membrane transporters in Caco-2 cell monolayers.** Eur. J. Pharm. Sci., Shannon v. 16, p. 237-246, 2002.

RESENDES-ANTONIO, O.; CHECA, A.; ENCARNACIO, S. **Modeling Core Metabolism in Cancer Cells: Surveying the Topology Underlying the Warburg Effect.** PLoS ONE, v. 5, p. 1-11, 2010.

REYNOLDS, E.S. **The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy.** Journal of Cell Biology v. 17, p. 208-212, 1963.

RISTOW M. **Oxidative metabolism in cancer growth.** Curr Opin Clin Nutr Metab Care. v. 9, p. 339-345, 2006

ROBERTS, C.W.; MCLEOD, R.; RICE D.W.; GINGER, M.; CHANCE, M.L.; GOAD, L.J. **Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa.** Mol. Biochem. Parasitol. v. 126, p. 129-142, 2003.

ROMA L.P., BOSQUEIRO J.R, CUNHA D.A, CARNEIRO E.M, GURGUL-CONVEY E., LENZEN S., BOSCHERO A.C., SOUZA K.L. **Protection of insulin-producing cells against toxicity of dexamethasone by catalase overexpression.** Free Radic Biol Med. v. 15, p. 1386-1393, 2009.

RONOT X., BENEL L., ADOLPHE M., MOUNOLOU J.C. **Mitochondrial analysis in living cells: the use of rhodamine 123 and flow cytometry.** Biol Cell. v. 5, p. 1-8, 1986.

ROSSIGNOL R, GILKERSON R, AGGELER R, YAMAGATA K, REMINGTON SJ, CAPALDI RA. **Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells.** Cancer Res. v. 64, p. 985-993, 2004.

SARASTE, M. **Oxidative phosphorylation at the fin de siecle.** Science v. 283, p. 1488-1493, 1999.

SCHAFFER FQ, BUETTNER GR. **Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple.** Free Radic Biol Med. (Review) v. 30, p. 1191-1212, 2001.

SCHWARTZ M.K., BODANSKY O. **Utilization of automation for studies of enzyme kinetics.** Methods Biochem. Anal v. 16, p. 183–218, 1968.

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.

SHINODA, K. **Colloidal surfactants: some physicochemical properties.** New York: Academic Press, 1963.

SOLA-PENNA, M., DA SILVA, D., COELHO, W.S., MARINHO-CARVALHO, M.M., ZANCAN, P. **Regulation of mammalian muscle type 6-phosphofructo-1-**

kinase and its implication for the control of the metabolism. International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life v. 62, p. 791-796, 2010.

SOLAINI, G.; SGARBI, G.; BARACCA, A. **Oxidative phosphorylation in cancer cells.** Biochimica et Biophysica Acta, v. 1807, p. 534-542, 2010.

SPITZ D.R., AYKIN-BURNS N., AHMAD I.M., ZHU Y., OBERLEY L.W **Increased levels of superoxide and H₂O₂ mediate the differential susceptibility of cancer cells versus normal cells to glucose deprivation** Biochem. J. v. 418, p. 29–37, 2009.

SPITZ DR, SIM JE, RIDNOUR LA, GALOFORO SS, LEE YJ. **Glucose deprivation-induced oxidative stress in human tumor cells. A fundamental defect in metabolism?** Review Ann N Y Acad Sci. v. 899, p. 349-362, 2000.

SPITZ, G.A., FURTADO, C. M., SOLA-PENNA, M., ZANCAN, P. **Acetylsalicylic acid and salicylic acid decrease tumor cell viability and glucose metabolism modulating 6-phosphofructo-1-kinase structure and activity.** Biochemical Pharmacology v. 77, p. 46-53, 2009.

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

STEVENS A., LOWE JS. **Pathology.** Harcourt Publishers Lt 2^a edição, 2000.

STRASSER, A. O'CONNOR, L. DIXIT, V. M. **Apoptosis signaling.** Annu Rev Biochem. v. 69, p. 217-245, 2000.

SUN RC, BOARD PG, BLACKBURN AC. **Targeting metabolism with arsenic trioxide and dichloacetate in breast cancer cells.** Mol Cancer v.10, p. 142, 2011.

SZATROWSKI TP, NATHAN CF. **Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells.** Cancer Res. v. 51, p. 794-798, 1991.

TANG BC, DAWSON M, LAI SK, WANG YY, SUK JS, YANG M, ZEITLIN P, BOYLE MP, FU J, HANES J. **Biodegradable polymer nanoparticles that rapidly penetrate the human mucus barrier.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America v. 106, p. 19268-19273, 2009.

TENJARLA S. **Microemulsions: An overview and pharmaceutical applications.** Crit Rev Ther Drug. v. 16, p. 461-521, 1999.

TIAN W N, L D BRAUNSTEIN, J PANG, K STUHLMEIER, Q C XI, X TIAN, R C STANTON. **Importance of glucose 6-phosphate dehydrogenase activity for cell growth.** J Biol Chem, v. 273, p. 10609-10617, 1998.

TIGHIOUART M, ROGATKO A. **Dose Finding with Escalation with Overdose Control (EWOC) in Cancer Clinical Trials.** Statistical Science v. 25, p. 217-226, 2010.

TRUMP BF, BEREZESKY IK, CHANG SH, PHELPS PC. **The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis.** Toxicol Pathol. v. 25, p. 82–88, 1997.

TUSCHL H; SCHWAB C. **Flow cytometric methods used as screening test for basal toxicity of chemicals.** Toxicology in vitro v. 18, p. 483-491, 2004.

VALKO, M.; LEIBFRITZ. D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44-84, 2007.

VAN GENDEREN, H.; KENIS, H.; LUX, P.; UNGETH, L.; MAASSEN, C.; DECKERS, N.; NARULA, J.; HOFSTRA, L.; REUTELINGSPERGER, C. **In vitro measurement of cell death with the annexin A5 affinity assay.** Nature Protocols, v.1, p.363-367, 2006.

VANDER HEIDEN MG. **Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens.** Nat Rev Drug Discov. v. 10, p. 671-684, 2011.

VAUPEL, P. KALLINOWSKI, F. OKUNIEFF, P. **Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review,** Cancer Res. v. 49, p. 6449–6465, 1989.

VERMA RK, GARG S. **Current status of drug delivery technologies and future directions.** Pharm Technol. v. 25, p. 1-14, 2001.

VERMEULEN, L.; SPRICK, M.R.; KEMPER, K.; STASSI, G.; MEDEMA, J.P. **Cancer stem cells – old concepts, new insights.** Cell Death and Differentiation v. 15, p. 947–958, 2008.

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.

UCHIYAMA Y. **Apoptosis: The history and trends of its studies.** Arch Histol Cytol. v. 58, p. 127-37, 1995.

UNGEFROREN H, SEBENS S, SEIDL D, LEHNERT H, HASS R **Interaction of tumor cells with the microenviroment.** Cell Commun Signal v. 9, p. 18, 2011

UYEDA, K. **Reaction of phosphofructokinase with maleic anhydride, succinic anhydride, and pyridoxal 5'-phosphate.** Biochemistry v. 8, p. 2366-2373, 1979.

WALLACE KB, STARKOV AA. **Mitochondrial targets of drug toxicity.** Annu Rev Pharmacol Toxicol. v. 40, p. 353-388, 2000.

WALLACE DC. **Mitochondrial diseases in man and mouse.** Science. v. 283, p. 1482-1488, 1999.

WARBURG, O. **On respiratory impairment in cancer cells.** Science v. 124, p. 269-270, 1956.

WATANABE M, HITOMI M, VAN DER WEE K, ROTHENBERG F, FISHER SA, ZUCKER R, SVOBODA KK, GOLDSMITH EC, HEISKANEN KM, NIEMINEN AL. **The pros and cons of apoptosis assays for use in the study of cells, tissues, and organs.** *Microsc Microanal.* v. 8, p. 375-391, 2002.

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

WINEER EP, MORROW M, OSBORNE CK, HARRIS J. **Malignant tumors of the breast cancer.** *Principles e practice of oncology 6th edition.* Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins p. 1651-1726, 2001.

WITSCH, E.; SELA, M.; YARDEN, Y. **Roles for growth factor in cancer progression.** *Physiology* v. 25, p. 85-101, 2010.

WOLF, A. A., S.; MICALLEF,J.; MUKHERJEE,J.; SABHA, N.; CAIRNS, R.; HAWKINS,C.; GUHA, A. **Hexokinase 2 is a key mediator of aerobic glycolysis and promotes tumor growth in human glioblastoma multiforme.** *The Journal of Experimental Medicine* v. 208, p. 313-326, 2011.

YASUHARA S, ZHU Y, MATSUI T, TIPIRNENI N, YASUHARA Y, KANEKI M, ROSENZWEIG A, MARTYN JA. **Comparison of comet assay, electron microscopy, and flow cytometry for detection of apoptosis.** *J. Histochem Cytochem* v. 51, p. 873-885, 2003.

YEZHELYEV MV, GAO X, XING Y, AL-HAJJ A, NIE SM, O'REGAN RM. **Emerging use of nanoparticles in diagnosis and treatment of breast cancer.** *Lancet Oncology* v. 7, p. 657-667, 2006.

XU, G. MCLEOD, H. L. **Strategies for enzyme/Prodrug cancer therapy.** *Clin. Cancer Res.* v. 7, p. 3314-3324, 2001.

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.** *Biochem. Pharmacol.* v. 73, p. 1520-1527, 2007.

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 and Genetics Metabolism* v. 86, p. 392-400, 2005a.

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

ZHAO X, SONG JD. **Clotrimazole induced apoptosis in human colon cancer cell line CCL229.** *Ai Zheng.* v. 21, p. 630-635, 2002.

ZHOU, S.T.; HUANG, C.; WEI, Y. **The metabolic switch and its regulation in cancer cells.** Science China Life Sciences, v.53, p. 942-958, 2010.

ZHOU YY, GUO Z, ZHANG YW, HUANG W, ZHOU YF, YAN DY. **Hyperbranched Polyamidoamines Containing beta-Cyclodextrin for Controlled Release of Chlorambucil.** Macromolecular Bioscience v. 9, p. 1090-1097, 2009.

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, 388: 97-101, 2009.

ZOU, H.; HENZEL, W.J.; LIU, X.; LUTSCHG, A.; WANG, X. **Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c dependent activation of caspase-3.** Cell v. 90, p. 405-413, 1997.

8. APÊNDICES – TRABALHOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO

8.1 Apêndice A: *Muscle-Type 6-Phosphofructo-1-kinase and Aldolase Associate Conferring Catalytic Advantages for Both Enzymes*

8.2 Apêndice B: *Clotrimazole Preferentially Inhibits Human Breast Cancer Cell Proliferation, Viability and Glycolysis*

8.3 Apêndice C: *Resveratrol decreases breast cancer cell viability and glucose metabolism by inhibiting 6-phosphofructo-1-kinase*

Research Communication

Muscle-Type 6-Phosphofructo-1-kinase and Aldolase Associate Conferring Catalytic Advantages for Both Enzymes

Mariah Celestino Marcondes, Mauro Sola-Penna, Renan da Silva Gianoti Torres, and Patricia Zancan
Laboratório de Oncobiologia Molecular (LabOMol) and Laboratório de Enzimologia e Controle do Metabolismo (LabECoM), Departamento de Fármacos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Summary

6-Phosphofructo-1-kinase (PFK) and aldolase are two sequential glycolytic enzymes that associate forming heterotetramers containing a dimer of each enzyme. Although free PFK dimers present a negligible activity, once associated to aldolase these dimers are as active as the fully active tetrameric conformation of the enzyme. Here we show that aldolase-associated PFK dimers are not inhibited by clotrimazole, an antifungal azole derivative proposed as an antineoplastic drug due to its inhibitory effects on PFK. In the presence of aldolase, PFK is not modulated by its allosteric activators, ADP and fructose-2,6-bisphosphate, but is still inhibited by citrate and lactate. The association between the two enzymes also results on the twofold stimulation of aldolase maximal velocity and affinity for its substrate. These results suggest that the association between PFK and aldolase confers catalytic advantage for both enzymes and may contribute to the channeling of the glycolytic metabolism. © 2011 IUBMB

IUBMB *Life*, 63(6): 435–445, 2011

Keywords glycolysis; phosphofructokinase; aldolase; clotrimazole; channeling.

INTRODUCTION

6-Phosphofructo-1-kinase (PFK; phosphofructokinase; EC 2.7.1.11) is the major regulatory glycolytic enzyme and acts as the pacemaker of glycolysis (1). This highly regulated enzyme exists in diverse oligomeric conformations, including mono-

mers, dimers, tetramers, and hexadecamers (1). The transition between dimers and tetramers is highly relevant for the enzyme's regulation because the former have very low catalytic activity, whereas the latter have been described as fully active (1–3). Several allosteric modulators of PFK affect the equilibrium between dimers and tetramers; the inhibitors citrate and lactate favor the formation of dimers, and the activators ADP and fructose-2,6-bisphosphate (F2,6BP) stabilize tetramers (4–8). Moreover, the association of PFK with aldolase or calmodulin stabilizes PFK in a dimeric conformation that has a catalytic activity equivalent to that of the tetramers (4, 9–11).

Aldolase (EC 4.1.2.13), the sequential enzyme to PFK on glycolysis, cleaves the product of the PFK reaction, fructose-1,6-bisphosphate (F1,6BP), into glyceraldehyde-3-phosphate and dihydroxyacetone phosphate. The association between PFK and aldolase contributes to the channeling of glycolysis, increasing the rate of this pathway (12–15). Aldolase and PFK associate with the cytoskeleton (9, 16–23), especially in tumor cells (19, 20), which increases their activity and the channeling of glycolysis (14). This event is directly correlated to the Warburg effect, conferring invasive metastatic properties to the tumor (24, 25). The down-regulation of both PFK and aldolase has been reported to drastically decrease tumor cell viability (20).

Clotrimazole (CTZ) is an antifungal derivative azole with calmodulin antagonist properties and described as a potential antineoplastic drug due to its ability to decrease tumor cell glycolysis (20, 26–28). We have previously reported that this drug decreases the association of PFK and aldolase with the tumor cell cytoskeleton, thus decreasing tumor viability (20). Moreover, CTZ directly inhibits PFK by promoting the dissociation of PFK tetramers into dimers (23) and by augmenting the inhibitory effectiveness of ATP (29).

The present work aimed to evaluate whether the interaction of PFK and aldolase interferes with their catalytic activities and the inhibition of the enzymes by CTZ.

Received 17 February 2011; accepted 7 March 2011

Address correspondence to: Patricia Zancan, Laboratório de Oncobiologia Molecular (LabOMol), Departamento de Fármacos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ 21941-590, Brazil. Tel: +55-21-2260-9192, Ext. 203. E-mail: pzancan@ufrj.br

MATERIALS AND METHODS

Materials

ATP, ADP, CTZ, citrate, F1,6BP, F2,6BP, F6P, lactate, NADH, triosephosphate isomerase, and α -glycerophosphate dehydrogenase were purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO). ^{32}P i was purchased from Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (São Paulo, Brazil). $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ was prepared according to Maia et al. (30). PFK was purified from rabbit skeletal muscle, as previously described (21). Aldolase from rabbit skeletal muscle was purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO). All protein content measurements were performed as described by Lowry et al. (31).

PFK Activity

PFK activity was measured by the method described by Sola-Penna et al. (32) with the modifications introduced by Zancan and Sola-Penna (33, 34). The reaction medium contained 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM MgCl_2 , 1 mM $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (4 $\mu\text{Ci/nmol}$), 1 mM fructose-6-phosphate and 1 $\mu\text{g/mL}$ PFK, except when otherwise specified. The reaction was stopped after increasing reaction times by the addition of a suspension of activated charcoal in 0.1 M HCl and 0.5 M mannitol, and after centrifugation, the supernatant containing $[1\text{-}^{32}\text{P}]\text{fructose-1,6-bisphosphate}$ was analyzed in a liquid scintillation counter. The signals from appropriate blanks in the absence of fructose-6-phosphate were measured and subtracted from all measurements to account for ATP hydrolysis. The catalytic rate was calculated by linear regression of the amount of F1,6BP formed versus reaction time. The enzyme activity was expressed as mU of PFK activity, where 1 mU was taken to be the formation of 1 nmol of fructose-1,6-bisphosphate per minute of reaction.

Aldolase Activity

Aldolase activity was assessed through a coupled enzyme linked assay in a reaction medium containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM MgCl_2 , 1 mM F1,6BP, 2 mM NADH, triosephosphate isomerase, and α -glycerophosphate dehydrogenase. The reaction was followed spectrophotometrically at 340 nm, which corresponds to the absorbance of NADH. Aldolase activity was expressed as mU, where 1 mU was considered to be the reduction of 2 nmol of NADH per minute of reaction.

Intrinsic Fluorescence Measurements

Intrinsic fluorescence measurements of PFK were performed as described previously (29) using the same conditions described for the radioassay. Excitation wavelength was fixed at 280 nm, and fluorescence emission was scanned from 300 to 400 nm. The center of mass of the intrinsic fluorescence spectra (CM) was calculated using:

$$\text{CM} = \frac{\sum \lambda \times I_\lambda}{\sum I_\lambda} \quad (1)$$

where λ is the wavelength and I_λ is the fluorescence intensity at a given λ . Center of mass is used to evaluate the oligomeric state of PFK because the dissociated enzyme exposes its tryptophans to the aqueous milieu to a greater extent than the oligomer; thus, the fluorescence emitted by these tryptophans is of lower energy. Consequently, the center of mass of a population of tetramers is smaller than that of a population of dimers, as confirmed in many recent publications (4–6, 11, 23, 29, 35).

Light Scattering Measurements

Light scattering measurements were performed as described previously (6) using the same conditions described for the radioassay. Appropriate reference spectra were subtracted from the data to correct for background interferences. The excitation wavelength was set at 510 nm and the emission light scattered was scanned from 500 to 520 nm. The total concentration of protein in the assay was 1 $\mu\text{g/mL}$.

Statistics and Calculations

Statistical analyses and enzyme kinetics calculations were performed using the software SigmaPlot 10.0 integrated with SigmaStat 3.51 (Systat, CA). Student's *t*-tests or one-tailed ANOVAs were used to evaluate the significance of the results. $P < 0.05$ was considered to be statistically significant.

The kinetic parameters for the inhibitory effects of CTZ on PFK and aldolase were calculated as described previously (29) by nonlinear regression using the equation

$$v = \frac{v_0 \cdot I_{0.5}^n}{I_{0.5}^n + [\text{CTZ}]} + v_R \quad (2)$$

where v is the calculated enzyme's activity at a given concentration of CTZ ($[\text{CTZ}]$), v_0 is the difference between the enzyme's activity in the absence of CTZ and the activity when CTZ is promoting its maximal inhibitory effects (v_R), $I_{0.5}$ is the inhibition constant equivalent to the concentration of CTZ resulting in 50% of the maximal inhibition (v_R) and n is the cooperativity index.

Kinetic parameters for the effects of ATP on PFK were calculated considering the two components for PFK modulation by this metabolite. The first component is the stimulatory component for the substrate saturation curve, in which PFK exhibits an allosteric pattern that is described by the equation:

$$v = \frac{V_{\text{max_app}} \times [\text{ATP}]^{n_s}}{K_{0.5}^{n_s} + [\text{ATP}]^{n_s}} \quad (3)$$

where v is the PFK activity at a given concentration of ATP ($[\text{ATP}]$), $V_{\text{max_app}}$ is the apparent maximal velocity calculated, $K_{0.5}$ is the affinity constant for this component and n_s is the cooperativity index for this component. The second component is the inhibitory component that can be adjusted by the equation:

$$v = \frac{V_{\text{sat}} \times I_{0.5}^{n_i}}{I_{0.5}^{n_i} + [\text{ATP}]^{n_i}} \quad (4)$$

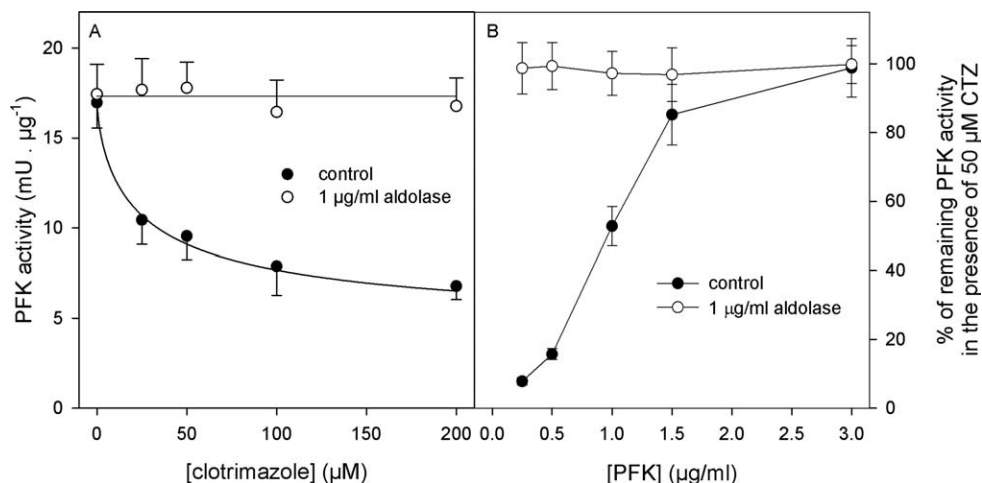


Figure 1. Effects of CTZ on PFK activity in the absence and presence of aldolase. PFK activity was assessed as described under “Materials and Methods” in the absence and in the presence of 1 μg/mL aldolase. Panel A: Dose-response curve of CTZ effects on PFK activity in the absence (control, filled circles) and in the presence of 1 μg/mL aldolase (empty circles). Solid line shown for the absence of aldolase was obtained fitting Eq. (2) to the experimental data. Solid line for the presence of aldolase is the linear regression of the plotted data. Panel B: Relative remaining PFK activity in the presence of 50 μM CTZ assessed with the concentrations of PFK indicated on the abscissa. The experiments were performed in the absence (control, filled circles) and in the presence of 1 μg/mL aldolase (empty circles). All plotted data are mean ± standard errors of, at least, four independent experiments ($n = 4$).

where v is the PFK activity at a given concentration of ATP ([ATP]), $I_{0.5}$ is the affinity constant for this component, n_i is the cooperativity index for this component and V_{sat} is the PFK activity when the first component is saturated. Assuming this statement, V_{sat} is a function of the first component of the curve and can be substituted by Eq. (3) to result in the following equation:

$$v = \frac{\frac{V_{\text{maxapp}} \times [\text{ATP}]^{n_s}}{K_{0.5}^{n_s} + [\text{ATP}]^{n_s}} \times I_{0.5}^{n_i}}{I_{0.5}^{n_i} + [\text{ATP}]^{n_i}} \quad (5)$$

which was fitted to the experimental data through nonlinear regression for the effects of ATP on PFK activity.

Kinetic parameters for the effects of F6P on PFK were calculated through nonlinear regression using the experimental data to fit the parameters of the equation:

$$v = \frac{V_{\text{max}} \times [\text{F6P}]^n}{K_{0.5} + [\text{F6P}]^n} \quad (6)$$

where v is the PFK activity calculated for a given concentration of F6P ([F6P]), V_{max} is the maximal velocity calculated at saturating concentrations of F6P, $K_{0.5}$ is the affinity constant for F6P, which is equal to the concentration of F6P responsible for half-activation of the PFK by F6P, and n is the cooperativity index for this phenomenon.

Kinetic parameters for aldolase were assessed using Eq. (6), substituting F6P by F1,6BP.

The kinetic parameters for the stimulatory effects of PFK on aldolase activity were calculated by nonlinear regression using the equation

$$v = v_i + \frac{v_a \cdot [\text{PFK}]^n}{K_a^n + [\text{PFK}]^n} \quad (7)$$

where v is the calculated aldolase activity at a given concentration of PFK ([PFK]), v_i is the aldolase activity in the absence of PFK, K_a is the activation constant reflecting the concentration of PFK that results in 50% of the maximal activation (v_a) and n is the cooperativity index.

RESULTS

Counteraction of CTZ-Induced Inhibition of PFK by Aldolase

PFK is inhibited by CTZ in a dose-dependent manner, with an $I_{0.5}$ of 28 ± 2 μM and a maximal inhibition of 70% (Fig. 1A, filled circles). However, when these experiments were performed in the presence of 1 μg/mL aldolase, no inhibition of PFK activity was observed up to 200 μM CTZ (Fig. 1A, empty circles). We have reported that PFK inhibition by CTZ is due to the ability of the drug to promote the dissociation of the fully active tetrameric conformation of the enzyme into relatively inactive dimers (23, 29). It has been reported that aldolase binds to PFK, stabilizing the enzyme in the dimeric conformation.

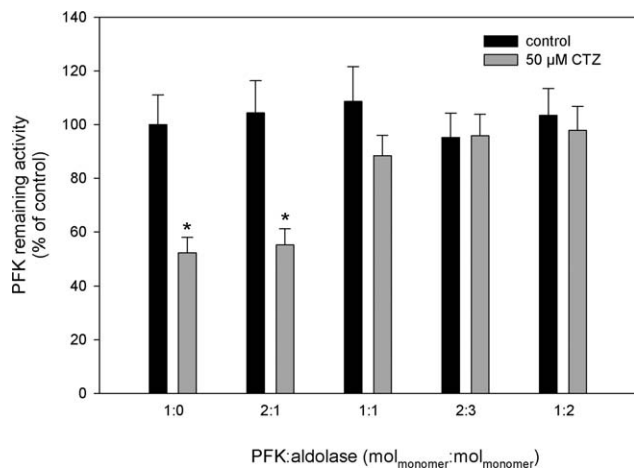


Figure 2. Reversal of CTZ-induced inhibition of PFK by aldolase. PFK activity was assessed as described under “Materials and Methods” in the presence of 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PFK and increasing concentrations of aldolase. The molar ratio was calculated considering PFK monomer presenting 85 kDa and aldolase monomer 45 kDa. Experiments were performed in the absence and in the presence of 50 μM CTZ as indicated. Bars are mean \pm standard errors of, at least, four independent experiments ($n = 4$). * $P < 0.05$ comparing with control experiments in the absence of CTZ (Student’s t -test).

However, these PFK dimers bound to aldolase maintain a catalytic activity similar to that observed for the tetramers (10). This fact could explain the lack of PFK inhibition by CTZ in the presence of aldolase, as PFK dimers formed due to the effects of CTZ would bind to aldolase and thus maintain their catalytic activity. To corroborate this hypothesis, we evaluated the effects of CTZ on PFK activity at different concentrations of the enzyme.

It has been reported that the equilibrium between PFK dimers and tetramers is directly affected by the concentration of the enzyme; the more concentrated the enzyme is, the more stable tetramers are (6, 11). In fact, when increasing the concentration of PFK in the reaction medium, a progressive decrease of the inhibition promoted by CTZ is observed. For example, in the presence of 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PFK, no significant effect of CTZ was observed (Fig. 1B, filled circles). Moreover, aldolase was able to abrogate the effects of CTZ on PFK at all PFK concentrations used (Fig. 1B, empty circles). Furthermore, we determined that 1 mol of aldolase monomer per mol of PFK monomer is required for aldolase to protect PFK from the inhibitory effects of CTZ. This can be observed in Fig. 2, which shows that a stoichiometry of 2 PFK monomers per aldolase monomer does not alter the inhibition of PFK by CTZ. However, when aldolase is present at a concentration proportionally equal to or in excess of that of PFK, full protection from CTZ is observed (Fig. 2). These data support the hypothesis that aldolase binds to the PFK dimers formed due to the effects of CTZ, turning

these dimers into an active dimeric conformation and thus preventing the inhibitory effects of the drug.

Structural Evidences for the Counteraction of CTZ-Induced PFK Inhibition by Aldolase

Evidences for the interaction between PFK and aldolase were assessed through two distinct techniques: intrinsic fluorescence emission spectroscopy and light scattering. We have efficiently applied these methods to evaluate the transition between PFK dimers and tetramers (4–6, 8, 11, 18, 22, 23, 29, 35, 36). Intrinsic fluorescence measurements show a slight red-shift of PFK intrinsic fluorescence emission spectrum in the presence of aldolase (Fig. 3A, cf. the black line for PFK with the green line for PFK in the presence of aldolase). This effect becomes clear calculating the center of mass of these spectra. The center of mass of the intrinsic fluorescence emission spectra of PFK alone is 338.2 ± 0.4 nm (mean \pm standard error of four independent experiments; $n = 4$). In the presence of aldolase, the calculated center of mass of PFK intrinsic fluorescence emission spectra shifts to 341.6 ± 0.5 nm ($P < 0.05$ comparing to control in the absence of aldolase; Student’s t -test; $n = 4$). This later value is not different from the center of mass of PFK intrinsic fluorescence spectra in the presence of CTZ or aldolase and CTZ (341.3 ± 0.4 nm and 341.4 ± 0.4 nm, respectively). This red-shift observed is characteristic of the dissociation of the tetramers of the kinase into dimers, as well documented in previous publications (4–6, 8, 11, 18, 22, 23, 29, 35, 36). It cannot be due to the simple interference of aldolase intrinsic fluorescence emission since the signal for this emission is negligible when compared to PFK signal (Fig. 3A, cf. the red line for aldolase with the black line for PFK). Moreover, the presence of 50 μM CTZ, which has been demonstrated to dissociate PFK tetramers into dimers (23, 29), induced a similar effect on PFK intrinsic fluorescence emission spectrum (Fig. 3A, yellow line). This pattern is not modified in the simultaneous presence of aldolase and CTZ (Fig. 3A, blue line). These results suggest that both aldolase and CTZ stabilize the dimeric conformation of PFK.

To corroborate this hypothesis, we evaluated the ability of the proteins to scatter light, which is proportional to the dimension of the protein particles in solution. As expected, PFK scatters more light than aldolase (Fig. 3B, cf. the black line, for PFK, with the red line, for aldolase), which is compatible with the higher molecular weight of the former comparing to the later (340 kDa for PFK tetramers vs. ~ 180 kDa for aldolase tetramers). CTZ strongly promotes the attenuation of the light scattered by PFK (Fig. 3B, yellow line), which is indicative of the dissociation of the enzyme. On the other hand, CTZ almost did not affected light scattering by aldolase (Fig. 3B, magenta). The simultaneous presence of PFK and aldolase in the medium promotes a pattern of light scattering (Fig. 3B, green line) that is intermediate between those observed with PFK alone and in the presence of CTZ. This is indicative that the protein particles under this conditions present an intermediate size between the

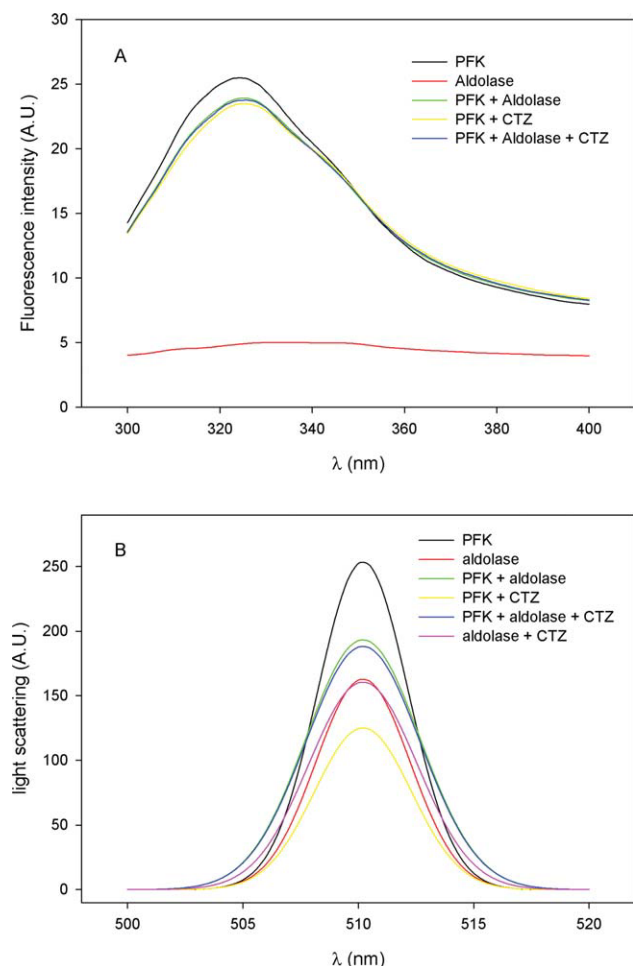


Figure 3. Structural evaluation of PFK and aldolase in the absence and the presence of CTZ. Panel A: intrinsic fluorescence emission of the enzymes was evaluated as described under “Materials and Methods” exciting the samples at 280 nm and the fluorescence emission was scanned from 300 to 400 nm and represented as arbitrary units (A.U.). The curves are representative spectra of four independent experiments. Panel B: light scattering experiments were performed as described under Materials and Methods, exciting the samples at 510 nm and recording the light scattered from 500 to 510 nm, which is represented as arbitrary units (A.U.). The curves are representative light results of four independent experiments. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

tetrameric and dimeric PFK conformations. Moreover, the simultaneous presence of PFK and aldolase produces protein particles that scatter more light than aldolase alone and less than PFK alone. Together with the results described above, this result suggests that PFK and aldolase might associate into heterotetramers formed by a PFK and an aldolase dimer. The ability of PFK and aldolase to generate such a heterotetramer have been demonstrated before, using other techniques (10). This heterotetramer, presenting ~260 kDa, would be compatible with

the light scattering pattern observed in the simultaneous presence of PFK and aldolase (Fig. 3B, green line). This heterotetramer does not dissociate in the presence of CTZ, since the drug did not affect the light scattering pattern of the associated proteins (Fig. 3B, blue line). These results suggest that CTZ is not able to inhibit PFK in the presence of aldolase because it is unable to dissociate the active heterotetrameric enzyme complex formed by the two enzymes.

CTZ Affects the Kinetic Parameters of PFK, but not in the Presence of Aldolase

The kinetic parameters for PFK activation by its substrates were evaluated in the presence of CTZ and aldolase. As previously reported (29), CTZ alters the effects of the substrates on enzyme kinetics (Figs. 4A and 4C), decreasing the maximal velocity and the affinity of PFK for F6P and ATP at the catalytic site, while increasing the affinity of the enzyme for ATP at its inhibitory site (Table 1). In the presence of aldolase, the affinity of PFK for its substrate at the catalytic site is also lower when compared to the control in the absence of aldolase (Table 1). This occurs in spite of the fact that the maximal velocity of PFK and the affinity of ATP inhibitory site are not altered by aldolase (Table 1). On the other hand, in the presence of aldolase, CTZ presented no effect on PFK activation by its substrates (Figs. 4B and 4D; Table 1). The diminished affinity for ATP and F6P at PFK catalytic site is characteristic of the dimeric conformation of the enzyme (1) and is observed in the presence of both, CTZ or aldolase.

Allosteric Modulators of PFK Interfere with the Counteraction of PFK Inhibition by Aldolase

We evaluated the effects of CTZ on PFK activity in the presence of other modulators of the enzyme’s quaternary structure, in both the absence and the presence of aldolase. For this, we used ADP and fructose-2,6-bisphosphate (F2,6BP), two stabilizers of the tetrameric structure of the enzyme, and citrate and lactate, two stabilizers of the enzyme dimers (4–6, 8). In the absence of aldolase (Fig. 5A), both stabilizers of PFK tetramers attenuated the inhibitory effects of CTZ. ADP was much more efficient than F2,6BP in both activating PFK and protecting the enzyme against the inhibitory effects of 50 μ M CTZ; ADP promotes a fourfold stimulation of the enzyme activity and abrogates the effects of CTZ. F2,6BP increased the enzyme activity by 30% and attenuated the enzyme inhibition to 25%, versus 50% for the control (Fig. 5A). The stimulatory effects of F2,6BP are more pronounced when the enzyme is inhibited by ATP (5, 6), which is not the case since the ATP concentration in this experiment is not inhibitory. Therefore, since these experiments were performed in the presence of 1 mM ATP, which is not inhibitory for the enzyme (5, 6), it is expected that ADP would be more effective than F2,6BP in activating the enzyme and, thus, in counteracting the inhibitory effects of CTZ. When these experiments were performed in the presence of citrate, which

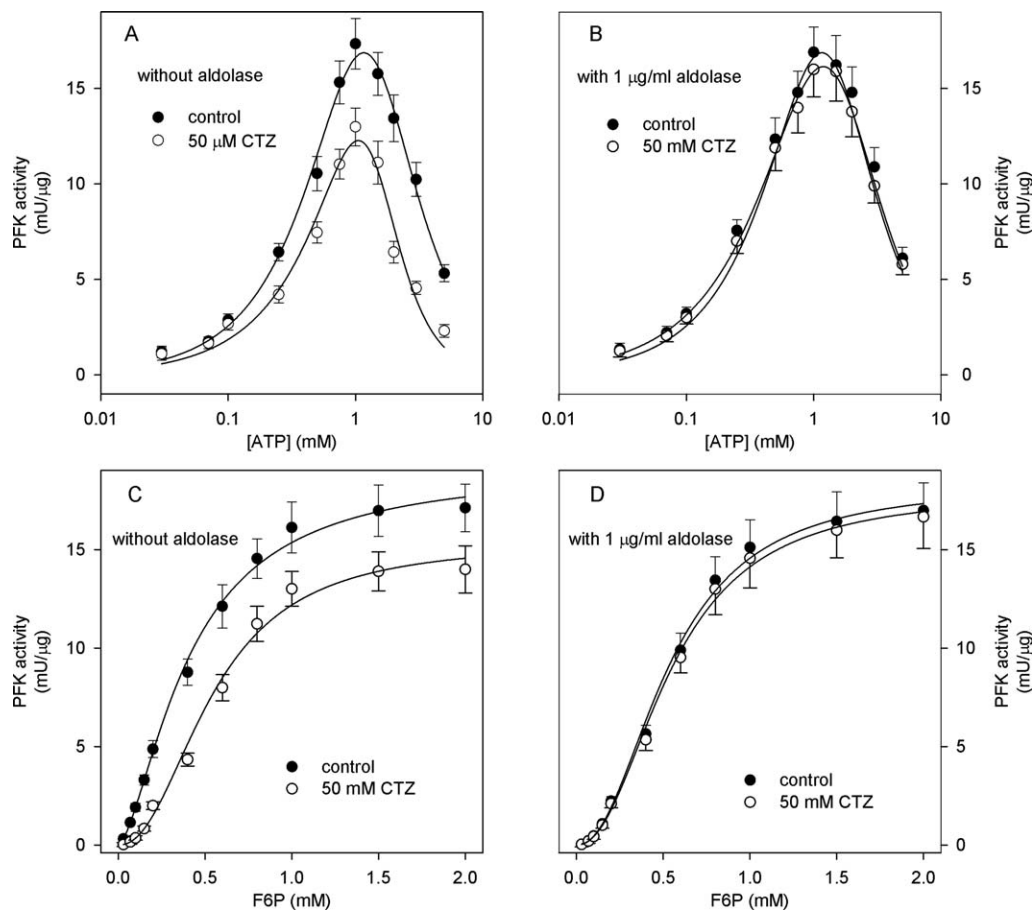


Figure 4. Effects of aldolase and CTZ on the modulation of PFK by its substrates. PFK activity was assessed as described under Materials and Methods in the absence and in the presence of 50 μM CTZ, as indicated. Panels A and D are, respectively, the ATP and F6P curves assayed in the absence of aldolase. Panels B and D are, respectively, the ATP and F6P curves assayed in the presence of 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aldolase. Plotted values as mean \pm standard error of four independent experiments. Solid lines are the results of the adjust of Eq. (5) (panels A and C) and Eq. (6) (panels B and D) to the experimental plotted data.

Table 1
Kinetic parameters for PFK modulation by its substrates

		Control	50 μM CTZ	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aldolase	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aldolase + 50 μM CTZ
ATP	$K_{0.5}$ (mM)	0.31 ± 0.03	0.79 ± 0.06^a	0.75 ± 0.05^a	0.75 ± 0.07
	n_s	1.1 ± 0.2	2.0 ± 0.3^a	1.8 ± 0.2^a	1.9 ± 0.3
	$V_{\text{max,app}}$ (mU/ μg)	15.2 ± 1.7	11.6 ± 1.3^a	15.8 ± 1.6	15.8 ± 1.5
	$I_{0.5}$ (mM)	3.2 ± 0.3	1.5 ± 0.2^a	2.9 ± 0.3	3.0 ± 0.3
	n_i	1.7 ± 0.2	1.2 ± 0.2	1.5 ± 0.2	1.6 ± 0.2
F6P	V_{max} (mU/ μg)	16.6 ± 1.4	12.2 ± 1.3^a	16.5 ± 1.6	16.4 ± 1.6
	$K_{0.5}$ (mM)	0.30 ± 0.03	0.49 ± 0.03^a	0.50 ± 0.04^a	0.51 ± 0.05
	n	1.1 ± 0.1	2.2 ± 0.2^a	1.7 ± 0.3^a	1.7 ± 0.2

The parameters were calculated as described under “Materials and Methods” section, using Eq. (5) to calculate the parameter for ATP curve and equation (6) for F6P curve.

^a $P < 0.05$ compared to control (Student’s t -test).

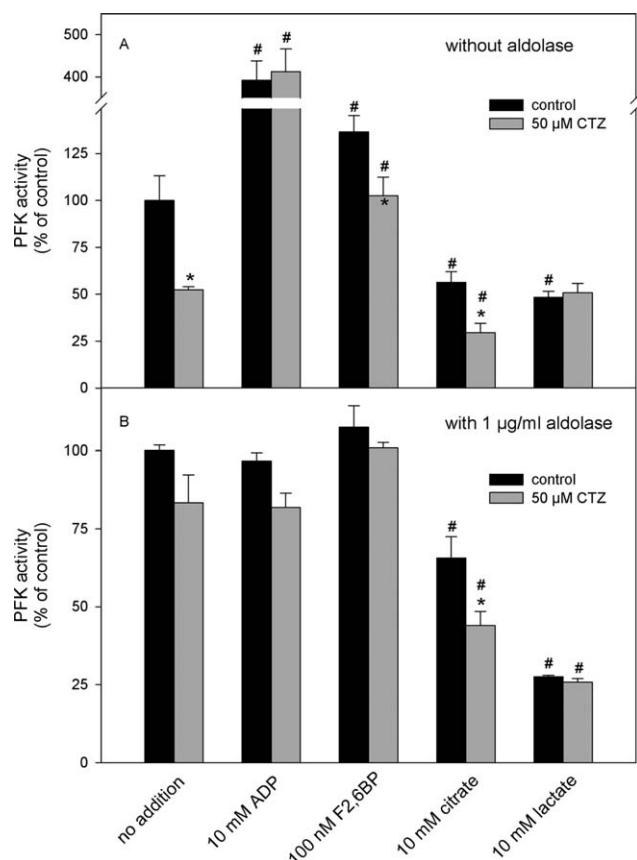


Figure 5. Influence of allosteric modulators of PFK on CTZ-induced inhibition of PFK in the absence and presence of aldolase. PFK activity was assessed as described under “Materials and Methods” in the absence and in the presence of 50 µM CTZ, as indicated. The allosteric modulators of PFK were added at the concentrations indicated on the abscissa, in the absence (Panel A) and in the presence of 1 µg/mL aldolase (Panel B). Bars are mean \pm standard errors of, at least, four independent experiments ($n = 4$). * $P < 0.05$ comparing with control experiments in the absence of CTZ (Student’s t -test). # $P < 0.05$ comparing with the respective bar where no allosteric modulator was added (“no addition”; Student’s t -test).

inhibits the enzyme, favoring the formation of dimers (4), the effects of CTZ were enhanced, suggesting an additive effect (Fig. 5A). On the other hand, lactate was not able to reinforce the inhibitory effects of CTZ, despite the fact that both CTZ and lactate inhibit the enzyme by stabilizing the dimeric conformation (4, 8, 23, 29). Curiously, 10 mM lactate alone resulted in $52\% \pm 3\%$ inhibition of PFK activity, which was equivalent to the effects of 50 µM CTZ ($48\% \pm 2\%$) or lactate and CTZ together ($51\% \pm 5\%$). Two hypotheses may explain this phenomenon: a) lactate and CTZ bind to the same site at the enzyme; or b) the binding of one blocks the effect of the other.

In the presence of 1 µg/mL aldolase (a molar ratio of 1:2 PFK:aldolase), the above pattern changes. ADP and F2,6BP did

not activate PFK (Fig. 5B), and CTZ did not cause the typical inhibitory effects in the presence of the two PFK activators (Fig. 5B). These results can be explained by the formation of active PFK dimers in the presence of aldolase. Since ADP and F2,6BP activate PFK, favoring the formation of tetramers, their effects were not seen when active PFK dimers were stabilized by aldolase. In a reciprocal way, since these dimers were active, CTZ was not able to inhibit the enzyme because the drug promotes the dissociation of the active tetramers into inactive dimers. In conclusion, ADP, F2,6BP and CTZ did not interfere with the formation of active PFK dimers induced by aldolase. On the other hand, the presence of aldolase did not prevent PFK inhibition by citrate or lactate (Fig. 5B). The inhibitory effects of citrate occur to the same extent in the absence or in the presence of aldolase. However, lactate is a more effective inhibitor of PFK in the presence of aldolase than in its absence (Fig. 5). Moreover, in the presence of aldolase, citrate enhanced the inhibitory effects of CTZ on PFK, while in the presence of lactate, there was no additional effect of CTZ on PFK inhibition (Fig. 5B), mirroring the results observed in the absence of aldolase (Fig. 5A). In the presence of aldolase, the inhibitory effects of 10 mM lactate were more pronounced than in the absence of the enzyme (50% vs. 75% inhibition in the absence vs. presence of aldolase, respectively). The fact that the presence of aldolase did not interfere with the inhibition promoted by citrate but accentuated the inhibitory action of lactate suggests that these inhibitors have different mechanisms. It is well demonstrated that both lactate and citrate stabilize the dimeric conformation of PFK (4, 8), as does aldolase (10). Therefore, a possible explanation for the fact that aldolase potentiates the inhibitory effects of lactate but not of citrate is that lactate binds preferentially to PFK dimers. Because PFK dimers are already formed in the presence of aldolase, lactate would bind more easily and thus be more effective. Moreover, these results answer the question raised above concerning the lack of additive effects for lactate and CTZ; we can infer that the binding of lactate to PFK blocks the effects of CTZ.

PFK Stimulates Aldolase Activity

CTZ has also been shown to affect the activities of other glycolytic enzymes, such as hexokinase (26, 35) and aldolase (20). Therefore, we decided to evaluate the effects of CTZ on aldolase activity in the absence and the presence of PFK. CTZ results in the dose-dependent inhibition of aldolase in the absence and in the presence of PFK (Fig. 6A). Surprisingly, the presence of 1 µg/mL PFK in the reaction medium resulted in a twofold stimulation of aldolase activity, which persisted in the presence of all concentrations of CTZ tested (Fig. 6A). To our knowledge, this is the first time that stimulation of aldolase activity by PFK has been reported. Despite stimulating aldolase activity, PFK is not able to prevent CTZ-induced inhibition of aldolase. The effects of CTZ on aldolase reached a maximal inhibition of $98\% \pm 2\%$ and followed a parallel pattern under

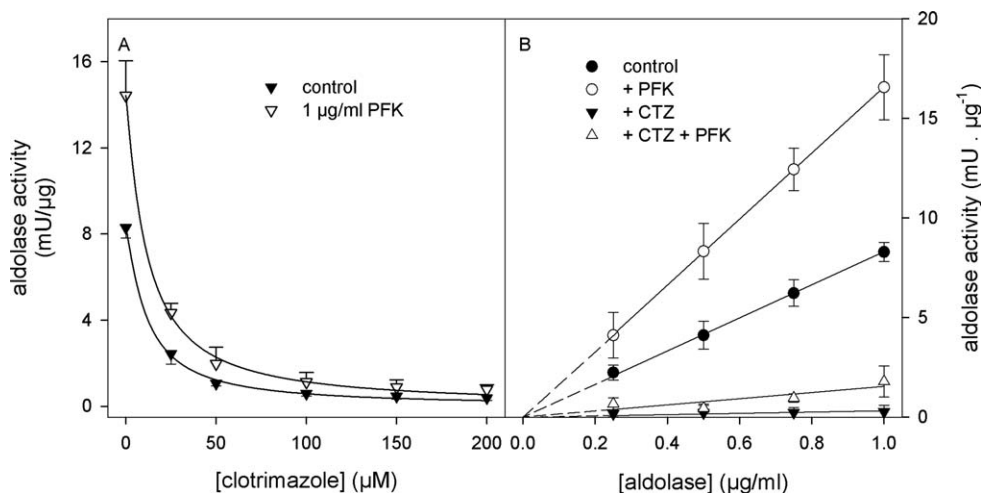


Figure 6. Effects of CTZ on aldolase activity in the absence and presence of PFK. Aldolase activity was assessed in the absence and in the presence of 1 µg/mL PFK, as described in the “Materials and Methods” section. Panel A: Dose-response curve of CTZ effects on aldolase activity in the absence (control, filled triangles) and in the presence of 1 µg/mL PFK (empty triangles). Solid lines were obtained by fitting Eq. (2) to the experimental data. Panel B: aldolase activity assessed using the concentrations of aldolase indicated on the abscissa. The experiments were performed with no further additions (control, filled circles), in the presence of 1 µg/mL PFK (empty circles), in the presence of 50 µM CTZ (filled triangles) and in the presence of 1 µg/mL PFK and 50 µM CTZ (empty triangles). Solid lines are the result of the linear regression of the plotted data, and dashed lines are the extrapolation of the linear regression results. All plotted data are mean ± standard errors of at least four independent experiments ($n = 4$).

both conditions, presenting $I_{0.5}$ values of 11 ± 1 µM and 10 ± 1 µM in the absence and presence of PFK, respectively. These values are not statistically different, suggesting that the presence of PFK does not affect the inhibition of aldolase by CTZ. The inhibitory effects of CTZ on aldolase activity were not influenced by the concentration of the enzyme in the reaction medium (Fig. 6B, cf. filled circles with filled triangles for control and for the presence of 50 µM CTZ, respectively). The presence of the drug resulted in ~95% inhibition of aldolase activity in the absence and in the presence of PFK for all concentrations of aldolase tested (Fig. 6B). However, comparing the effects of CTZ on aldolase activity in the absence and the presence of PFK, it is clear that in the latter condition aldolase activity was doubled when compared to the former (Fig. 6B, cf. filled triangles and empty triangles for the absence and the presence of PFK, respectively).

To evaluate the activator property of PFK on aldolase, we assessed the aldolase activity in the presence of increasing concentrations of PFK. Aldolase activity increased with increasing concentrations of PFK in a dose-dependent manner (Fig. 7), reaching a maximal activation of $95\% \pm 8\%$ and an activation constant (K_a) of 0.45 ± 0.03 µg/mL (~5.3 nM for PFK monomers). These parameters, obtained in the presence of 50 µM CTZ, are not statistically different from the control ($93\% \pm 9\%$ activation and $K_a = 0.48 \pm 0.05$ µg/mL; $P > 0.05$, Student’s t -test). The maximal activation of aldolase by PFK was reached in the presence of 1 µg/mL PFK (Fig. 7), representing a molar ratio of 2:1 (aldolase:PFK, based on the monomers of both enzymes).

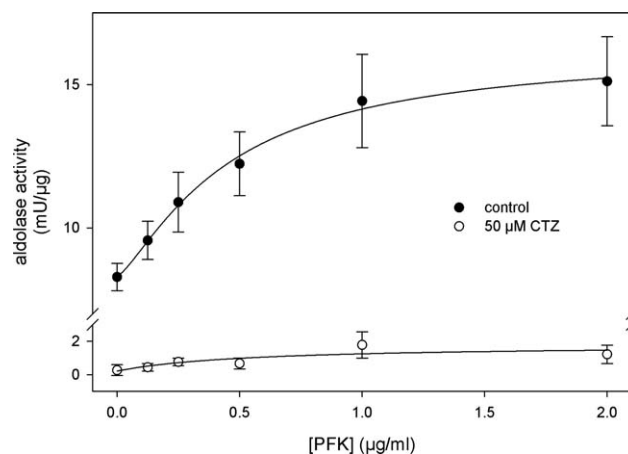


Figure 7. Effects of PFK on aldolase activity in the absence and presence of 50 µM CTZ. Aldolase activity in the presence of 1 µg/mL aldolase and the concentrations of PFK indicated on the abscissa was assessed as described in the “Materials and Methods” section. Experiments were performed in the absence (filled circles) and in the presence of 50 µM CTZ (empty circles). Plotted values are mean ± standard errors of at least four independent experiments ($n = 4$). Solid lines were obtained fitting Eq. (7) to the plotted data.

The kinetic parameters for the modulation of aldolase by its substrate F1,6BP were evaluated in the absence and in the presence of CTZ and PFK. CTZ inhibited aldolase in the presence

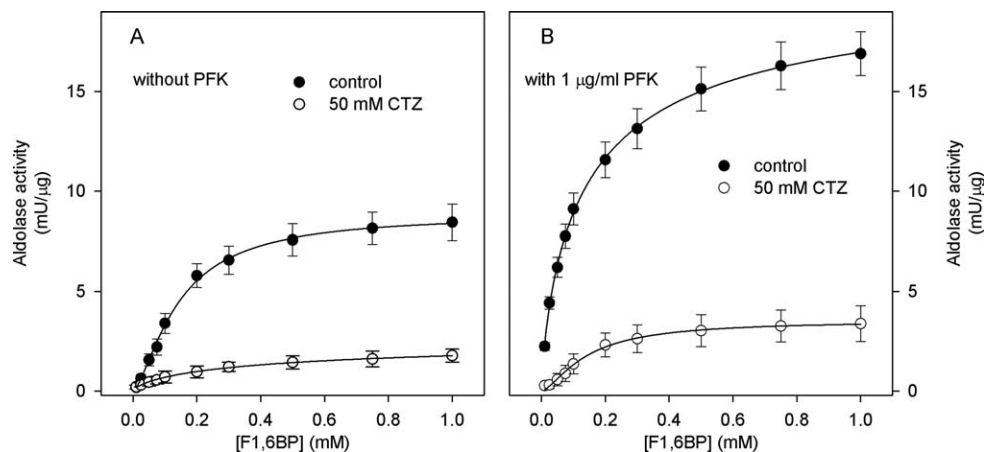


Figure 8. Effects of PFK and CTZ on the modulation of aldolase by its substrate. Aldolase activity was assessed as described under Materials and Methods in the absence and in the presence of 50 μM CTZ, as indicated. Panels A: control experiments in the absence of PFK. Panels B: aldolase activity in the presence of 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PFK. Plotted values as mean \pm standard error of four independent experiments. Solid lines are the results of the adjust of Eq. (6) to the experimental plotted data.

Table 2
Kinetic parameters for aldolase modulation by F1,6BP

	Control	50 μM CTZ	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PFK	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PFK + 50 μM CTZ
V_{max} (mU/ μg)	8.7 ± 0.9	$1.6 \pm 0.2^{\text{a}}$	$17.9 \pm 1.8^{\text{a}}$	$4.1 \pm 0.5^{\text{b,c}}$
$K_{0.5}$ (μM)	68.1 ± 4.2	$103.4 \pm 9.7^{\text{a}}$	$34.1 \pm 3.8^{\text{a}}$	$89.1 \pm 3.9^{\text{b,c}}$
n	1.4 ± 0.2	$2.0 \pm 0.2^{\text{a}}$	$0.9 \pm 0.3^{\text{a}}$	$2.1 \pm 0.2^{\text{b,c}}$

The parameters were calculated as described under “Materials and Methods” section.

^a $P < 0.05$ compared to control (Student’s t -test).

^b $P < 0.05$ compared to 50 μM CTZ.

^c $P < 0.05$ compared to 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aldolase.

of all concentrations of F1,6BP tested, in the absence and in the presence of PFK (Fig. 8). This effect resulted in a decrease of the enzyme maximal velocity and affinity for its substrate (Table 2). On the other hand, PFK promoted an increase in both the aldolase maximal velocity and the affinity of F1,6BP. Taking another point of view, the effects of CTZ on aldolase in the presence of PFK are attenuated, when compared to the effects of the drug in the absence of the kinase (Table 2). These results do not suggest that PFK protects aldolase against CTZ inhibition, but clearly demonstrate that the interaction between the two enzymes upregulates aldolase increasing both, its maximal velocity and its affinity for the substrate.

DISCUSSION

CTZ has been described as a potential antineoplastic drug (20, 23, 27, 28, 37, 38). Its antineoplastic properties are associated with its ability to decrease glucose consumption and energy metabolism in tumor cells (27, 28). There are several proposed targets for the action of CTZ on cell metabolism, and many of these proposed targets are involved in the glycolytic

pathway (38, 39). We have previously demonstrated that this drug decreases the viability of breast cancer cells by inhibiting the glycolytic pathway (20) and that this inhibition is probably due to a direct effect of CTZ on PFK (23, 29). The data presented here add novel information concerning the ability of CTZ to affect glycolytic enzymes and, therefore, cancer cell metabolism. It appears that aldolase is able to prevent the inhibitory effect of CTZ on the major glycolytic regulatory enzyme, PFK. However, CTZ inhibits aldolase to a greater degree (98% inhibition for aldolase vs. 70% for PFK) and more efficiently ($I_{0.5} = 11 \pm 1 \mu\text{M}$ and $28 \pm 2 \mu\text{M}$ for aldolase and PFK, respectively). This means that, despite the protection against CTZ-induced PFK inhibition promoted by aldolase, CTZ still decreases the glycolytic flux through inhibition of the aldolase itself, the next enzyme in the pathway following PFK.

The protection against the inhibitory effects of CTZ on PFK promoted by aldolase would be expected. Because CTZ induces the dissociation of active PFK tetramers into inactive dimers (23, 29), aldolase, which binds to PFK dimers and renders them active (10), should counteract the effects of CTZ on PFK. However, another inhibitory modulator of PFK, citrate, disrupts the

protection conferred by aldolase against CTZ-induced inhibition of PFK. In the presence of citrate, CTZ is a more effective inhibitor of PFK than in the absence of the metabolite. In tumor cells, cytosolic citrate levels are elevated because of the need for fatty acid and cholesterol biosynthesis (40). Thus, CTZ might inhibit PFK in these cells due to the high levels of citrate.

An intriguing finding in the present work is the stimulatory property of PFK over aldolase. The ability of these enzymes to associate generating diverse heterooligomeric structures has been reported (10). However, the ability of PFK to increase aldolase activity has not been hitherto published. The fact that PFK augments the affinity of aldolase for its substrate strongly supports the hypothesis that the kinase, once associated to aldolase, stimulates its activity. This is an evidence for the channeling of the glycolytic metabolism, as have been previously proposed (13–15). Actually, this is not a classical channeling since PFK-bound aldolase is able to bind F1,6BP directly from the medium and not necessarily those formed by PFK catalysis. Nonetheless, the association of PFK and aldolase confers a catalytical advantage for both enzymes, stabilizing the active dimeric conformation of the former and stimulating the later.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Programa de Núcleos de Excelência (PRONEX), and Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERENCES

- Sola-Penna, M., Da Silva, D., Coelho, W. S., Marinho-Carvalho, M. M., and Zancan, P. (2010) Regulation of mammalian muscle type 6-phosphofructo-1-kinase and its implication for the control of the metabolism. *IUBMB Life* **62**, 791–796.
- Hesterberg, L. K. and Lee, J. C. (1980) Sedimentation study of a catalytically active form of rabbit muscle phosphofructokinase at pH 8.55. *Biochemistry* **19**, 2030–2039.
- Hesterberg, L. K., Lee, J. C., and Erickson, H. P. (1981) Structural properties of an active form of rabbit muscle phosphofructokinase. *J. Biol. Chem.* **256**, 9724–9730.
- Marinho-Carvalho, M. M., Costa-Mattos, P. V., Spitz, G. A., Zancan, P., and Sola-Penna, M. (2009) Calmodulin upregulates skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase reversing the inhibitory effects of allosteric modulators. *Biochim. Biophys. Acta.* **1794**, 1175–1180.
- Zancan, P., Almeida, F. V., Faber-Barata, J., Dellias, J. M., and Sola-Penna, M. (2007) Fructose-2,6-bisphosphate counteracts guanidinium chloride-, thermal-, and ATP-induced dissociation of skeletal muscle key glycolytic enzyme 6-phosphofructo-1-kinase: a structural mechanism for PFK allosteric regulation. *Arch. Biochem. Biophys.* **467**, 275–282.
- Zancan, P., Marinho-Carvalho, M. M., Faber-Barata, J., Dellias, J. M., and Sola-Penna, M. (2008) ATP and fructose-2,6-bisphosphate regulate skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase by altering its quaternary structure. *IUBMB Life* **60**, 526–533.
- Hesterberg, L. K. and Lee, J. C. (1982) Self-association of rabbit muscle phosphofructokinase: effects of ligands. *Biochemistry* **21**, 216–222.
- Leite, T. C., Da Silva, D., Coelho, R. G., Zancan, P., and Sola-Penna, M. (2007) Lactate favours the dissociation of skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase tetramers down-regulating the enzyme and muscle glycolysis. *Biochem. J.* **408**, 123–130.
- Vertessy, B. G., Orosz, F., Kovacs, J., and Ovadi, J. (1997) Alternative binding of two sequential glycolytic enzymes to microtubules. Molecular studies in the phosphofructokinase/aldolase/microtubule system. *J. Biol. Chem.* **272**, 25542–25546.
- Rais, B., Ortega, F., Puigjaner, J., Comin, B., Orosz, F., Ovadi, J., and Cascante, M. (2000) Quantitative characterization of homo- and hetero-associations of muscle phosphofructokinase with aldolase. *Biochim. Biophys. Acta.* **1479**, 303–314.
- Marinho-Carvalho, M. M., Zancan, P., and Sola-Penna, M. (2006) Modulation of 6-phosphofructo-1-kinase oligomeric equilibrium by calmodulin: formation of active dimers. *Mol. Genet. Metab.* **87**, 253–261.
- Masters, C. (1984) Interactions between glycolytic enzymes and components of the cytomatrix. *J. Cell Biol.* **99**, 222s–225s.
- Srere, P. A. (1987) Complexes of sequential metabolic enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 89–124.
- Srere, P. A., and Ovadi, J. (1990) Enzyme-enzyme interactions and their metabolic role. *FEBS Lett.* **268**, 360–364.
- Srere, P. (1994) Complexities of metabolic regulation. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 519–520.
- Alves, G. G. and Sola-Penna, M. (2003) Epinephrine modulates cellular distribution of muscle phosphofructokinase. *Mol. Genet. Metab.* **78**, 302–306.
- Coelho, W. S., Costa, K. C., and Sola-Penna, M. (2007) Serotonin stimulates mouse skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase through tyrosine-phosphorylation of the enzyme altering its intracellular localization. *Mol. Genet. Metab.* **92**, 364–370.
- Da Silva, D., Zancan, P., Coelho, W. S., Gomez, L. S., and Sola-Penna, M. (2010) Metformin reverses hexokinase and 6-phosphofructo-1-kinase inhibition in skeletal muscle, liver and adipose tissues from streptozotocin-induced diabetic mouse. *Arch. Biochem. Biophys.* **496**, 53–60.
- El-Bacha, T., de Freitas, M. S., and Sola-Penna, M. (2003) Cellular distribution of phosphofructokinase activity and implications to metabolic regulation in human breast cancer. *Mol. Genet. Metab.* **79**, 294–299.
- Meira, D. D., Marinho-Carvalho, M. M., Teixeira, C. A., Veiga, V. F., Da Poian, A. T., Holandino, C., de Freitas, M. S., and Sola-Penna, M. (2005) Clotrimazole decreases human breast cancer cells viability through alterations in cytoskeleton-associated glycolytic enzymes. *Mol. Genet. Metab.* **84**, 354–362.
- Real-Hohn, A., Zancan, P., Da Silva, D., Martins, E. R., Salgado, L. T., Mermelstein, C. S., Gomes, A. M., and Sola-Penna, M. (2010) Filamentous actin and its associated binding proteins are the stimulatory site for 6-phosphofructo-1-kinase association within the membrane of human erythrocytes. *Biochimie* **92**, 538–544.
- Spitz, G.A., Furtado, C. M., Sola-Penna, M., and Zancan, P. (2009) Acetylsalicylic acid and salicylic acid decrease tumor cell viability and glucose metabolism modulating 6-phosphofructo-1-kinase structure and activity. *Biochem. Pharmacol.* **77**, 46–53.
- Zancan, P., Rosas, A. O., Marcondes, M. C., Marinho-Carvalho, M. M., and Sola-Penna, M. (2007) Clotrimazole inhibits and modulates heterologous association of the key glycolytic enzyme 6-phosphofructo-1-kinase. *Biochem. Pharmacol.* **73**, 1520–1527.
- Zancan, P., Sola-Penna, M., Furtado, C. M., and Da Silva, D. (2010) Differential expression of phosphofructokinase-1 isoforms correlates with the glycolytic efficiency of breast cancer cells. *Mol. Genet. Metab.* **100**, 372–378.
- Gatenby, R. A. and Gillies, R. J. (2004) Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat. Rev. Cancer* **4**, 891–899.

26. Penso, J. and Beitner, R. (1998) Clotrimazole and bifonazole detach hexokinase from mitochondria of melanoma cells. *Eur. J. Pharmacol.* **342**, 113–117.
27. Penso, J. and Beitner, R. (2002) Detachment of glycolytic enzymes from cytoskeleton of Lewis lung carcinoma and colon adenocarcinoma cells induced by clotrimazole and its correlation to cell viability and morphology. *Mol. Genet. Metab.* **76**, 181–188.
28. Penso, J. and Beitner, R. (2002) Clotrimazole decreases glycolysis and the viability of lung carcinoma and colon adenocarcinoma cells. *Eur. J. Pharmacol.* **451**, 227–235.
29. Marcondes, M. C., Sola-Penna, M., and Zancan, P. (2010) Clotrimazole potentiates the inhibitory effects of ATP on the key glycolytic enzyme 6-phosphofructo-1-kinase. *Arch. Biochem. Biophys.* **497**, 62–67.
30. Maia, J. C. C., Gomes, S. L., Juliani, M. H., and Morel, C. M. (1983) Preparation of [γ -³²P] and [α -³²P]-nucleoside triphosphate, with high specific activity. In: *Genes and Antigens of Parasites: a Laboratory Manual* (Morel, C. M., ed.), Vol. 1. pp. 146–157, Fiocruz, Brazil.
31. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275.
32. Sola-Penna, M., dos Santos, A. C., Alves, G. G., El-Bacha, T., Faber-Barata, J., Pereira, M. F., Serejo, F. C., Da Poian, A. T., and Sorenson, M. (2002) A radioassay for phosphofructokinase-1 activity in cell extracts and purified enzyme. *J. Biochem. Biophys. Methods* **50**, 129–140.
33. Zancan, P. and Sola-Penna, M. (2005) Calcium influx: a possible role for insulin modulation of intracellular distribution and activity of 6-phosphofructo-1-kinase in human erythrocytes. *Mol. Genet. Metab.* **86**, 392–400.
34. Zancan, P. and Sola-Penna, M. (2005) Regulation of human erythrocyte metabolism by insulin: cellular distribution of 6-phosphofructo-1-kinase and its implication for red blood cell function. *Mol. Genet. Metab.* **86**, 401–411.
35. Leite, T. C., Coelho, R. G., Silva, D. D., Coelho, W. S., Marinho-Carvalho, M. M., and Sola-Penna, M. (2011) Lactate downregulates the glycolytic enzymes hexokinase and phosphofructokinase in diverse tissues from mice. *FEBS Lett.* **585**, 92–98.
36. Faber-Barata, J. and Sola-Penna, M. (2005) Opposing effects of two osmolytes—trehalose and glycerol—on thermal inactivation of rabbit muscle 6-phosphofructo-1-kinase. *Mol. Cell Biochem.* **269**, 203–207.
37. Khalid, M. H., Tokunaga, Y., Caputy, A. J., and Walters, E. (2005) Inhibition of tumor growth and prolonged survival of rats with intracranial gliomas following administration of clotrimazole. *J. Neurosurg.* **103**, 79–86.
38. Rodríguez-Enríquez, S., Marín-Hernández, A., Gallardo-Pérez, J. C., Carretero-Fuentes, L., and Moreno-Sánchez, R. (2009) Targeting of cancer energy metabolism. *Mol. Nutr. Food Res.* **53**, 29–48.
39. Moreno-Sanchez, R., Rodríguez-Enriquez, S., Marín-Hernández, A., and Saavedra, E. (2007) Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J.* **274**, 1393–1418.
40. Costello, L. C. and Franklin, R. B. (2005) ‘Why do tumour cells glycolyse?’: from glycolysis through citrate to lipogenesis. *Mol. Cell. Biochem.* **280**, 1–8.

Clotrimazole Preferentially Inhibits Human Breast Cancer Cell Proliferation, Viability and Glycolysis

Cristiane M. Furtado¹, Mariah C. Marcondes¹, Mauro Sola-Penna², Maisa L. S. de Souza³, Patricia Zancan^{1*}

1 Laboratório de Oncobiologia Molecular (LabOMol), Departamento de Fármacos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **2** Laboratório de Enzimologia e Controle do Metabolismo (LabECOM), Departamento de Fármacos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **3** Instituto Federal do Rio de Janeiro (IFRJ), Unidade Nilópolis, Nilópolis, Rio de Janeiro, Brazil

Abstract

Background: Clotrimazole is an azole derivative with promising anti-cancer effects. This drug interferes with the activity of glycolytic enzymes altering their cellular distribution and inhibiting their activities. The aim of the present study was to analyze the effects of clotrimazole on the growth pattern of breast cancer cells correlating with their metabolic profiles.

Methodology/Principal Findings: Three cell lines derived from human breast tissue (MCF10A, MCF-7 and MDA-MB-231) that present increasingly aggressive profiles were used. Clotrimazole induces a dose-dependent decrease in glucose uptake in all three cell lines, with K_i values of 114.3 ± 11.7 , 77.1 ± 7.8 and 37.8 ± 4.2 μM for MCF10A, MCF-7 and MDA-MB-231, respectively. Furthermore, the drug also decreases intracellular ATP content and inhibits the major glycolytic enzymes, hexokinase, phosphofructokinase-1 and pyruvate kinase, especially in the highly metastatic cell line, MDA-MB-231. In this last cell lineage, clotrimazole attenuates the robust migratory response, an effect that is progressively attenuated in MCF-7 and MCF10A, respectively. Moreover, clotrimazole reduces the viability of breast cancer cells, which is more pronounced on MDA-MB-231.

Conclusions/Significance: Clotrimazole presents deleterious effects on two human breast cancer cell lines metabolism, growth and migration, where the most aggressive cell line is more affected by the drug. Moreover, clotrimazole presents little or no effect on a non-tumor human breast cell line. These results suggest, at least for these three cell lines studied, that the more aggressive the cell is the more effective clotrimazole is.

Citation: Furtado CM, Marcondes MC, Sola-Penna M, de Souza MLS, Zancan P (2012) Clotrimazole Preferentially Inhibits Human Breast Cancer Cell Proliferation, Viability and Glycolysis. PLoS ONE 7(2): e30462. doi:10.1371/journal.pone.0030462

Editor: Andrei L. Gartel, University of Illinois at Chicago, United States of America

Received: June 28, 2011; **Accepted:** December 20, 2011; **Published:** February 8, 2012

Copyright: © 2012 Furtado et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: 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). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: pzancan@ufrj.br

Introduction

Among the physiological hallmarks of cancer, altered glucose metabolism is perhaps the most common. The Warburg effect has been observed in approximately 90% of human tumors and the biochemical origins of this phenomenon have been extensively studied [1–4]. Aerobic glycolysis may be required for new biomass formation [5]. In fact, proliferation of cancer cells is accompanied by activation of glycolysis [6], which occurs even at normal oxygen concentrations. Moreover, glycolysis may confer tumor cells with the ability to adapt to new microenvironments or cope with stress during tumor progression and metastasis [7].

Observations suggest that blocking glycolysis might diminish tumor progression and enhance the efficacy of chemo- and radiotherapy. However, inhibition of glycolytic enzymes is expected to have secondary effects on cell physiology, due to the additional functions of these proteins. Clotrimazole, an antifungal drug, has been successfully used to diminish the size and development of intracranial gliomas (C6 and 9L), prolonging survival in rodents [8]. Moreover, the drug also affects glycolytic

enzymes decreasing hexokinase (HK) binding to the outer mitochondrial membrane [9] and detaching phosphofructokinase-1 (PFK-1) and aldolase from the cytoskeleton [10–12]. Indeed, clotrimazole is able to trigger apoptosis, which is directly correlated with its ability to displace HK from mitochondria [9] and PFK-1 and aldolase from the cytoskeleton [12]. The location of these glycolytic enzymes within the intracellular milieu is an important feature of glycolysis regulation [13] and thus, altering the intracellular distribution of these enzymes, clotrimazole is probably affecting the glycolytic flux.

The aim of this study was to analyze the effects of the clotrimazole on viability, growth, mobility and glycolytic profile of three human breast cell lines: MCF10A, MCF-7 and MDA-MB-231. The MCF10A human mammary epithelial cell is a normal strain, while MCF-7 and MDA-MB-231 cells are human breast-derived cell lines with tumorigenic and metastatic profiles, respectively. Here we present evidences that clotrimazole presents more pronounced effects on the tumorigenic and metastatic cells, while presenting minimal effects over the non-tumoral cell strain.

Results

Clotrimazole inhibits the migratory phenotype in breast cancer cells

To assess the effects of clotrimazole on the growth profiles of breast cell lines, cellular migration and proliferation were evaluated. The migration potential of MCF10A, MCF-7 and MDA-MB-231 cells was initially assessed using the Transwell assay (Fig. 1A). Our results confirm that there is a significant difference between the migration potential of these cells, which increases with the aggressiveness of the cell (MCF10A < MCF-7 < MDA-MB-231). The presence of 50 μM clotrimazole inhibits migration of MCF-7 and MDA-MB-231 cells, but has no effect on MCF10A cells. Proportionally, the effects of clotrimazole were more pronounced on MDA-MB-231 migration (59 \pm 6% inhibition) than on MCF-7 (32 \pm 5% inhibition). Moreover, using the scratch assay, we compared cell mobility in the presence or absence of 50 μM clotrimazole (Fig. 1B and 1C). In accordance with the previous results, there is a significant difference between the migration rates of the cell lines assessed through this later technique. The evaluated migration increased approximately 1.5-fold and 2- to 3-fold for MCF-7 and MDA-MB-231 cells, respectively, when compared with control cells (black bars, Fig. 1B). Within 12 hours, the migration rate of the tumorigenic cells was significantly reduced by clotrimazole (grey bars, Fig. 1B). Clotrimazole inhibited mobility of MDA-MB-231 cells by 36 \pm 4%, of MCF-7 cells by 16 \pm 3%, but was unable to affect the MCF10A migration rate (Fig. 1B and 1C). These results suggest that clotrimazole prevents cell migration, which may contribute to the anti-metastatic potential of the drug.

To clarify that these results were not due to the effect of clotrimazole on the cell proliferation, we determined the incorporation of BrdU into DNA of synchronized proliferating breast cell lines in the absence or presence of different concentration of clotrimazole. Fig. 2A shows cell proliferation in the absence of clotrimazole after 24 h of BrdU incubation. MCF-7 and MDA-MB-231 cells display a 10- and 20-fold higher proliferation rate, respectively, when compared with the MCF10A cells. Treatment with clotrimazole (0–100 μM) inhibited the cell proliferation in all cell lines (Fig. 2B). Twenty-four hours after cell cycle reentry, which is initiated by adding fresh culture medium containing fetal serum, the percentage of proliferating cells was significantly decreased by clotrimazole. Surprisingly, 25 μM clotrimazole completely inhibited MCF10A proliferation (98 \pm 13% inhibition). However, this same concentration had no effect on tumoral cell lines. MCF-7 cells displayed a linear response to increasing clotrimazole concentrations, reaching 70% inhibition at 100 μM . Furthermore, clotrimazole also inhibited proliferation of MDA-MB-231 cells, but the maximum inhibition (50%) occurred at 50 μM and persisted even at the highest concentration tested (100 μM).

Clotrimazole diminishes glucose uptake and intracellular ATP

Proliferation in cancer cells is accompanied by activation of glycolysis [6], which occurs even in the presence of a normal oxygen concentration. This preferential use of glycolysis by cancer cells under aerobic conditions is known as the Warburg effect [14] and is characterized by high glycolytic rates in cancer cells with high rates of lactate production per glucose consumed. Our previous results have shown that breast cancer cells present a distinct glycolytic rate; the metastatic cell line (MDA-MB-231) showed lower consumption of glucose and higher production of lactate when compared to a non-tumorigenic cell line (MCF10A). Moreover, MCF-7 cells, which are tumorigenic and non-

metastatic, presented an intermediate glycolytic rate [15]. In order to evaluate the metabolic profiles of these breast cell lines after treatment with clotrimazole, we incubated the cells in 96 well plates with different concentrations of clotrimazole (0–100 μM) for 24 h. Clotrimazole reduces glucose uptake by the cells in a dose-dependent fashion (Fig. 3A). The inhibition constant (K_i) for glucose uptake inhibition by clotrimazole was calculated and found to be 114.3 \pm 11.7, 77.1 \pm 7.8 and 37.8 \pm 4.2 μM for MCF10A, MCF-7 and MDA-MB-231 cells, respectively (Fig. 3B). These results clearly demonstrate that clotrimazole has more pronounced effects on cells with the highest glycolytic rates and Warburg effect.

We also analyzed the mitochondrial reduction activity and the cellular ATP levels after the treatment with clotrimazole. Fig. 3C shows a dose-dependent reduction of the mitochondrial activity in these cells, with the maximum inhibition being approximately 60% for MDA-MB-231 cells treated with 100 μM clotrimazole. At that concentration, both MCF10A and MCF-7 cell lines demonstrate 40% lower mitochondrial activity than corresponding cells treated with 50 μM clotrimazole. Once more, the drug was more effective in the metastatic cell line than the non-tumoral cells in the same condition (Fig. 3C). Furthermore, we evaluated the effects of clotrimazole on the cellular ATP levels. Clotrimazole reduces the cellular ATP of tumorigenic cells in a dose-dependent manner (Fig. 3D). Interestingly, MCF10A cells are completely resistant to the presence of the drug. In fact, we observed 26% and 35% higher ATP content after the treatment with 50 and 75 μM clotrimazole, respectively. However, MCF-7 and MDA-MB-231 cells display a progressive dose-dependent inhibition curve reaching 95% reduction of the ATP content with 75 μM clotrimazole.

Glycolytic enzymes from tumorigenic cells are selectively inhibited by clotrimazole

The results above show that clotrimazole alters the rates of glucose uptake, mitochondrial activity and generation of ATP in the cell lines, with more pronounced effects on the cancerous cell lines than non-tumorigenic cells. Additionally, these effects probably are not due to a specific action of clotrimazole on mitochondrial activity because all the cell lines, regardless of their phenotype, are not responsive to clotrimazole up to 100 μM (Fig. 3C). Therefore, our next objective was to investigate whether the antineoplastic effects of clotrimazole occurs by its direct action on glycolysis. Therefore, we evaluated the effects of the drug on the three enzymes that regulate the glycolytic flux: hexokinase (HK), phosphofructokinase-1 (PFK-1) and pyruvate kinase (PK).

We evaluated HK activity in all breast cells using a 24 h incubation time with different concentrations of clotrimazole. Fig. 4A shows HK dose-dependent inhibition curves for MCF10A, MCF-7 and MDA-MB-231 cells, where clotrimazole has a more pronounced effect in tumoral cell lines compared to the non-tumoral cells. HK activity in MCF10A cells was inhibited by only 46% by clotrimazole, whereas, at the same concentration (100 μM clotrimazole), HK activity in MCF-7 and MDA-MB-231 cells was inhibited by 90% and 96%, respectively. To align our results with the data in the literature, we used the 3-bromopyruvate (3-BrPA), a well-known inhibitor of energy metabolism, which has been proposed as a specific anticancer agent due to its high tumor selectivity [16,17]. Surprisingly, 3-BrPA has different effects on these cell lines, showing a more pronounced inhibition of HK in the MCF10A cells (Table 1). This is an interesting result because, until now, both drugs (3-BrPA and clotrimazole) were thought to have the same mechanism of action in cancer cells: through the detachment of the mitochondria-associated HKII. Although this is

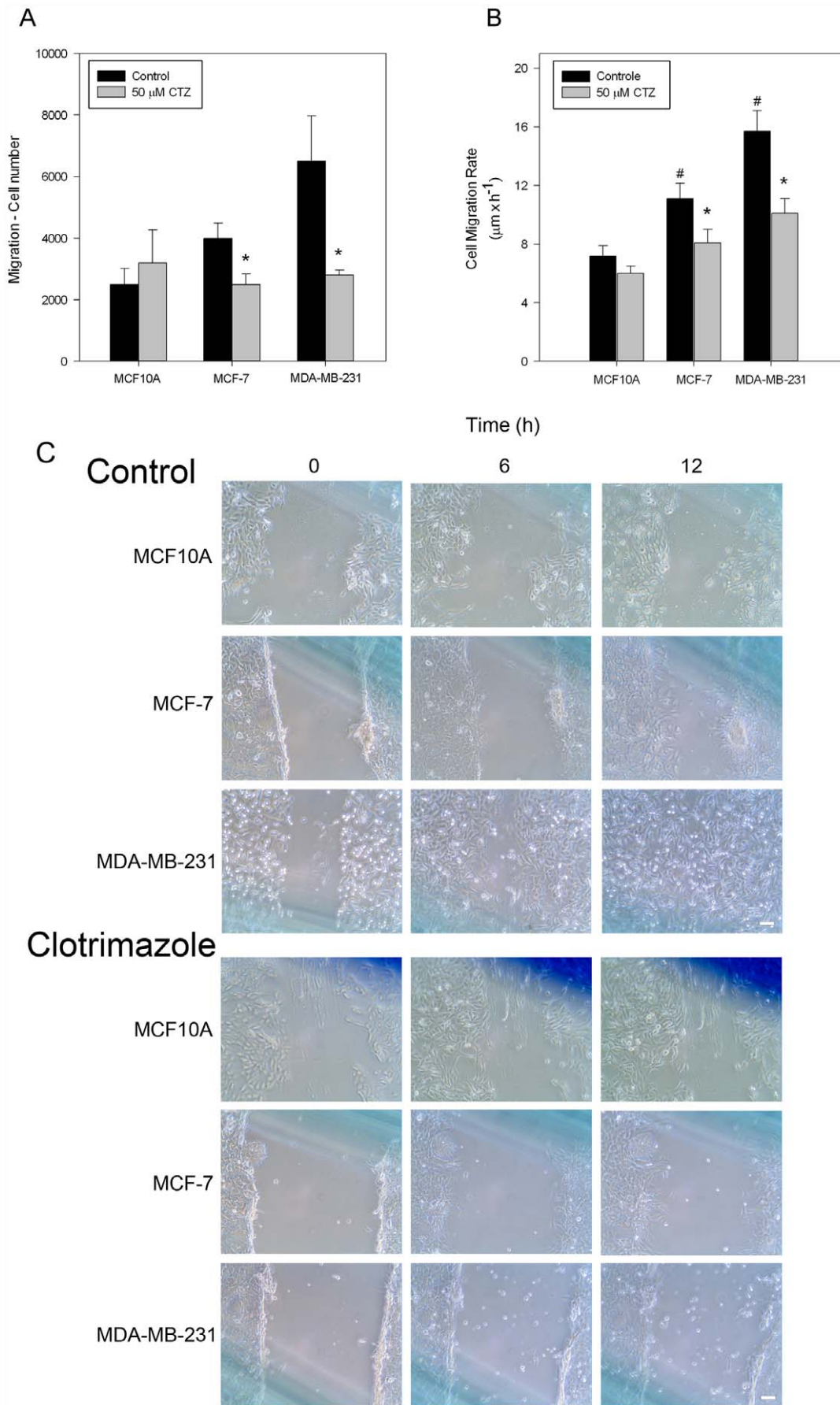


Figure 1. Clotrimazole inhibits the migration of breast cell lines. (A) The migration of MCF10A, MCF-7 and MDA-MB-231 cells was assessed by transwell assays after 24 h incubation in the absence or presence of 50 μM clotrimazole; (B) Cell migration rate was calculated from scratch assays. The images were analyzed and data were expressed in $\mu\text{m} \times \text{h}^{-1}$. (C) Scratch migration assay for control and 50 μM clotrimazole-treated cells. The filling of scratches by migrated cells at time 0, 6 and 12 h was imaged. MCF-7 and MDA-MB-231 cells have a more motile appearance and migrate faster than MCF10A. Bars are mean \pm SEM of three independent experiments. * $P < 0.05$ compared with control condition in the absence of the drug; # $P < 0.05$ compared with MCF10A cells.
doi:10.1371/journal.pone.0030462.g001

an important mechanism to cell survival, our results strongly suggest an additional mechanism of cell death induced by the direct inhibition of HK by clotrimazole (Fig. 4A, inset).

Meira and co-workers showed that clotrimazole inhibits phosphofructokinase-1 in MCF-7 cells [12]. To investigate this inhibition further, we analyzed the effects of clotrimazole on breast cell lines. Similar to what was observed for HK, clotrimazole inhibits PFK-1 activity in a dose-dependent manner (Fig. 4B). The effects of clotrimazole are dependent on the tumorigenic phenotype of the cell, as MCF10A cells are more resistant to the inhibition than MCF-7 and MDA-MB-231 cells. Once again, we observed 90–95% inhibition in tumorigenic cells and a less dramatic effect of clotrimazole on MCF10A cells.

We also evaluated the effects of clotrimazole on the last enzyme of glycolysis, pyruvate kinase (PK). Once more, clotrimazole progressively inhibited enzyme activity, with a substantial effect on MCF-7 and MDA-MB-231 cells (Fig. 4C). However, there was a more significant inhibition of PK in MCF10A cells when compared with the results for HK and PFK in this cell line. This result may be due to the effects of clotrimazole on previous steps of glycolysis or on glucose uptake in these cells.

After entering the cell, glucose is converted by HK to glucose 6-phosphate, which can be shunted to the pentose phosphate pathway (PPP). The increase in the PPP flux is directly associated with inhibition of the apoptosis. This is due to an increased generation of NADPH and, therefore, reduced glutathione, which also promotes the removal of reactive oxygen species (ROS) in cells [18]. To investigate the diversion of glucose 6-phosphate from glycolysis to PPP, we verified the activity of glucose 6-phosphate

dehydrogenase (G6PDH), which is the enzyme responsible for the first irreversible reaction of the PPP. Similar to the results observed for the glycolytic enzymes, clotrimazole inhibits the PPP (Fig. 4D). The inhibitory effect of clotrimazole is more pronounced in MCF-7 and MDA-MB-231 cells than in MCF10A cells. The complete inhibition of PPP was obtained with 75 μM clotrimazole for tumorigenic cell lines and 100 μM clotrimazole for the MCF10A cells.

Metabolic effects of clotrimazole induce the loss of viability

Finally, we investigated the consequences of the metabolism inhibition induced by clotrimazole on cell viability. Published data have shown that clotrimazole reduces the viability of MCF-7 cells, CT-26 colon adenocarcinoma cells and Lewis lung carcinoma [11,19], as well as B16 melanoma cells [10,20]. However, as most of our results demonstrate a cellular phenotype-dependent effect of clotrimazole, our objective was to evaluate whether cell viability also responds in a similar way. The cell viability was evaluated by the activity of lactate dehydrogenase (LDH) leaked to the medium and permeability of the cells to trypan blue dye. As shown in Fig. 5A, clotrimazole does not affect the leakage of LDH of MCF10A cells in any of the concentrations tested, even at 100 μM clotrimazole (data not shown), as compared to untreated controls. This result strongly suggests that the drug does not affect MCF-10A cells integrity. This picture changes when we analyze the effects of clotrimazole on LDH leakage from MCF-7 cells. Although 50 μM clotrimazole does not alter LDH leakage from these cells, 75 μM clotrimazole promotes a significant increase of

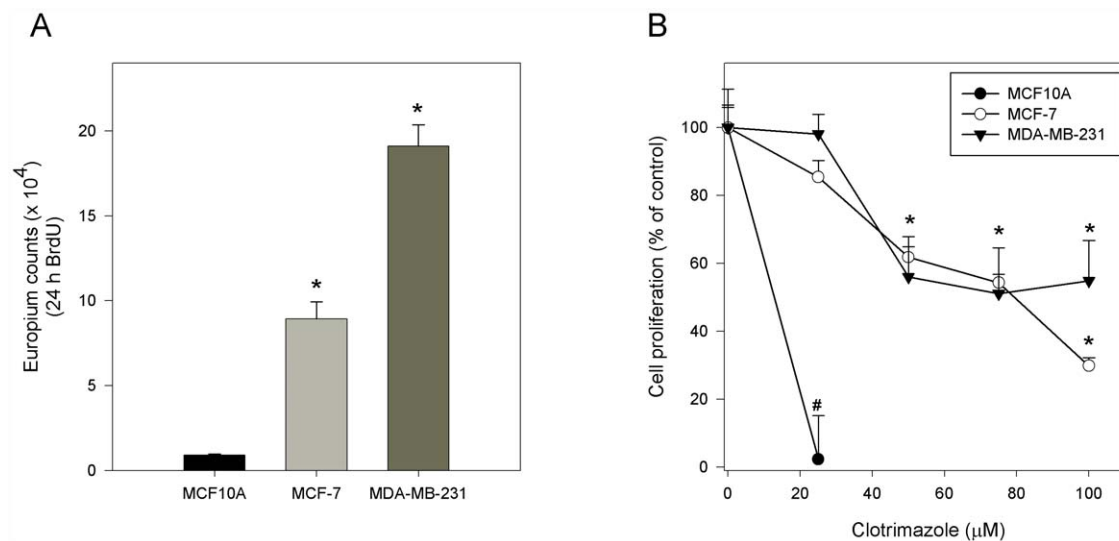


Figure 2. Clotrimazole decreases cell proliferation of MCF10A, MCF-7 and MDA-MB-231 cells. (A) Basal cell proliferation of human breast cell lines was analyzed using the BrdU incorporation assay. The graph shows the europium-based TRF cell proliferation assay. * $P < 0.05$, in comparison with MCF10A cell line. (B) Effects of clotrimazole on cell proliferation after 24 h treatment using BrdU incorporation assay. Values are mean \pm standard error (SE) of four different experiments. # $P < 0.05$, in comparison with the control; * $P < 0.05$, comparing 50, 75 and 100 μM clotrimazole with the control in the absence of the drug for both cell lines (MCF-7 and MDA-MB-231).
doi:10.1371/journal.pone.0030462.g002

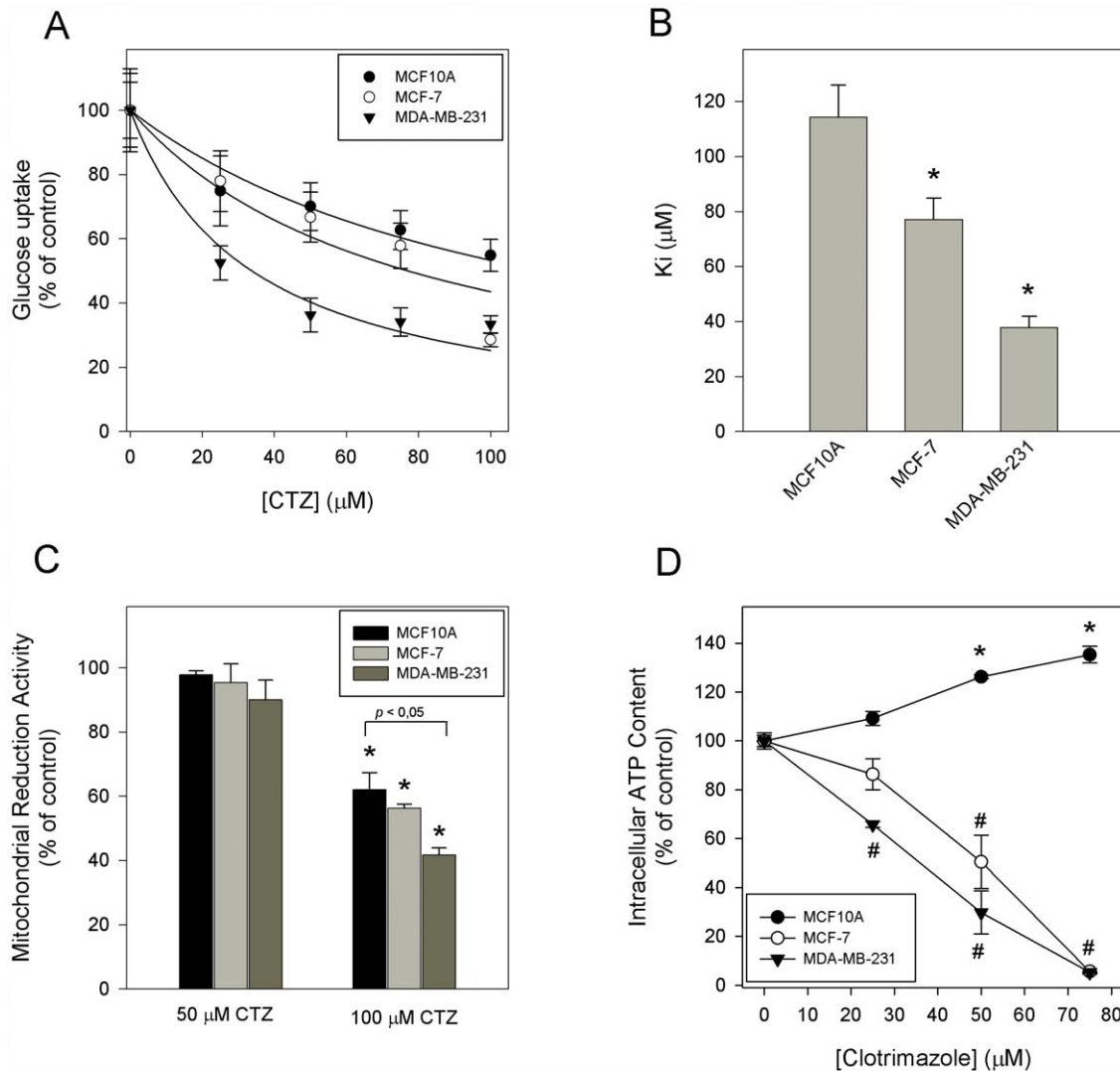


Figure 3. Effects of clotrimazole on glucose uptake, mitochondrial reduction activity and cellular ATP content in breast cell lines. (A) Comparison of glucose uptake in MCF10A, MCF-7 and MDA-MB-231 cells. Glucose uptake was determined after 15, 30 and 45 min incubation through cells incubation with 5 mM 6-NBDG, a fluorescent glucose analogue. The results obtained are plotted as percentage of control in a function of clotrimazole concentration. (B) Glucose uptake experimental data was fitted in an equation as described in Methods and the K_i values were plotted. Bars are mean \pm SEM of three independent experiments. * $P < 0.05$, comparing with MCF10A cells. (C) Percent of mitochondrial reduction activity, evaluated by MTT assay. All values were normalized to that of control condition in the absence of the drug. (D) Intracellular ATP content measured by relative firefly luciferase activity (PerkinElmer ATPLite Kit). Error bars represent standard errors from five independent experiments. * $P < 0.05$ compared to control for MCF10A cells. # $P < 0.05$, compared to control for MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines. doi:10.1371/journal.pone.0030462.g003

the leaked enzyme suggesting the loss of cell integrity and viability. On the other hand, MDA-MB-231 cells viability is more susceptible to clotrimazole effects, since this cell line presents increased LDH leakage upon the treatment with 50 μ M clotrimazole for 24 hours. Moreover, treatment of MDA-MB-231 cell with 75 μ M clotrimazole increases 3.5 times the leaked LDH suggesting that the viability of these cells is severely compromised upon this treatment. These data are confirmed analyzing the exclusion of trypan blue dye by the different cell lines treated with clotrimazole (Fig. 5B). These results corroborate that MCF10A cells integrity is not affected up to 100 μ M clotrimazole. Moreover, it is clear now that upon the treatment with clotrimazole the viability of MCF-7 and MDA-MB-231 cells decrease in a dose-responsive mode. Furthermore, MDA-MB-231 cells are more sensitive to 50 μ M clotrimazole and higher

concentrations, as compared to MCF-7 cells. Altogether, these data reinforce the preferential action of clotrimazole over the tumorigenic cell lines among those tested here, with an even more preferential effect over the most aggressive cell line.

Discussion

The use of metabolic pathways as useful molecular targets in tumors prompted us to investigate the effects of drugs that affect cell metabolism, especially glycolysis. In this paper, we report the metabolic and anti-metastatic effects of the imidazole derivative clotrimazole in breast cell lines. Our data reveal that clotrimazole has more pronounced effects on tumorigenic cell lines that present the Warburg effect [15]. There are, at least, three major possible explanations to the preferential effects of clotrimazole on

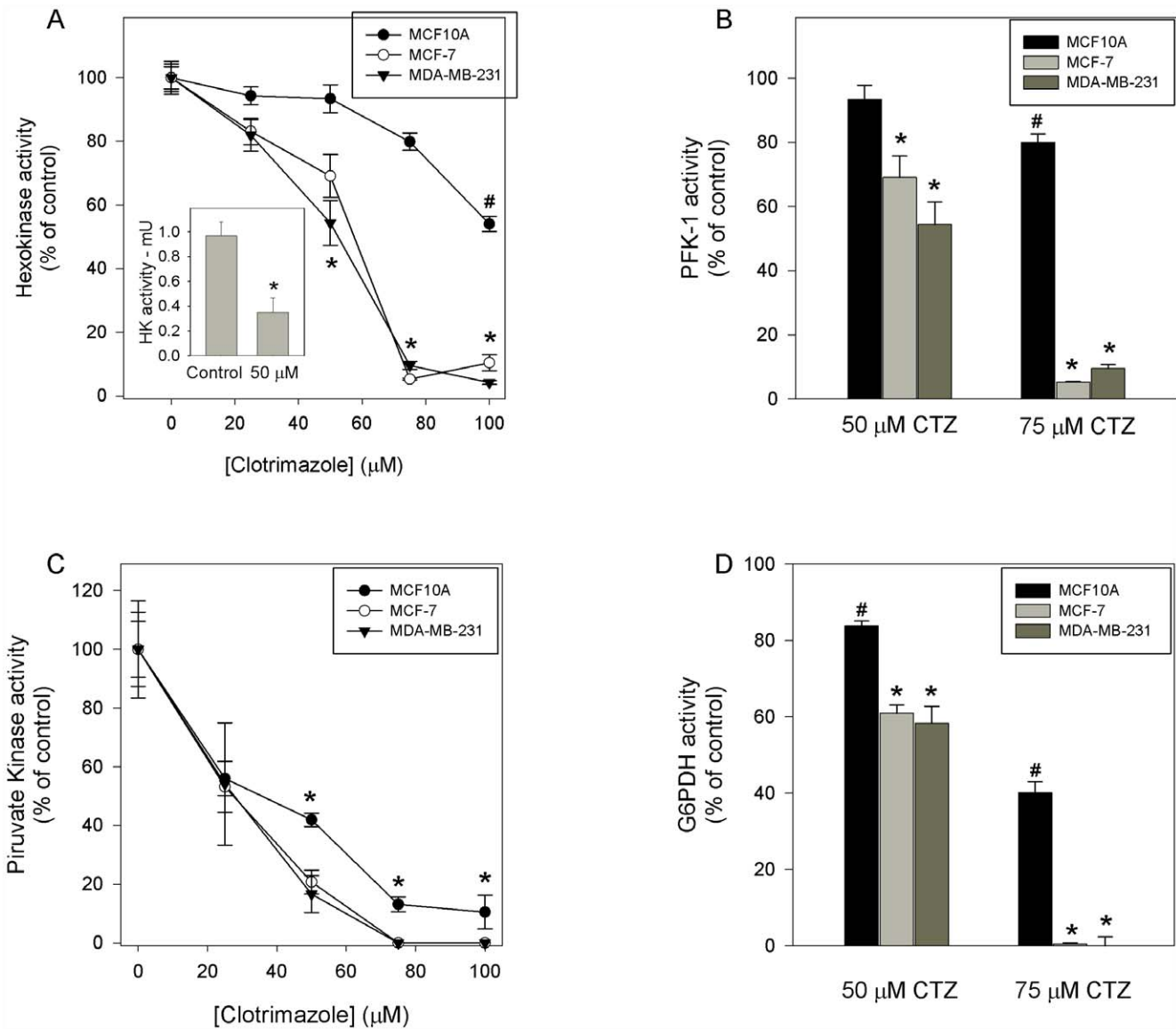


Figure 4. Glycolytic enzymes activity and G6PDH activity are inhibited by clotrimazole. Cell lines were grown to confluence in the indicated media as described in Methods. Cell lysates were used to evaluate HK, PFK-1, PK and G6PDH activities (panel A, B, C and D respectively) as described in Methods. Plotted values are mean \pm standard errors of five independent experiments. (A) # $P < 0.05$ compared to control in the absence of clotrimazole; * $P < 0.05$, compared to control in the absence of clotrimazole; * $P < 0.05$, compared to control and to MCF10A in the presence of clotrimazole. (B) # $P < 0.05$ compared to control in the absence of clotrimazole; * $P < 0.05$, compared to control and to MCF10A in the presence of clotrimazole. (C) The differences among the results obtained with the distinct clotrimazole concentrations tested are statistically significant. * indicate differences between MCF10A and tumoral breast cell lines. (D) # $P < 0.05$ compared to control in the absence of clotrimazole; * $P < 0.05$, compared to control and to MCF10A in the presence of clotrimazole. doi:10.1371/journal.pone.0030462.g004

Table 1. 3-BrPA effects on HK activity from breast cell lines.

Cell line	3 h treatment with 100 μ M 3-BrPA (% of control)
MCF10A	74.2 \pm 4.9
MCF-7	86.6 \pm 0.6
MDA-MB-231	105.9 \pm 1.9

doi:10.1371/journal.pone.0030462.t001

tumorigenic cell lines: (1) cancerous cells accumulate clotrimazole more readily and in an aggressiveness-dependent pattern, (2) glycolytic enzymes in cancerous cells are more sensitive to the effects of clotrimazole what could be due to an isoform expression specificity, and (3) cancerous cells rely on glycolysis more heavily and are therefore more sensitive, which is strongly supported by the Warburg effect observed in tumoral and not in non-tumoral cells. The first possibility is reasonably plausible, but we have not evaluated it and therefore we cannot discuss it. The other two possibilities seem to be supported by our results, although we cannot unambiguously discriminate between them.

In non-tumoral cells, at least 90% of ATP production is provided by mitochondrial oxidative phosphorylation, while in tumor cells, approximately 50% is dependent on cytoplasmic,

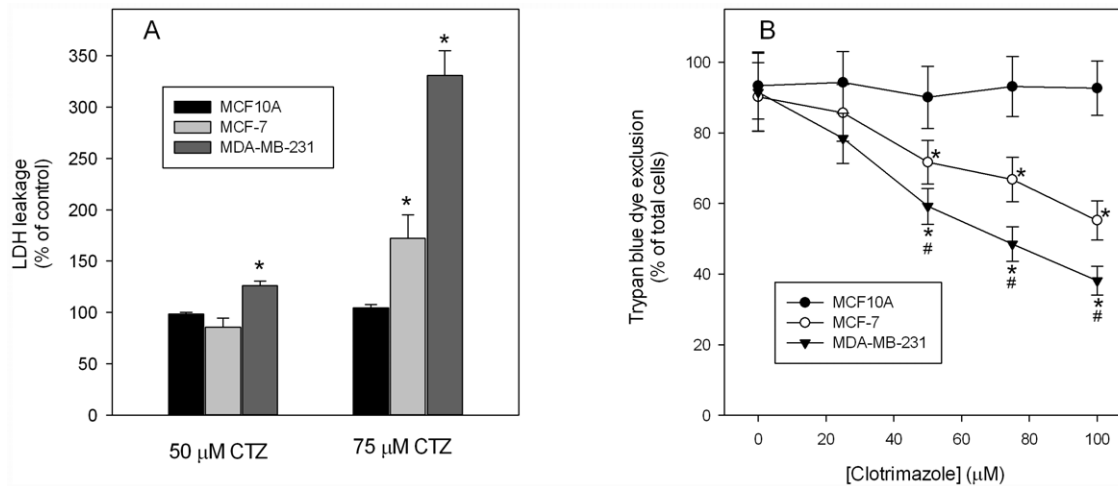


Figure 5. Cellular viability decreases in breast cancer cells treated with clotrimazole. Data are presented as mean \pm SE of at least five experiments. Panel A: lactate dehydrogenase (LDH) leaked to culture medium by clotrimazole-induced cellular lysis was evaluated as described in Methods. * $P < 0.05$ compared to MCF10A cells in the same clotrimazole concentration. Panel B: the percentages of cells that exclude trypan blue dye were evaluated counting the total cells and those that were intracellularly stained with the dye. Cells were counted using a TC10 Automated Cell Counter (Bio-Rad Laboratories, CA, USA). * $P < 0.05$ compared to MCF10A in the same clotrimazole concentration. # $P < 0.05$ compared to MCF-7 in the same clotrimazole concentration. doi:10.1371/journal.pone.0030462.g005

aerobic glycolysis [21,22]. Here, we demonstrate that clotrimazole inhibits glucose uptake (Fig. 3A) and mitochondrial activity (Fig. 3C) more efficiently in the tumorigenic cell lines. These effects result in alterations in ATP content that are also more pronounced in the tumorigenic cell lines. However, it seems that this later effect is more related to the inhibition of glycolysis, since mitochondrial activity is not reduced by 50 μ M clotrimazole, while glucose consumption and ATP content are affected by even lower concentrations of the drug. These data highlight the importance of aerobic glycolysis for energy production in tumorigenic cells. The increased content of ATP measured in MCF-10A cell upon clotrimazole treatment might be the result of clotrimazole effects on this cell metabolism and proliferation. Comparing clotrimazole effects on cells proliferation and metabolism one can observe that the drug blocks the proliferation of MCF-10A cells (Fig. 2B), decreases its glucose consumption (Fig. 3A) and do not affect its mitochondrial activity (Fig. 3C). Similar results are observed for the tumorigenic cell lines but with lesser extent on proliferation and greater extent on metabolism. Since proliferation if the highest ATP-consuming cellular process, the resultant ATP content of MCF-10A cells increases upon clotrimazole treatment.

It is important to mention that the lack of clotrimazole effects on MCF10A cell line cannot be attributed to fact that this cell line is grown in a different medium (DMEM/F12 with 5% FHS, instead of DMEM with 10% FBS used for MCF-7 and MDA-MB-231). We have performed control experiments assaying the effects of clotrimazole on cell viability and enzymes activity of MCF-10A cells grown in DMEM/F12 but incubated with DMEM for 24 hours during the clotrimazole treatment and the results were not different from those presented here. We decided to perform all the experiments using DMEM/F12 for the MCF10A cell to assure that all the cells would be at optimal growing conditions (MCF-10A does not grow well in DMEM with 10% FBS).

Many human tumors display a high rate of aerobic glycolysis, de novo fatty acid synthesis, and nucleotide biosynthesis [23,24]. Previous findings suggest that the increased glucose metabolism promotes lipogenesis and nucleotide biosynthesis, and enhances

tumor cell growth and proliferation by providing essential synthetic and bioenergetic requirements [25–29]. Although the metabolic alterations might not be initiating events in oncogenesis, recent success in blocking carcinogenesis by targeting tumor metabolism suggests that aerobic glycolysis plays an important role in sustaining tumor growth [27–33].

After 24 hours of incubation, clotrimazole promote a phenotype-dependent inhibition of the key glycolytic enzymes: HK, PFK-1 and PK. The results always present the same pattern: MCF10A cells are less responsive to clotrimazole, whereas MCF-7 and MDA-MB-231 are sensitive to the increasing concentration of the drug (Fig. 4). More importantly, the metastatic cell line presents the highest clotrimazole-induced inhibition of glycolysis. These observations are accompanied by the dose-dependent inhibition of G6PDH, the enzyme responsible for the first irreversible reaction of the PPP (Fig. 4D). We have not observed differences between the effects of clotrimazole on enzymes activity of MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines. The drug appears to be more effective inhibiting tumoral than non-tumoral enzymes, without distinction on the aggressiveness of the tumoral cell line. However, this can be an underestimated result, since here we measured the whole enzyme activity. These measurements were achieved under optimal substrate concentration and other reaction conditions, which can mask some fine regulatory properties of these enzymes, such as their association with cellular macromolecular structures, described as important to cancer increased glycolytic rates [34]. However, in order to assess these possibilities, a profound study of the effects of clotrimazole on glycolytic enzyme kinetics and cellular distribution should be performed, which was not the objective of the current work.

Although cancer cells are capable of carrying out oxidative phosphorylation, they undergo the glycolytic shift because aerobic glycolysis is advantageous for cell proliferation and tumorigenicity [35]. The metabolism of cancer cells, and indeed all proliferating cells, is adapted to facilitate the uptake and incorporation of nutrients into the biomass needed to produce a new cell. Supporting this idea are recent studies showing that (i) several signaling pathways implicated in cell proliferation also regulate

metabolic pathways that incorporate nutrients into biomass; and that (ii) certain cancer-associated mutations enable cancer cells to acquire and metabolize nutrients in a manner conducive to proliferation rather than efficient ATP production [5]. Moreover, in metastases, the glycolytic phenotype persists due to increased production of glucose-derived acid, which potentiates invasiveness of cells into the extracellular matrix of the host tissue [36].

Our results here demonstrated that clotrimazole was able to decrease cancer cells proliferation and viability, with minimal effects on non-tumoral cells. Clotrimazole has been implicated in other mechanisms affecting tumor cells migration and invasion, such as the inhibition of the Ca^{2+} -activated potassium channels [37,38] and inhibition of the enzymes of the cytochrome P450 family [39]. This latter effect of clotrimazole is critically important and represents a reason for why clotrimazole is practically not used for systemic treatments due to its impact on liver CYP450 metabolism. However, clotrimazole have been used to design more selective and less toxic compounds, such as TRAM-34 [40], which, in addition to clotrimazole, was recently demonstrated to inhibit glioblastoma proliferation [41]. An interesting observation is that the effects of clotrimazole and its analogue TRAM-34, originally designed as a specific Ca^{2+} -activated potassium channels blocker, on glioblastoma proliferation are not due to any effects on this ion channel. It is not difficult to imagine that the effects of these drugs might be related to inhibition of glioblastoma metabolism, such as described here. Interestingly, intracranial administration of clotrimazole has been used to prolong the survival of rats with glioma, but no mechanisms have been reported for this effect [8]. Clotrimazole has been shown to induce the nuclear condensation and f-actin depolymerization in MCF-7 cells [12] suggesting that clotrimazole-treated cells undergo apoptosis. In fact, decrease in glycolytic flux has been associated elsewhere to some apoptotic events [42,43]. In addition, studies on cell metabolism during apoptosis in murine interleukin-3-dependent cell line revealed that the activation of glycolytic flux is related to cell survival [42]. However, we didn't yet explore the death mechanisms involved in the decrease of cellular viability in response to clotrimazole on tumor cells.

Our current results add to the growing evidence that aerobic glycolysis contributes to cancer cell proliferation and tumorigenicity. Although the systemic therapeutic use of clotrimazole is strongly limited due to its toxic effects, the present findings point to the development of novel treatment approaches that selectively targets glycolysis in tumor cells. These novel approaches may identify treatments that would be more selective to aggressive tumors with minimal effects over non-tumoral cells.

Materials and Methods

Cell lines and Materials

The human breast cancer cell line MCF-7 was obtained from the Cell Bank of Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, UFRJ, Brazil. MDA-MB-231 and the non-tumorigenic epithelial MCF10A cell line were kindly supplied by Prof. Dr. Mitzi Brentani from University of 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 line was maintained in DMEM/F12 medium (Invitrogen) supplemented with 5% FHS (fetal horse serum; Gibco) plus 0.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$ EGF, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ insulin, 1.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hydrocortisone and 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cholera toxin (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA). Cells were grown at 37°C in 5% CO_2 atmosphere.

Clotrimazole, 3-bromopyruvate, NAD^+ , NADH , ATP, hexokinase, 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 uptake, mitochondrial activity 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, fresh medium was added, and the cells were returned to the incubator in the presence of different concentrations of clotrimazole (0–100 μM). After 24 h, the medium was removed and the amount of leaked lactate dehydrogenase (LDH) was evaluated, while mitochondrial activity and trypan blue dye exclusion was determined in the remaining cells using an MTT assay [44,45] and counting the cells that exclude trypan blue [46], respectively.

Glucose uptake was determined by incubating cells with fresh medium containing 5 mM 6-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-6-deoxyglucose (6-NBDG, Molecular Probes, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), a fluorescent glucose analogue. After 15, 30 and 45 min incubation, the medium was removed, the cells were washed with 6-NBDG-free medium, and 6-NBDG taken up by the cells was evaluated by fluorescence emission, according to the manufacturer's instructions. The glucose uptake rate was calculated by the linear regression of the increase in fluorescence incorporated by the cells, and these results are plotted as a percentage of control in a function of clotrimazole concentration. The parameters of the following equation were fitted to the experimental data in order to evaluate the effectiveness of clotrimazole effects by means of the concentration promoting half of the maximal glucose uptake inhibition. The equation used was:

$$G_m = 100 \frac{K_i}{K_i + [CTZ]} \quad (1)$$

where G_m is the percentage of glucose taken up by the cells at a given concentration of clotrimazole ($[CTZ]$) and K_i is the inhibitory constant, equivalent to the concentration of clotrimazole promoting 50% of the maximal inhibition.

LDH activity was determined spectrophotometrically by monitoring the conversion of NAD^+ to NADH in a lactate-utilizing reaction [47]. Cellular ATP was assessed using a system based on firefly (*Photinus pyralis*) luciferase (PerkinElmer AT-PLite) using a VICTOR3 multilabel reader (PerkinElmer).

Spectrophotometric assay for enzymes 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 in the presence of different concentrations of clotrimazole (0–100 μM) for 24 h. After this incubation, cells were removed from the plates by trypsinization and counted using a hemocytometer. Protein concentrations of cell lysates were measured [48], and the glycolytic enzyme activities were evaluated.

Phosphofructokinase-1 (PFK-1) activity was assayed using an enzyme-coupled method, where the oxidation of NADH was monitored spectrophotometrically [49]. The basic medium contain 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM MgCl_2 , 1 mM fructose 6-phosphate, 1 mM ATP, 0.2 mM NADH , 2 U/ml aldolase, 4 U/ml triosephosphate isomerase and 2 U/ml α -glycerophosphate dehydrogenase.

Hexokinase (HK) activity was assessed in a basic medium containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM MgCl₂, 1 mM glucose, 1 mM ATP, 0.2 mM NAD⁺ and 1 U/ml glucose 6-phosphate dehydrogenase as described previously [50].

Pyruvate kinase (PK) activity was measured in a medium containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM MgCl₂, 120 mM KCl, 1 mM phosphoenolpyruvate, 1 mM ADP, 0.2 mM NADH and 20 U/ml lactate dehydrogenase as described previously [50].

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) activity was assayed as previously described [51]. The basic medium contains 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM MgCl₂, 0.5 mM glucose 6-phosphate and 0.2 mM NADP⁺.

For all enzymatic analyses, NADH oxidation or NAD(P)⁺ reduction was determined 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 and followed online during the first-order kinetics period. Enzymes rates was determined calculating the first derivative of these curves. Blanks containing none of the coupled enzymes (or without glucose 6-phosphate in the case of G⁶PDH) were performed to control for non-specific oxidation/reduction. Each curve was performed in quadruplicate.

Cell migration assays

Cell migration was determined by using the 24-well Millicell Hanging Cell Culture Insert (Millipore) chamber with 8 μm pore polyethylene terephthalate (PET) membranes. The chambers were rehydrated in serum-free medium. Complete medium with 10% FBS or FHS was used as a chemoattractant. Suspension of 5 × 10⁴ cells/ml in serum-free medium was added to the inserts and incubated for 24 h in the presence or absence of 50 μM clotrimazole. Cells remaining on the upper membrane surface of the inserts were removed with a cotton swab whereas the cells on the lower surface were trypsinized and counted.

Cell migration was also assessed in scratch assays [52]. Briefly, confluent MCF10A, MCF-7 and MDA-MB-231 cells plated on

tissue culture dishes were manually scratched with a 200 μl pipette tip, washed with PBS and incubated at 37°C in complete media in the presence or absence of 50 μM clotrimazole. At the indicated time points, phase contrast images at specific scratch sites were captured as previously described [53]. The images were analyzed using the software BELView (BEL Engineering, It) and data were expressed in μm × h⁻¹.

Cell proliferation assay

Cells were seeded in 96-well culture plates and grown until confluence was reached. After 72 h serum was withdrawn to synchronize the cell cycle, cells were evaluated for proliferation in the presence of different concentrations of clotrimazole (0–100 μM) and 10 μM 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU). BrdU incorporation was analyzed after 24 h of incubation using a europium-based time-resolved fluorescence (TRF) cell proliferation assay according to the manufacturer's instruction (PerkinElmer). Cells incubated without BrdU served as the negative control. The mean fluorescence for each group was determined after subtracting the mean value of the negative control from each cell.

Statistical analyses

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

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CMF MCM MSP MLSS PZ. Performed the experiments: CMF MCM MSP MLSS PZ. Analyzed the data: CMF MCM MSP MLSS PZ. Contributed reagents/materials/analysis tools: MSP PZ. Wrote the paper: MSP PZ.

References

- Marin-Hernandez A, Rodriguez-Enriquez S, Vital-Gonzalez PA, Flores-Rodriguez FL, Macias-Silva M, et al. (2006) Determining and understanding the control of glycolysis in fast-growth tumor cells. Flux control by an over-expressed but strongly product-inhibited hexokinase. *FEBS J* 273: 1975–1988.
- Meadows AL, Kong B, Berdichevsky M, Roy S, Rosiva R, et al. (2008) Metabolic and morphological differences between rapidly proliferating cancerous and normal breast epithelial cells. *Biotechnol Prog* 24: 334–341.
- Hsu PP, Sabatini DM (2008) Cancer Cell Metabolism: Warburg and Beyond. *Cell* 134: 703–707.
- Gillies RJ, Robey I, Gatenby RA (2008) Causes and consequences of increased glucose metabolism of cancers. *J Nucl Med* 49 Suppl 2: 24S–42S.
- Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB (2009) Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324: 1029–1033.
- Almeida A, Bolanos JP, Moncada S (2010) E3 ubiquitin ligase APC/C-Cdh1 accounts for the Warburg effect by linking glycolysis to cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 738–741.
- Lee HC, Wei YH (2009) Mitochondrial DNA instability and metabolic shift in human cancers. *Int J Mol Sci* 10: 674–701.
- Khalid MH, Tokunaga Y, Caputy AJ, Walters E (2005) Inhibition of tumor growth and prolonged survival of rats with intracranial gliomas following administration of clotrimazole. *J Neurosurg* 103: 79–86.
- Majewski N, Nogueira V, Bhaskar P, Coy PE, Skeen JE, et al. (2004) Hexokinase-mitochondria interaction mediated by Akt is required to inhibit apoptosis in the presence or absence of Bax and Bak. *Mol Cell* 16: 819–830.
- Glass-Marmor L, Beitner R (1997) Detachment of glycolytic enzymes from cytoskeleton of melanoma cells induced by calmodulin antagonists. *Eur J Pharmacol* 328: 241–248.
- Penso J, Beitner R (2002) 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. *MolGenetMetab* 76: 181–188.
- Meira DD, Marinho-Carvalho MM, Teixeira CA, Veiga VF, Da Poian AT, et al. (2005) Clotrimazole decreases human breast cancer cells viability through alterations in cytoskeleton-associated glycolytic enzymes. *MolGenetMetab* 84: 354–362.
- Sola-Penna M, Da Silva D, Coelho WS, Marinho-Carvalho MM, Zancan P (2010) Regulation of mammalian muscle type 6-phosphofructo-1-kinase and its implication for the control of the metabolism. *IUBMB Life* 62: 791–796.
- Warburg O (1956) On the origin of cancer cells. *Science* 123: 309–314.
- Zancan P, Sola-Penna M, Furtado CM, Da Silva D (2010) Differential expression of phosphofructokinase-1 isoforms correlates with the glycolytic efficiency of breast cancer cells. *Mol Genet Metab* 100: 372–378.
- Geschwind JF, Ko YH, Torbensen MS, Magee C, Pedersen PL (2002) Novel therapy for liver cancer: direct intraarterial injection of a potent inhibitor of ATP production. *Cancer Res* 62: 3909–3913.
- Chen Z, Zhang H, Lu W, Huang P (2009) Role of mitochondria-associated hexokinase II in cancer cell death induced by 3-bromopyruvate. *Biochim Biophys Acta* 1787: 553–560.
- Bensaad K, Tsuruta A, Selak MA, Vidal MN, Nakano K, et al. (2006) TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell* 126: 107–120.
- Penso J, Beitner R (2002) Clotrimazole decreases glycolysis and the viability of lung carcinoma and colon adenocarcinoma cells. *Eur J Pharmacol* 451: 227–235.
- Glass-Marmor L, Morgenstern H, Beitner R (1996) Calmodulin antagonists decrease glucose 1,6-bisphosphate, fructose 1,6-bisphosphate, ATP and viability of melanoma cells. *Eur J Pharmacol* 313: 265–271.
- Shaw RJ (2006) Glucose metabolism and cancer. *Current Opinion in Cell Biology* 18: 598–608.
- Matoba S, Kang JG, Patino WD, Wragg A, Boehm M, et al. (2006) p53 regulates mitochondrial respiration. *Science* 312: 1650–1653.
- Kim JW, Dang CV (2006) Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect. *Cancer Res* 66: 8927–8930.
- Tong X, Zhao F, Thompson CB (2009) The molecular determinants of de novo nucleotide biosynthesis in cancer cells. *Curr Opin Genet Dev* 19: 32–37.

25. Boros LG, Torday JS, Lim S, Bassilian S, Cascante M, et al. (2000) Transforming growth factor beta2 promotes glucose carbon incorporation into nucleic acid ribose through the nonoxidative pentose cycle in lung epithelial carcinoma cells. *Cancer Res* 60: 1183–1185.
26. Hatzivassiliou G, Zhao F, Bauer DE, Andreadis C, Shaw AN, et al. (2005) ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth. *Cancer Cell* 8: 311–321.
27. Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH, Ramanathan A, Gerszten RE, et al. (2008) The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature* 452: 230–233.
28. Liu YC, Li F, Handler J, Huang CR, Xiang Y, et al. (2008) Global regulation of nucleotide biosynthetic genes by c-Myc. *PLoS ONE* 3: e2722.
29. Mannava S, Grachtchouk V, Wheeler LJ, Im M, Zhuang D, et al. (2008) Direct role of nucleotide metabolism in C-MYC-dependent proliferation of melanoma cells. *Cell Cycle* 7: 2392–2400.
30. Ko YH, Smith BL, Wang Y, Pomper MG, Rini DA, et al. (2004) Advanced cancers: eradication in all cases using 3-bromopyruvate therapy to deplete ATP. *Biochem Biophys Res Commun* 324: 269–275.
31. Fantin VR, St-Pierre J, Leder P (2006) Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell* 9: 425–434.
32. Telang S, Yalcin A, Clem AL, Bucala R, Lane AN, et al. (2006) Ras transformation requires metabolic control by 6-phosphofructo-2-kinase. *Oncogene* 25: 7225–7234.
33. Kim JW, Gao P, Liu YC, Semenza GL, Dang CV (2007) Hypoxia-inducible factor 1 and dysregulated c-Myc cooperatively induce vascular endothelial growth factor and metabolic switches hexokinase 2 and pyruvate dehydrogenase kinase 1. *Mol Cell Biol* 27: 7381–7393.
34. El-Bacha T, de Freitas MS, Sola-Penna M (2003) Cellular distribution of phosphofructokinase activity and implications to metabolic regulation in human breast cancer. *MolGenetMetab* 79: 294–299.
35. Tong X, Zhao F, Mancuso A, Gruber JJ, Thompson CB (2009) The glucose-responsive transcription factor ChREBP contributes to glucose-dependent anabolic synthesis and cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 21660–21665.
36. Gatenby RA, Gillies RJ (2004) Why do cancers have high aerobic glycolysis? *NatRevCancer* 4: 891–899.
37. Ouadid-Ahidouch H, Roudbaraki M, Ahidouch A, Delcourt P, Prevarskaya N (2004) Cell-cycle-dependent expression of the large Ca²⁺-activated K⁺ channels in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 316: 244–251.
38. Khaitan D, Sankpal UT, Weksler B, Meister EA, Romero IA, et al. (2009) Role of KCNMA1 gene in breast cancer invasion and metastasis to brain. *BMC Cancer* 9: 258.
39. Zhang W, Ramamoorthy Y, Kilicarslan T, Nolte H, Tyndale RF, et al. (2002) Inhibition of cytochromes P450 by antifungal imidazole derivatives. *Drug Metab Dispos* 30: 314–318.
40. Wulff H, Miller MJ, Hansel W, Grissmer S, Cahalan MD, et al. (2000) Design of a potent and selective inhibitor of the intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel, IKCa1: a potential immunosuppressant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 8151–8156.
41. Abdullaev IF, Rudkouskaya A, Mongin AA, Kuo YH (2010) Calcium-activated potassium channels BK and IK1 are functionally expressed in human gliomas but do not regulate cell proliferation. *PLoS ONE* 5: e12304.
42. Garland JM, Halestrap A (1997) Energy metabolism during apoptosis. Bcl-2 promotes survival in hematopoietic cells induced to apoptose by growth factor withdrawal by stabilizing a form of metabolic arrest. *JBiolChem* 272: 4680–4688.
43. Gonin-Giraud S, Mathieu AL, Diocou S, Tomkowiak M, Delorme G, et al. (2002) Decreased glycolytic metabolism contributes to but is not the inducer of apoptosis following IL-3-starvation. *Cell Death Differ* 9: 1147–1157.
44. Oddis CV, Finkel MS (1995) Cytokine-stimulated nitric oxide production inhibits mitochondrial activity in cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 213: 1002–1009.
45. Spitz GA, Furtado CM, Sola-Penna M, Zancan P (2009) Acetylsalicylic acid and salicylic acid decrease tumor cell viability and glucose metabolism modulating 6-phosphofructo-1-kinase structure and activity. *Biochemical Pharmacology* 77: 46–53.
46. Kennelly KP, Wallace DM, Holmes TM, Hankey DJ, Grant TS, et al. (2011) Preparation of pre-confluent retinal cells increases graft viability in vitro and in vivo: a mouse model. *PLoS ONE* 6: e21365.
47. Schwartz MK, Bodansky O (1968) Utilization of automation for studies of enzyme kinetics. *Methods Biochem Anal* 16: 183–218.
48. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265–275.
49. Coelho WS, Costa KC, Sola-Penna M (2007) Serotonin stimulates mouse skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase through tyrosine-phosphorylation of the enzyme altering its intracellular localization. *MolGenetMetab* 92: 364–370.
50. Leite TC, Coelho RG, Silva DD, Coelho WS, Marinho-Carvalho MM, et al. (2011) Lactate downregulates the glycolytic enzymes hexokinase and phosphofructokinase in diverse tissues from mice. *FEBS Letters* 585: 92–98.
51. Sola-Penna M, Meyer-Fernandes JR (1998) Stabilization against thermal inactivation promoted by sugars on enzyme structure and function: why is trehalose more effective than other sugars? *ArchBiochemBiophys* 360: 10–14.
52. Liang C-C, Park AY, Guan J-L (2007) In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols* 2: 329–333.
53. Chan SW, Lim CJ, Guo K, Ng CP, Lee I, et al. (2008) A role for TAZ in migration, invasion, and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cancer Res* 68: 2592–2598.



Research paper

Resveratrol decreases breast cancer cell viability and glucose metabolism by inhibiting 6-phosphofructo-1-kinase



Lilian S. Gomez^a, Patricia Zancan^b, Mariah C. Marcondes^b, Livia Ramos-Santos^a, José Roberto Meyer-Fernandes^c, Mauro Sola-Penna^{a,*}, Daniel Da Silva^{a,*}

^aLaboratório de Enzimologia e Controle do Metabolismo (LabECoM), Departamento de Fármacos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro – RJ 21941-590, Brazil

^bLaboratório de Oncobiologia Molecular (LabOMol), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

^cInstituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 May 2012

Accepted 19 February 2013

Available online 27 February 2013

Keywords:

Breast cancer

Metabolism

Glycolysis

6-Phosphofructo-1-kinase

Resveratrol

ABSTRACT

Cancer cells are highly dependent on glycolysis to supply the energy and intermediates required for cell growth and proliferation. The enzyme 6-phosphofructo-1-kinase (PFK) is critical for glycolysis, and its activity is directly correlated with cellular glucose consumption. Resveratrol is a potential anti-tumoral drug that decreases glucose metabolism and viability in cancer cells. However, the mechanism involved in resveratrol-mediated anti-tumor activity is not entirely clear. In this work, it is demonstrated that resveratrol decreases viability, glucose consumption and ATP content in the human breast cancer cell line MCF-7. These effects are directly correlated with PFK inhibition by resveratrol in these cells. Moreover, resveratrol directly inhibits purified PFK, promoting the dissociation of the enzyme from fully active tetramers into less active dimers. This effect is exacerbated by known negative regulators of the enzyme, such as ATP and citrate. On the other hand, positive modulators that stabilize the tetrameric form of the enzyme, such as fructose-2,6-bisphosphate and ADP, prevent the inhibition of PFK activity by resveratrol, an effect not observed with increased pH. In summary, our results provide evidence that resveratrol directly inhibits PFK activity, therefore disrupting glucose metabolism and reducing viability in cancer cells.

© 2013 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Energy metabolism is often altered in neoplastic cells [1]. Many studies have shown that cancer cells are highly dependent on glycolytic metabolism [2–4] because this bioenergetic pathway is able to generate metabolic products to support the energy demands of tumor growth and proliferation [5]. Thus, inhibitors of glycolytic metabolism that could reduce the tumoral energy supply are emerging as potential drugs to combat this disease [4,6,7].

The enzyme 6-phosphofructo-1-kinase (EC 2.7.1.11, or PFK) is critical for glycolytic metabolism, catalyzing the transfer of a phosphate from ATP to fructose-6-phosphate (F6P) to produce fructose-1,6-bisphosphate and adenosine diphosphate (ADP). Expression levels of the three different PFK isoforms are tissue-

specific: skeletal muscle is unique in that it expresses only PFK-M, whereas all other tissues express distinct levels of the three isoforms [8,9]. This enzyme is characterized by complex regulatory mechanisms, among them allosteric regulation, oligomerization, subcellular localization, interaction with other proteins and covalent modifications [9,10]. The metabolic alterations found in cancer cells have been correlated with changes in the expression pattern and activity of PFK [1], and PFK inhibition can lead to cell death in human breast carcinoma cell lines [4,7] and human breast cancer tissues [11]. Thus, PFK appears to be a promising target for the development of new drugs with anti-tumoral activity.

Resveratrol, a polyphenolic compound found mainly in grapes, can decrease the rate of tumor cell growth [12,13]. This effect may be related to the capacity of resveratrol to reduce glucose uptake and lactate production [14]. However, the mechanism of action of this promising compound is not well understood. Because neoplastic cells depend preferentially on anaerobic metabolism instead of aerobic metabolism, and because PFK is a pacemaker enzyme capable of regulating the glycolytic pathway, we aimed to investigate whether resveratrol modulates survival, glucose metabolism and

Abbreviations: AMP, adenosine monophosphate; ADP, adenosine diphosphate; F6P, fructose-6-phosphate; F2,6BP, fructose-2,6-bisphosphate; PFK, 6-phosphofructo-1-kinase.

* Corresponding authors. Tel./fax: +55 21 2560 8438.

E-mail addresses: maurosp@ufRJ.br (M. Sola-Penna), danirs@ufRJ.br (D. Da Silva).

PFK activity in the breast cancer cell line MCF-7. Our results provide further insight into the mechanism of PFK inhibition by resveratrol.

2. Materials and methods

2.1. MCF-7 breast cancer cell culture and assays

The breast cancer cell line MCF-7 was cultured in DMEM supplemented with 4.5 mM glucose, 10% (v/v) fetal bovine serum and 2 mM glutamine (except when indicated that cells were grown in the absence of glutamine) at 37 °C until confluence was achieved. Then, the medium was removed, and cells were seeded in 96-well plates with fresh medium in the absence or presence of different concentrations of resveratrol (1, 5, 15, 50 or 100 μM; Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA; ≥99% purity) and incubated for 24 h. Controls were also performed in the absence or presence of 2.5% DMSO to ensure the lack of cytotoxicity of DMSO. After this incubation, the medium was removed and used to evaluate the metabolic effects of resveratrol treatment. Cell viability was assessed by the MTT assay [7]. Glucose consumption was measured using a coupled enzyme system (Glucos 500, Doles Ltda, Brazil) [1]. LDH leakage was determined by measuring the total LDH activity in the culture media based on conversion of NADH to NAD⁺ [1]. Lactate production was determined by assessing the lactate content in the culture media through monitoring the formation of NADH in the presence of exogenous LDH and NAD⁺ [15]. The intracellular ATP content was measured using a system based on a luciferin-luciferase assay (PerkinElmer ATPLite) with a VICTOR3 multilabel reader (PerkinElmer) [4]. PFK activity was measured spectrophotometrically using a coupled enzyme system that relies on the oxidation of NADH. The basic medium contained 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM MgCl₂, 1 mM F6P, 1 mM ATP, 0.2 mM NADH, 2 U/ml aldolase, 4 U/ml triosephosphate isomerase and 2 U/ml α-glycerophosphate dehydrogenase [4]. Determination of F1,6BP/F6P ratio was performed as described previously [16]. Measurements from cell-based assays were corrected by the number of viable cells.

2.2. Radioassay for PFK activity

Purified PFK activity was assessed through the radiometric method developed by Sola-Penna et al. [17], with the modifications introduced by Zancan and Sola-Penna [18]. Briefly, PFK was assayed in a basic medium containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM MgCl₂, 5 mM (NH₄)₂SO₄, 1 mM F6P, 1 mM [γ-³²P]ATP and 1 μg/ml purified PFK. The pH and the concentrations of substrates, enzyme, and resveratrol may vary depending on the experiment, as indicated in the legends or figures. All reactions were performed at 37 °C with the exception of those shown in Fig. 6 (50 °C). All experiments were performed in the absence or presence of 2.5% DMSO. Controls throughout the work were performed only in the presence of DMSO because the enzyme activity is not affected by this concentration of DMSO. PFK activity was reported in m-units, where 1 m-unit is equal to the formation of 1 nmol of F1,6BP per minute of reaction. PFK was purified from rabbit skeletal muscle, and the purity of the enzyme was 99.9%, such as evaluated by SDS-PAGE (Fig. 1) performed according to [19]. Purified PFK for all experiments was obtained according to the method developed by Kemp [20] with the modifications introduced by Hesterberg et al. [21].

2.3. Intrinsic fluorescence measurements

PFK intrinsic fluorescence measurements were performed as described previously by Marinho-Carvalho [22] and Leite et al. [16]. Measurements were taken in the presence of different enzyme concentrations (0.2, 1 and 5 μg/ml) and in the absence or presence

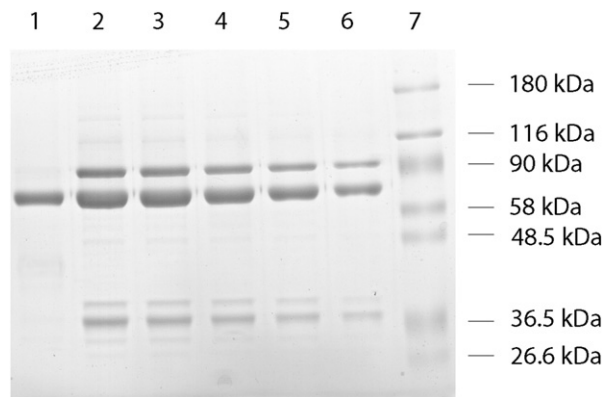


Fig. 1. SDS-PAGE of the purified PFK from rabbit skeletal muscle. SDS-PAGE (8% acrylamide) was performed as described in materials and methods. Lane 1: Final purified PFK. Lanes 2–6: Previous salting-out steps. Lane 7: Molecular weight markers used - α₂-macroglobulin from equine serum (180 kDa), β-galactosidase from *E. coli* (116 kDa), Lactoferrin from human milk (90 kDa), pyruvate kinase from rabbit muscle (58 kDa), fumarase from porcine heart (48.5 kDa), lactic dehydrogenase from rabbit muscle (36.5 kDa) and triosephosphate isomerase from rabbit muscle (26.6 kDa). This is a representative gel of a series of purifications presenting the same pattern.

of 15 μM resveratrol. The excitation wavelength was fixed at 280 nm, and the fluorescence emission was scanned from 300 to 400 nm. The centers of mass of the intrinsic fluorescence spectra (c.m.) were calculated using equation (1):

$$c.m. = \frac{\sum \lambda \cdot I_{\lambda}}{\sum I_{\lambda}} \quad (1)$$

where λ is the wavelength, and I_{λ} is the fluorescence intensity at a given λ .

2.4. Statistical analysis and calculations

The results are expressed as means ± standard error. Analyses of the data and linear and non-linear regression were performed using Sigma Plot software (v. 10.0, Systat Inc., CA, USA) integrated with the software SigmaStat (v. 3.2, Systat Inc. CA, USA). Values for each group were compared by Student's *t*-test, and the differences were considered significant if $P < 0.05$.

Kinetic parameters for ATP effects on PFK were calculated through non-linear regression using the experimental data to fit the parameters of the equation:

$$v = \frac{V_{\max} [ATP]^{n1}}{K_{0.5}^{n1} + [ATP]^{n1}} \cdot \frac{[ATP]^{n2}}{I_{0.5}^{n2} + [ATP]^{n2}} \quad (2)$$

where v is the PFK activity calculated for a given concentration of ATP ([ATP]), V_{\max} is the maximal velocity calculated, $K_{0.5}$ is the affinity constant for the catalytic component of the ATP curve, which is equal to the concentration of F6P responsible for half activation of the enzyme by ATP, $n1$ is the cooperativity index for this catalytic component, $I_{0.5}$ is the affinity constant for the inhibitory component of the ATP curve, which is equal to the concentration of ATP responsible for 50% of the maximal inhibition of the enzyme by ATP, and $n2$ is the cooperativity index for this inhibitory component.

Kinetic parameters for F6P effects on PFK were calculated through non-linear regression using the experimental data to fit the parameters of the equation:

$$v = \frac{V_{\max} [F6P]^n}{K_{0.5}^n + [ATP]^n} \quad (3)$$

where v is the PFK activity calculated for a given concentration of F6P ($[F6P]$), V_{max} is the maximal velocity calculated at saturating concentrations of F6P, $K_{0.5}$ is the affinity constant for F6P, which is equal to the concentration of F6P responsible for half-activation of the enzyme by F6P, and n is the cooperativity index for this phenomenon.

3. Results

Many studies have shown that resveratrol is able to control the growth of neoplastic cells [12,14]. First, we investigated whether resveratrol modulates survival, glucose metabolism and PFK activity in MCF-7 breast cancer cells after 24 h of preincubation with this compound. Fig. 2A shows that resveratrol decreases the reduction of MTT in a concentration-dependent manner. The higher concentration of resveratrol (100 μ M) decreases cell viability by approximately 40%. In addition, resveratrol increases lactate dehydrogenase (LDH) leakage in the cell culture media (Fig. 2A), indicating the loss of cell integrity and viability. Thus, these results confirm data from previous literature showing that resveratrol decreases cell viability in the MCF-7 cell line [23]. Seeking to elucidate the mechanisms of these effects, the glucose consumption and lactate production were analyzed in MCF-7 cells cultured

in the presence of different concentrations of resveratrol for 24 h Fig. 2B shows that resveratrol decreases glucose consumption in a concentration-dependent manner, resulting in significant effects even at lower resveratrol concentrations such as 1 μ M. Interestingly, resveratrol increases lactate production at concentrations higher than 15 μ M, which is probably related to increased glutamine oxidation. This hypothesis is confirmed evaluating glucose consumption and lactate production in a glutamine-free culture medium (Fig. 2B). Under this condition, resveratrol also decreases lactate production by MCF-7 cells. It is important to notice that glucose consumption is affected in a similar manner in the presence or the absence of glutamine in the culture medium (Fig. 2B), as well as cell viability (data not shown). Similar to the effects of resveratrol upon the MTT reduction and glucose consumption, this compound also decreases cellular ATP content (Fig. 2C) by approximately 16% at 1 μ M resveratrol and 50% at 100 μ M resveratrol. To understand the mechanism by which resveratrol affects energy metabolism, we analyzed the activity of PFK, the major glycolytic regulatory enzyme, in the presence of different concentrations of resveratrol. Fig. 2D shows that PFK activity is inhibited by resveratrol in a concentration-dependent manner. Moreover, 100 μ M resveratrol decreases the F1,6BP/F6P ratio in \sim 25%, corroborating that resveratrol intracellularly inhibits PFK. Altogether, the degree of

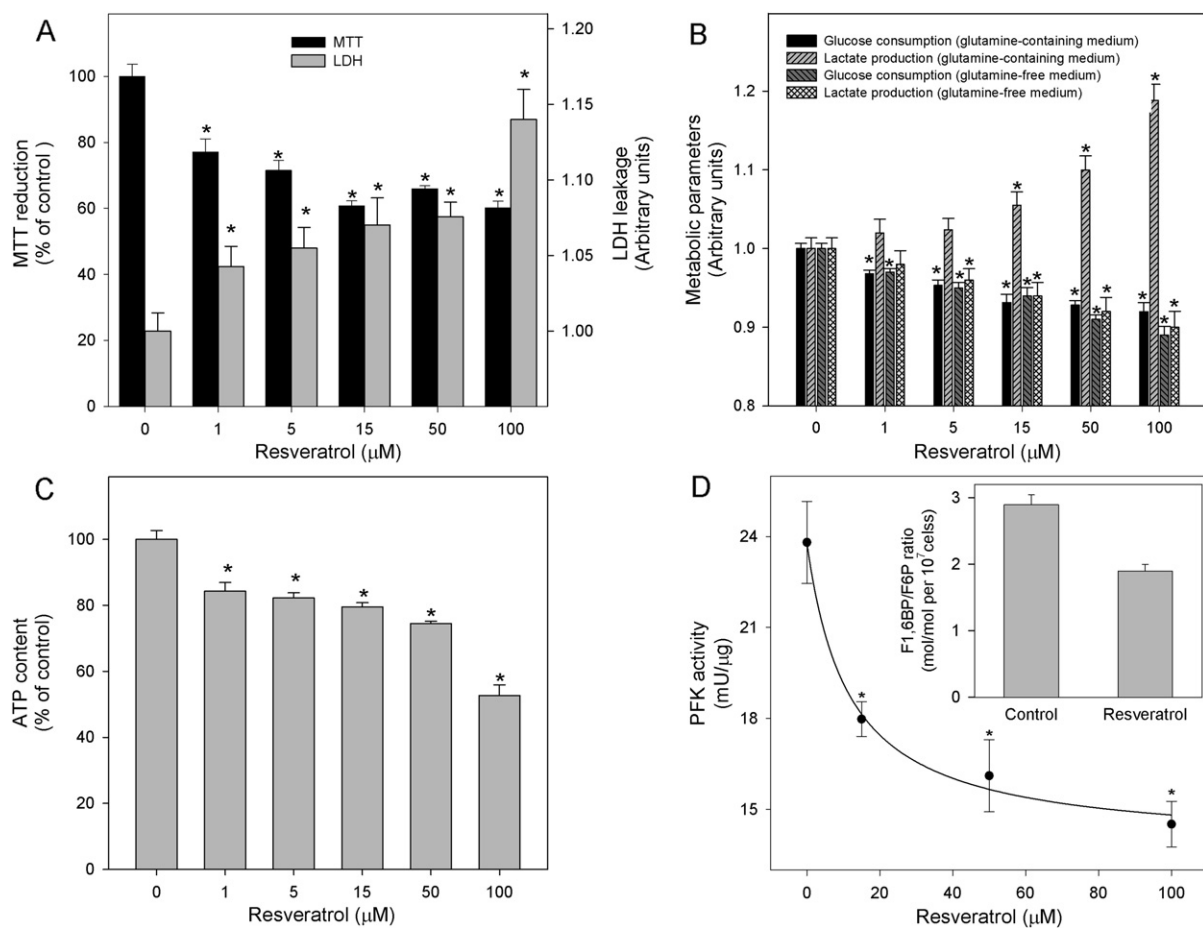


Fig. 2. Effects of different concentrations of resveratrol on MCF-7 cells viability, glucose consumption, lactate production, ATP content and PFK activity. MCF-7 cells were grown in DMEM until confluence. After that, the medium was removed and fresh medium containing the desired concentrations of resveratrol was added and cells were incubated for 24 h under these conditions. Controls were done in the presence of DMSO. Treated cells were used to evaluate: Panel A, viability by MTT reduction (black bars) and LDH leakage (gray bars); panel B, glucose consumption (black bars) and lactate production (gray bars); panel C, intracellular ATP content; panel D, PFK activity; panel D inset, F1,6BP/F6P ratio. The absolute glucose consumption rate in the absence of resveratrol was 31.3 ± 0.8 nmol/h $\times 10^7$ cells. The absolute lactate production rate in the absence of resveratrol was 10.6 ± 0.3 nmol/h $\times 10^7$ cells. The absolute value for ATP content in the absence of resveratrol was 17.3 ± 1.1 nmol/ 10^7 cells. The absolute amount of F1,6BP was 2.1 ± 1.5 nmol/ 10^7 cells and of F6P was 0.7 ± 0.1 nmol/ 10^7 cells. The experimental procedures are described in material and methods. Data represent the mean \pm standard error of 4–8 independent experiments ($n = 4$ –8). * $P < 0.05$ compared with respective control in the absence of resveratrol (Student's t-test). The origin of the ordinates is suppressed in panels B and D.

PFK inhibition by resveratrol is highly correlated with decreased cell viability, glucose consumption and intracellular ATP content, suggesting PFK as a target of resveratrol in MCF-7 cells.

Our group has previously shown that other drugs that cause these effects, such as clotrimazole [24] and acetylsalicylic acid [7], can directly inhibit PFK, glucose consumption and cell viability in MCF-7 cells. Thus, to investigate whether resveratrol could be acting directly on PFK, the activity of the purified enzyme was analyzed in the presence of different concentrations of this compound. Fig. 3 shows that resveratrol inhibits the activity of PFK in a concentration-dependent manner, with approximately 50% inhibition of total enzyme activity achieved in the presence of 15 μM of the polyphenol. This concentration was used for subsequent experiments because it resulted in the greater degree of inhibition. These experiments were performed without pre-incubation of the enzyme with resveratrol, demonstrating the rapid effect of this inhibitor.

To investigate whether the inhibitory effect of resveratrol could be due to alterations in the kinetic parameters of PFK, we measured the enzyme activity in the presence of different concentrations of its substrates, ATP and F6P. Resveratrol inhibits PFK activity at all concentrations of F6P tested (Fig. 4A). PFK is also inhibited by resveratrol at all concentrations of ATP (Fig. 4B). Moreover, for the F6P substrate, resveratrol increases the K_m (from 0.14 ± 0.01 to 0.22 ± 0.02 mM; $P < 0.05$), thus decreasing the affinity, and also decreases the V_{max} (from 65 ± 3 to 33 ± 3 mU/ μg ; $P < 0.05$) without altering the cooperativity index (from 1.5 ± 0.4 to 1.1 ± 0.3) (Fig. 4A). In relation to ATP, resveratrol also decreases the affinity of the PFK catalytic site for this substrate, as supported by the increase in $K_{0.5}$ (from 0.34 ± 0.01 to 0.40 ± 0.01 ; $P < 0.05$); without modifying the cooperativity index for the stimulatory component of the enzyme (1.3 ± 0.1 and 1.5 ± 0.1 for control and resveratrol, respectively). However, despite the significantly reduced apparent maximal velocity of PFK (from 65 ± 3 to 36 ± 2 mU/ μg ; $P < 0.05$), resveratrol does not alter either the affinity for the inhibitory component, $I_{0.5}$ (1.9 ± 0.1 and 2.2 ± 0.1 mM for control and resveratrol, respectively) or the cooperativity index (3.0 ± 0.4 and 4.0 ± 0.3 for control and resveratrol, respectively) of PFK for ATP (Fig. 4B).

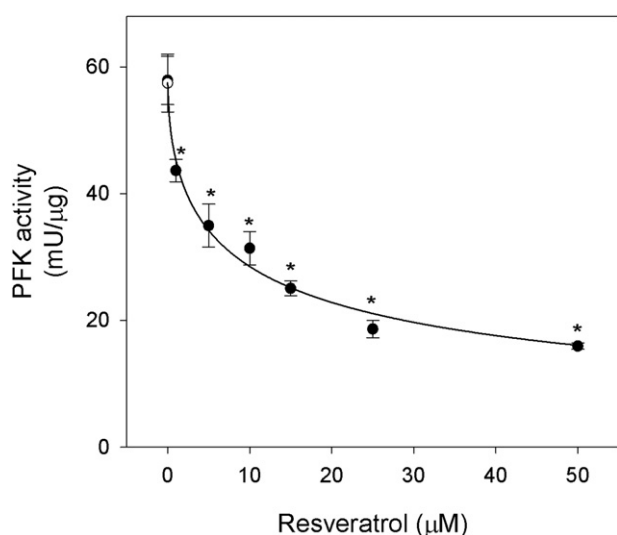


Fig. 3. Effects of different concentrations of resveratrol on purified PFK activity. The PFK activity (1 $\mu\text{g/ml}$) was assayed in the absence (filled circle, control) or presence of 1, 5, 10, 15, 25 or 50 μM of resveratrol (filled circles) at pH 7.4. The PFK activity was measured as described in material and methods. * $P < 0.05$ compared to control (Student's t -test). Values are means \pm standard error of six independent experiments ($n = 6$).

The PFK concentration influences the oligomerization state of the enzyme. Lower concentrations of PFK favor the formation of dimers, which are quite inactive, while higher concentrations stabilize the tetrameric form, which is fully active [9,16,25]. In previous work, it was shown that the strong inhibitory effects of lactate and acetylsalicylic acid on PFK are attenuated when the enzyme concentration is increased [3,7]. Therefore, the inhibitory effect of these substances may be due to dissociation of the PFK from the tetrameric (higher specific activity) to the dimeric (lower specific activity) form. After observing that resveratrol directly inhibits PFK activity, we sought to investigate the mechanism by which this effect was occurring. First, we analyzed the effect of 15 μM resveratrol on the activity of PFK in the presence of increasing concentrations of the enzyme (0.2, 1, 5, 10 and 15 $\mu\text{g/ml}$). Fig. 5 shows that resveratrol markedly inhibits PFK activity at low enzyme concentrations (0.2 $\mu\text{g/ml}$). However, increasing the enzyme concentration decreases the inhibition caused by resveratrol, and this inhibitory effect is completely abolished at 10 $\mu\text{g/ml}$ enzyme. This effect correlates with the tetramerization and increased enzyme stability at high enzyme concentrations, as previously shown in other studies [3,7,26]. In addition, we evaluated the effects of resveratrol on the intrinsic fluorescence spectrum of the PFK in order to verify whether resveratrol modulates the PFK oligomeric structure. The results show that resveratrol increases the center of mass of the PFK intrinsic fluorescence spectrum, especially at lower enzyme concentrations (0.2 $\mu\text{g/ml}$) (Fig. 6). However, increasing the concentration of PFK to 5 $\mu\text{g/ml}$ prevents this resveratrol-induced effect. The results shown in Fig. 6 are highly correlated with the data shown in Fig. 5, suggesting that a high enzyme concentration increases the formation and stabilization of more complex oligomeric forms of the enzyme (Fig. 6), thus preventing the inhibitory effects of resveratrol (Fig. 5).

Because high temperature can be used to dissociate the enzyme, and hence destabilize it and reduce its activity [24], we evaluated the effect of resveratrol (15 μM) on the activity of PFK (1 $\mu\text{g/ml}$) pre-incubated at 50 $^{\circ}\text{C}$ for different periods of time (Fig. 7). Resveratrol is able to inhibit PFK activity by approximately 50% at 37 $^{\circ}\text{C}$ (time 0). In either the absence or presence of resveratrol, PFK activity is lost over time during incubation at 50 $^{\circ}\text{C}$ due to the denaturation of the enzyme. However, in the presence of resveratrol, there is marked inhibition of PFK activity, as can be better observed when the absolute values of activity (Fig. 7A) are expressed as relative values, with the activity of the enzyme at room temperature set as 100% (Fig. 7B). These results, together with Figs. 5 and 6, suggest that resveratrol may interact directly with PFK, resulting in a synergistic effect with temperature-mediated enzyme destabilization. Furthermore, these results indicate that the formation of inactive dimers may be the mechanism by which resveratrol mediates PFK inhibition.

PFK loses most of its regulatory properties at pH 8.2, when the tetrameric conformation of the enzyme is favored and the enzyme functions at its maximal velocity. In contrast, a lower pH renders the enzyme more susceptible to inhibition by allosteric regulators [3,9,10,27]. Thus, the effect of resveratrol on the downregulation of PFK activity was analyzed at different pH values. Surprisingly, and in contrast to previous studies demonstrating that PFK is not susceptible to inhibitors at higher pH [3,9], our results show that resveratrol inhibits PFK activity at all pH values above 6 (Fig. 8). In addition, even at pH values at which the enzyme reaches its maximum velocity (pH 8.0 and 8.5), resveratrol maintains its inhibitory effect on enzyme activity (Fig. 9). This result suggests that resveratrol could be modulating PFK activity and, consequently, the energy supply to cancer cells even over a large range of intracellular pH values.

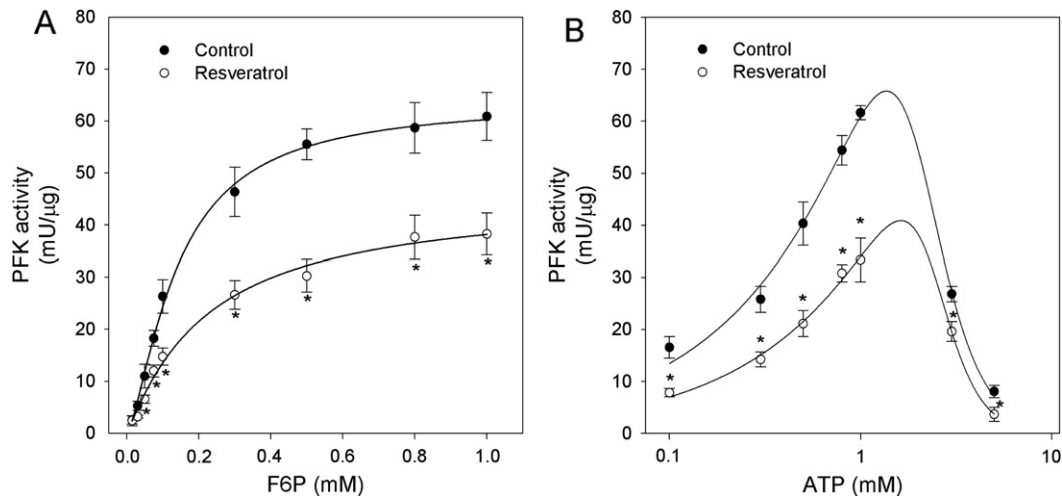


Fig. 4. Effects of resveratrol on purified PFK activity assessed at different concentrations of F6P or ATP. The PFK activity ($1 \mu\text{g/ml}$) was assayed in the absence (filled circles, control) or presence of $15 \mu\text{M}$ of resveratrol (white circles) in the presence of different concentrations of the substrates of enzyme at pH 7.4. Panel A: PFK activity in the presence of varying concentrations of F6P (0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.3, 0.5, 0.8, 1.0 and 2.0 mM). Panel B: PFK activity in the presence of varying concentrations of ATP (0.1, 0.3, 0.5, 0.8, 1.0, 3.0 and 5.0 mM). The PFK activity was measured as described in material and methods. * $P < 0.05$ compared to control (Student's *t*-test). Values are means \pm standard error of five to seven independent experiments ($n = 5-7$).

The effect of pH prompted us to test if the enzyme could respond to other well-characterized negative and positive regulators of PFK. This enzyme is positively modulated by ATP (at concentrations below 1 mM), fructose-2,6-bisphosphate (F2,6BP), phosphorylation, adenosine monophosphate (AMP), ADP and F-actin. In addition, ATP (at concentrations greater than 1 mM), citrate and lactate function as negative modulators of the enzyme [9,10,16]. Therefore, we evaluated the effects of resveratrol on PFK activity in the presence of different positive and negative modulators of the enzyme. Resveratrol inhibits PFK activity by approximately 50% (Fig. 9), in accordance with the effect observed previously for $15 \mu\text{M}$

resveratrol (Fig. 2). However, the inhibitory effect of resveratrol is attenuated by the presence of 100 nM F2,6BP. Furthermore, F-actin ($50 \mu\text{g/ml}$) and ADP (10 mM) are able to partially reverse the resveratrol-mediated inhibition of PFK. ATP (5 mM), citrate (10 mM) and lactate (10 mM) inhibit PFK activity (Fig. 9). In addition to these effects, resveratrol is able to increase the degree of inhibition by citrate and ATP (Fig. 9). Together, these results show that resveratrol can modulate the activity of PFK independently of some positive allosteric factors, such as F-actin and ADP and that the presence of some negative regulatory factors may have additional effects on resveratrol-mediated PFK inhibition.

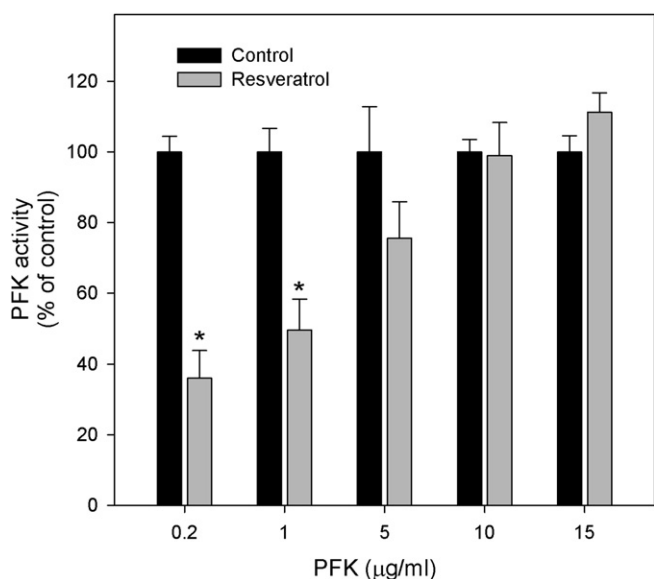


Fig. 5. Effects of resveratrol on purified PFK activity assessed at different concentrations of the enzyme. The PFK activity was assayed in the presence of different enzyme concentrations (0.2, 1, 5, 10 or $15 \mu\text{g/ml}$) in the absence (black bars, control) or presence of $15 \mu\text{M}$ of resveratrol (gray bars) at pH 7.4. The PFK activity was measured as described in material and methods. Values are means \pm standard error of seven to nine independent experiments ($n = 7-9$) and PFK activity for each enzyme concentration was considered as 100%. * $P < 0.05$ compared to respective control (Student's *t*-test).

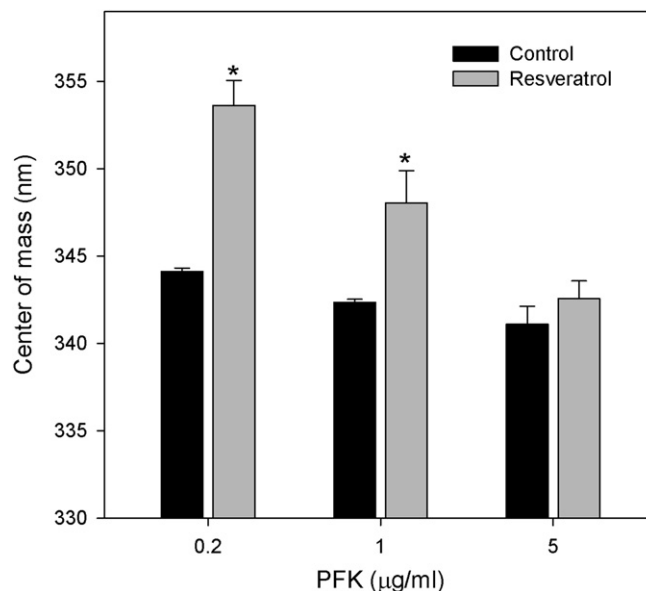


Fig. 6. Effects of resveratrol on the center of mass of PFK intrinsic fluorescence spectra measured at different enzyme concentrations. The center of mass was determined in the presence of different enzyme concentrations (0.2, 1 or $5 \mu\text{g/ml}$) in the absence (black bars, control) or presence (gray bars) of $15 \mu\text{M}$ of resveratrol at pH 7.4. The center of mass was measured as described in material and methods. Values are means \pm standard error of four independent experiments ($n = 4$). * $P < 0.05$ compared to respective control (Student's *t*-test).

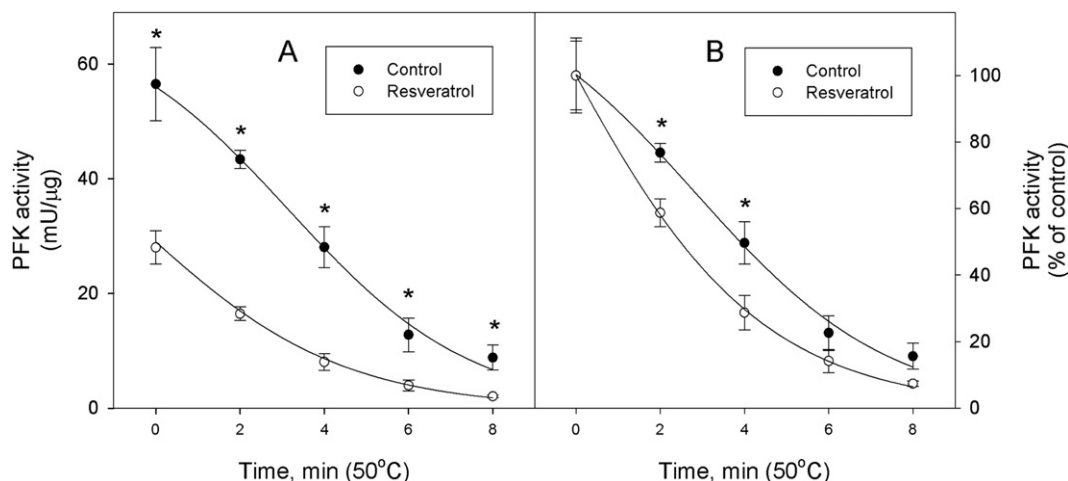


Fig. 7. Effects of resveratrol upon the time course of thermal inactivation of purified PFK. PFK (1 $\mu\text{g/ml}$) was pre-incubated at 50 °C in the absence (filled circles, control) or presence of 15 μM of resveratrol (empty circles) at pH 7.4. At the times indicated on abscissa, aliquots were withdrawn and the PFK activity was measured as described in material and methods. Panel A and panel B represents the absolute and relative PFK activity, respectively. PFK activity without pre-incubation (time 0) was considered as 100% in panel B. Values are means \pm standard error of six independent experiments ($n = 6$). * $P < 0.05$ compared to resveratrol at the same time of pre-incubation (Student's t -test).

4. Discussion

Cancer cells are highly dependent on glucose metabolism to maintain high levels of glycolytic intermediates and to meet the additional requirements for growth, division and proliferation [2,4,5]. This dependence of cancer cells on glucose metabolism, even in the presence of oxygen, is known as the Warburg Effect. Recent studies have provided evidence that inhibition of PFK, the key glycolytic enzyme, may control cell viability in cancer cells [7,24,28,29]. Although the mechanisms mediating these effects are still not clear, PFK inactivation is directly correlated to apoptosis induction, reduced glycolysis and a reduction in the cellular ATP supply [30].

Resveratrol is a phytoalexin that has been demonstrated to possess a wide variety of biological activities, including longevity, antidiabetic and anticancer properties [12,31]. Recently, it was

demonstrated that resveratrol increases cyclic AMP levels by competitively inhibiting phosphodiesterases (PDE), thus leading to the activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) and ameliorating aging-related metabolic phenotypes [32]. In addition, resveratrol has received wide attention for its ability to induce apoptotic cell death in many different cancer cell lines [33–35]. However, its mechanism of action is still unclear.

Here, we have shown that resveratrol decreases MCF-7 breast cancer cell viability, glucose consumption, intracellular ATP content and PFK activity (Fig. 2). Curiously, resveratrol promotes increased lactate production due to the augmented oxidation of glutamine (Fig. 2). This whole picture, i.e. diminished glucose consumption and augmented lactate production due to an increased glutamine

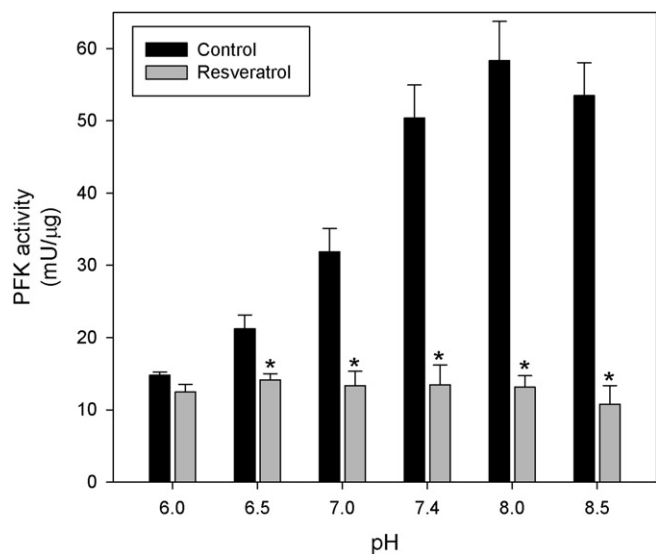


Fig. 8. Effects of resveratrol on purified PFK activity assessed at different pHs. The PFK activity (1 $\mu\text{g/ml}$) was assayed in the absence (black bars, control) or presence (gray bars) of 15 μM of resveratrol at different pHs (6.0, 6.5, 7.0, 7.4, 8.0 or 8.5). The PFK activity was measured as described in material and methods. Values are means \pm standard error of six independent experiments ($n = 6$). * $P < 0.05$ compared to respective control (Student's t -test).

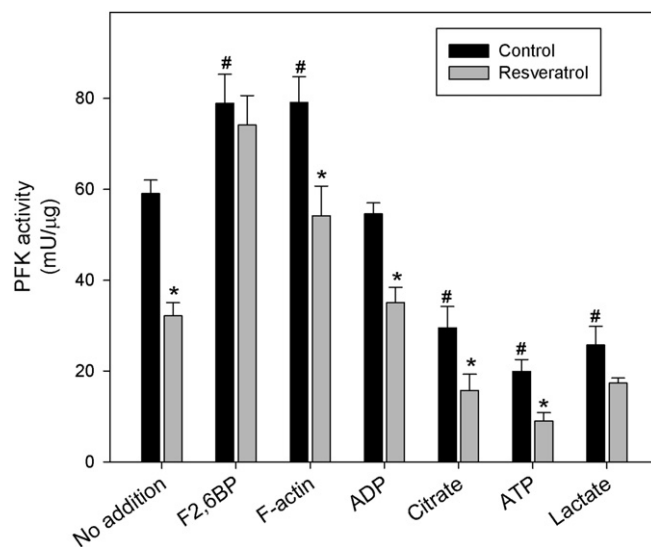


Fig. 9. Effects of resveratrol on purified PFK activity assessed in the presence of different negatives and positives enzyme regulators. The effects of positive modulators (100 nM F2,6BP, 50 $\mu\text{g/ml}$ F-actin or 10 mM ADP) and negative modulators (10 mM citrate, 5 mM ATP or 10 mM lactate) upon PFK activity (1 $\mu\text{g/ml}$) was assayed in the absence (black bars, control) or presence (gray bars) of 15 μM of resveratrol at pH 7.4. The PFK activity was measured as described in materials and methods. Values are means \pm standard error of seven independent experiments ($n = 7$). * $P < 0.05$ compared to respective control in the absence of resveratrol (Student's t -test). # $P < 0.05$ compared to control in the absence of resveratrol (Student's t -test).

oxidation, has been reported as a consequence of activation of hedgehog signaling pathway [36], which has been described to be activated by resveratrol [37]. These metabolic alterations are directly correlated with the induction of apoptosis [30,37]. Furthermore, with the exception of increased lactate production, these effects were observed in the presence of low resveratrol concentrations (2.5–10 μM) similar to those used in other studies [38,39].

Previous work from our group has shown that clotrimazole, an antifungal agent, and acetylsalicylic acid, an anti-inflammatory drug, modulate cancer cell viability by directly targeting PFK [4,7,24,28]. In addition, clotrimazole disrupts glycolysis in human breast cancer without affecting non-tumoral tissues [11]. In the present study, we found that resveratrol also specifically inhibits purified PFK in a concentration-dependent manner (Fig. 3). The specificity for resveratrol inhibition of PFK is even stronger, as evidenced by the observation that the inhibitory concentrations are similar in the cell culture (Fig. 2D) and for the purified PFK (Fig. 3). However, the intracellular concentrations of resveratrol were not determined.

Cancer cells express all isoforms of PFK [1], while skeletal muscle cells express only PFK-M [21], and once translated, PFK monomers can rapidly associate into homo- or heterooligomers [21,27]. Thus, the results suggest that PFK-M is a possible target of resveratrol. However, it is difficult to know if resveratrol could specifically modulate the other isoforms (L and P) given the rapid formation of heterooligomers composed of M, L and P isoforms.

PFK can be regulated by the oligomeric transition between tetramers and dimers, which are much less active than tetramers. This enzyme can also be negatively regulated by physiological effectors such as ATP (>1 mM), citrate and lactate. Some drugs also negatively modulate the enzyme by promoting dissociation of tetramers into dimers [7,24,28]. However, these inhibitors are counteracted by positive regulators such as F2,6BP and ADP [3,22,26,29,40]. Our results suggest that resveratrol also downregulates PFK through dissociation of the enzyme tetramers into dimers, as detected by the increased center of mass of the PFK intrinsic fluorescence spectrum (Fig. 6). In agreement with these results, resveratrol has an additional effect on PFK inhibition by ATP (>1 mM) (Fig. 9), citrate (Fig. 9) and high temperature (50 °C) (Fig. 7), all of which accelerate the loss of enzyme activity by promoting dimerization. However, increasing the concentration of the enzyme, which favors the formation of tetramers, prevents the PFK inhibition caused by resveratrol. In addition, it is interesting that resveratrol inhibits PFK even at higher pH values (Fig. 8) because we expected that these conditions (pH 8.0 and 8.5) would stabilize more complex oligomeric forms of the enzyme and thereby prevent inhibition. Thus, resveratrol may prevent oligomerization of the enzyme and reduce its maximal activity. This effect suggests that resveratrol could act over the wide range of intracellular pH values observed in tumors [41].

Altogether, our results indicate that resveratrol decreases cell viability in the human breast cancer cell line MCF-7 by reducing glucose consumption and ATP content, an effect that could be related to PFK inhibition. This relationship is supported by results demonstrating that resveratrol directly inhibits the activity of purified PFK, thus suggesting a new target in the mechanism through which resveratrol induces its antitumorogenic effects.

Author contributions

Lilian Sales Gomez performed most of the experiments with the purified enzyme. Patricia Zancan and Mariah C. Marcondes performed the cell culture experiments. Livia Ramos-Santos performed some of the experiments with the purified enzyme. Mauro

Sola-Penna and José Roberto Meyer-Fernandes designed the study and were involved in the analysis and interpretation of the results. Daniel da Silva designed the study performed the experiments with the purified enzyme was involved in the analysis and interpretation of the results and wrote the manuscript.

Funding

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

References

- [1] P. Zancan, M. Sola-Penna, C.M. Furtado, D. Da Silva, Differential expression of phosphofructokinase-1 isoforms correlates with the glycolytic efficiency of breast cancer cells, *Mol. Genet. Metab.* 100 (2010) 372–378.
- [2] M.E. Beckner, M.L. Stracke, L.A. Liotta, E. Schiffmann, Glycolysis as primary energy source in tumor cell chemotaxis, *J. Natl. Cancer Inst.* 82 (1990) 1836–1840.
- [3] 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.
- [4] C.M. Furtado, M.C. Marcondes, M. Sola-Penna, M.L.S. de Souza, P. Zancan, Clotrimazole preferentially inhibits human breast cancer cell proliferation, viability and glycolysis, *PLoS ONE* 7 (2012) e30462.
- [5] S.Y. Lunt, M.G. Vander Heiden, Aerobic glycolysis: Meeting the metabolic requirements of cell proliferation, in: R.G.L.L.R. Schekman (Ed.), *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, vol. 27, 2011, pp. 441–464.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] G.A. Dunaway, T.P. Kasten, T. Sebo, R. Trapp, Analysis of the phosphofructokinase subunits and isoenzymes in human tissues, *Biochem. J.* 251 (1988) 677–683.
- [9] M. Sola-Penna, D. Da Silva, W.S. Coelho, M.M. Marinho-Carvalho, P. Zancan, Regulation of mammalian muscle type 6-phosphofructo-1-kinase and its implication for the control of the metabolism, *IUBMB Life* 62 (2010) 791–796.
- [10] K. Uyeda, Phosphofructokinase, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 48 (1979) 193–244.
- [11] R.G. Coelho, I.d.C. Calaca, D.d.M. Celestrini, A.H. Correia, M.A. Silva Magalhaes Costa, M. Sola-Penna, Clotrimazole disrupts glycolysis in human breast cancer without affecting non-tumoral tissues, *Mol. Genet. Metab.* 103 (2011) 394–398.
- [12] J.K. Kundu, Y.J. Surh, Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol: mechanistic perspectives, *Cancer Lett.* 269 (2008) 243–261.
- [13] S. Fulda, K.M. Debatin, Sensitization for anticancer drug-induced apoptosis by the chemopreventive agent resveratrol, *Oncogene* 23 (2004) 6702–6711.
- [14] A. Kueck, A.W. Opiari Jr., K.A. Griffith, L. Tan, M. Choi, J. Huang, H. Wahl, J.R. Liu, Resveratrol inhibits glucose metabolism in human ovarian cancer cells, *Gynecol. Oncol.* 107 (2007) 450–457.
- [15] 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.
- [16] T.C. Leite, R.G. Coelho, D.D. Silva, W.S. Coelho, M.M. Marinho-Carvalho, M. Sola-Penna, Lactate downregulates the glycolytic enzymes hexokinase and phosphofructokinase in diverse tissues from mice, *FEBS Lett.* 585 (2011) 92–98.
- [17] M. Sola-Penna, A.C. dos Santos, G.G. Alves, T. El-Bacha, J. Faber-Barata, M.F. Pereira, F.C. Serejo, A.T. Da Poian, M. Sorenson, A radioassay for phosphofructokinase-1 activity in cell extracts and purified enzyme, *J. Biochem. Biophys. Methods* 50 (2002) 129–140.
- [18] 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.
- [19] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [20] R.G. Kemp, Phosphofructokinase from rabbit skeletal muscle, *Methods Enzymol.* 42 (1975) 71–77.
- [21] L.K. Hesterberg, J.C. Lee, H.P. Erickson, Structural-properties of an active form of rabbit muscle PHOSPHOFRUCTOKINASE, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 9724–9730.

- [22] 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* 1794 (2009) 1175–1180.
- [23] E. Pozo-Guisado, J.M. Merino, S. Mulero-Navarro, M.J. Lorenzo-Benayas, F. Centeno, A. Alvarez-Barrientos, P.M.F. Salguero, Resveratrol-induced apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells involves a caspase-independent mechanism with downregulation of Bcl-2 and NF-kappa B, *Int. J. Cancer* 115 (2005) 74–84.
- [24] 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.
- [25] J. Faber-Barata, M. Sola-Penna, Opposing effects of two osmolytes—trehalose and glycerol—on thermal inactivation of rabbit muscle 6-phosphofructo-1-kinase, *Mol. Cell Biochem.* 269 (2005) 203–207.
- [26] P. Zancan, M.M. Marinho-Carvalho, J. Faber-Barata, J.M. Dellias, M. Sola-Penna, ATP and fructose-2,6-bisphosphate regulate skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase by altering its quaternary structure, *IUBMB Life* 60 (2008) 526–533.
- [27] M.A. Luther, J.C. Lee, The role of phosphorylation in the interaction of rabbit muscle phosphofructokinase with F-actin, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 1753–1759.
- [28] M.C. Marcondes, M. Sola-Penna, P. Zancan, Clotrimazole potentiates the inhibitory effects of ATP on the key glycolytic enzyme 6-phosphofructo-1-kinase, *Arch. Biochem. Biophys.* 497 (2010) 62–67.
- [29] J. Grechi, M. Marinho-Carvalho, P. Zancan, L.P. Cinelli, A.M.O. Gomes, M.L. Rodrigues, L. Nimrichter, M. Sola-Penna, Glucuronoxylomannan from *Cryptococcus neoformans* Down-regulates the Enzyme 6-Phosphofructo-1-kinase of Macrophages, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 14820–14829.
- [30] 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.
- [31] J.A. Baur, K.J. Pearson, N.L. Price, H.A. Jamieson, C. Lerin, A. Kalra, V.V. Prabhu, J.S. Allard, G. Lopez-Lluch, K. Lewis, P.J. Pistell, S. Poosala, K.G. Becker, O. Boss, D. Gwinn, M. Wang, S. Ramaswamy, K.W. Fishbein, R.G. Spencer, E.G. Lakatta, D. Le Couteur, R.J. Shaw, P. Navas, P. Puigserver, D.K. Ingram, R. de Cabo, D.A. Sinclair, Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet, *Nature* 444 (2006) 337–342.
- [32] S.-J. Park, F. Ahmad, A. Philp, K. Baar, T. Williams, H. Luo, H. Ke, H. Rehmann, R. Taussig, A.L. Brown, M.K. Kim, M.A. Beaven, A.B. Burgin, V. Manganiello, J.H. Chung, Resveratrol Ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases, *Cell* 148 (2012) 421–433.
- [33] J. Dorrie, H. Gerauer, Y. Wachter, S.J. Zunino, Resveratrol induces extensive apoptosis by depolarizing mitochondrial membranes and activating caspase-9 in acute lymphoblastic leukemia cells, *Cancer Res.* 61 (2001) 4731–4739.
- [34] J.W. Park, Y.J. Choi, S.I. Suh, W.K. Baek, M.H. Suh, I.N. Jin, D.S. Min, J.H. Woo, J.S. Chang, A. Passaniti, Y.H. Lee, T.K. Kwon, Bcl-2 overexpression attenuates resveratrol-induced apoptosis in U937 cells by inhibition of caspase-3 activity, *Carcinogenesis* 22 (2001) 1633–1639.
- [35] M.H. Aziz, R. Kumar, N. Ahmad, Cancer chemoprevention by resveratrol: In vitro and in vivo studies and the underlying mechanisms (Review), *Int. J. Oncol.* 23 (2003) 17–28.
- [36] R. Teperino, S. Amann, M. Bayer, S.L. McGee, A. Loipetzberger, T. Connor, C. Jaeger, B. Kammerer, L. Winter, G. Wiche, K. Dalgaard, M. Selvaraj, M. Gaster, R.S. Lee-Young, M.A. Febbraio, C. Knauf, P.D. Cani, F. Aberger, J.M. Penninger, J.A. Pospisilik, H. Esterbauer, Hedgehog partial agonism drives Warburg-like metabolism in muscle and brown fat, *Cell* 151 (2012) 414–426.
- [37] W. Mo, X. Xu, L. Xu, F. Wang, A. Ke, X. Wang, C. Guo, Resveratrol inhibits proliferation and induces apoptosis through the hedgehog signaling pathway in pancreatic cancer cell, *Pancreatol. Official Journal of the International Association of Pancreatol.* 11 (2011) 601–609.
- [38] A.J. Gescher, W.P. Steward, Relationship between mechanisms, bioavailability, and preclinical chemopreventive efficacy of resveratrol: a conundrum, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 12 (2003) 953–957.
- [39] S. Shankar, G. Singh, R.K. Srivastava, Chemoprevention by resveratrol: molecular mechanisms and therapeutic potential, *Front. Biosci.* 12 (2007) 4839–4854.
- [40] M.M. Marinho-Carvalho, P. Zancan, M. Sola-Penna, Modulation of 6-phosphofructo-1-kinase oligomeric equilibrium by calmodulin: formation of active dimers, *Mol. Genet. Metab* 87 (2006) 253–261.
- [41] X. Zhang, Y. Lin, R.J. Gillies, Tumor pH and its measurement, *J. Nucl. Med.* 51 (2010) 1167–1170.