



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

**MECANISMOS ANTITUMORAIS DOS SALICILATOS:  
ESTRATÉGIAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE ALVOS  
TERAPÊUTICOS**

**Lívia Ramos dos Santos**

2014

**Lívia Ramos dos Santos**

**MECANISMOS ANTITUMORAIS DOS SALICILATOS: ESTRATÉGIAS  
PARA IDENTIFICAÇÃO DE ALVOS TERAPÊUTICOS**

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

**Orientador: Prof. Mauro Sola-Penna**

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

**2014**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Santos, Livia Ramos dos

Mecanismos antitumorais dos salicilatos: estratégias para identificação de alvos terapêuticos / Livia Ramos dos Santos. -- Rio de Janeiro: UFRJ / Faculdade de Farmácia, 2014.

xvi, 32 f. : il. ; 31 cm.

Orientador: Mauro Sola-Penna

Dissertação (mestrado) – UFRJ, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2014.

Referências bibliográficas: f. 41- 48

1. Neoplasias da Mama - metabolismo. 2. Fosfofrutoquinase-1 - metabolismo. 3. Sobrevivência Celular - efeitos de drogas. 4. Células MCF-7. 5. Salicilatos - farmacologia. 6. GlucosefosfatoDesidrogenase - metabolismo. 7. Humanos. 8. Ciências Farmacêuticas - Tese. I. Sola-Penna, Mauro. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2014. III. Título.

**LÍVIA RAMOS DOS SANTOS**

**“MECANISMOS ANTITUMORAIS DOS SALICILATOS: ESTRATÉGIAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE ALVOS TERAPÊUTICOS”**

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

Aprovada em 16 de julho de 2014

Orientador:

---

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

Coorientadora:

---

Professora Patrícia Zancan  
Professora Adjunta da Faculdade de Farmácia, UFRJ

Banca Examinadora:

---

Professora Ana Luísa Palhares de Miranda  
Professora Associada da Faculdade de Farmácia, UFRJ

---

Professor David Majerowicz  
Professor Adjunto da Faculdade de Farmácia, UFRJ

---

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



Este trabalho foi realizado no Laboratório de Enzimologia e Controle do Metabolismo- LabECoM- e no Laboratório de Oncobiologia Molecular – LabOMol, Departamento de Biotecnologia Farmacêutica (BioTEcFar) Faculdade de Farmácia, CCS/ UFRJ, sob a orientação do Professor Mauro Sola-Penna e 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) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ)

## AGRADECIMENTOS

Ao começar a escrever meus agradecimentos, dou-me conta do quão especial é o lugar que ele ocupa nessa dissertação. O seu lugar está bem aqui, no início de tudo e antes de tudo! Os agradecimentos são sempre um ato envolto em receio; receio de esquecer um, de não fazer jus ao outro. Ao começar a escrever, não poderia entregar esse trabalho sem agradecer a todos que foram bênçãos em minha vida, que direta ou indiretamente participaram desse momento.

- ❖ Agradeço à Deus por ser abençoada em ter uma família maravilhosa, pelo qual foi a minha fortaleza e base crucial para minha grande conquista.
- ❖ Aos meus pais Maria Aparecida e Natanael, que juntos formam uma pessoa só e sempre foram os grandes incentivadores nesta minha caminhada.
- ❖ Mãe, seu cuidado e dedicação foram o que me deram, em vários momentos, a esperança e a confiança para seguir em frente.
- ❖ Pai, saber que posso contar com sua presença, significou segurança e certeza de que não estou sozinho nessa caminhada.
- ❖ Agradeço a minha irmã Marília pelo convívio, paciência, os conselhos, os puxões de orelha e que sem dúvida ajudou muito no meu amadurecimento e a finalização dessa conquista, obrigada Xú!
- ❖ Agradeço a minha irmã Franciny, seu apoio e sua experiência fizeram com que não tivesse medo de enfrentar os problemas, isto juntamente com seu marido e meu cunhado predileto Fabiano, que também não deixava de dizer: “eu já sabia Livinha, que a vitória era certa”, antes mesmo fazer a prova para mestrado. O meu muito obrigada!
- ❖ Ao meu orientador, meu mestre, Mauro Sola-Penna por ter acreditado em um simples e-mail, pedindo para fazer o mestrado em seu laboratório sem ao menos saber de onde vinha...?! (Sapucaia próximo de Três Rios). Brincadeiras à parte, você tornou possível o meu sonho, ao qual sempre achei ser muito distante da realidade ou até mesmo impossível. Você fez da

minha caminhada no seu laboratório uma escadaria, e a cada dia eu tinha um desafio novo a ser vencido. Sem dúvidas, isto só foi possível porque você acreditou na minha capacidade, no meu potencial, e na perseverança para nunca desistir de projeto algum, que tudo isso só faria parte de um grande aprendizado em minha vida e trajetória. À você Mauro, meus sinceros agradecimentos, por todos os conhecimentos compartilhados, por auxiliar no meu amadurecimento, por incentivar-me sempre a crescer e por confiar em mim, tornou-se para mim um exemplo a ser seguido e a quem devo o sucesso dessa trajetória. O meu muito obrigada! Assinado Gênia.

- ❖ A professora Patrícia, por ser sempre muito solícita e que por fim adotou-me em seu laboratório para que pudéssemos finalizar o meu trabalho de dissertação. Agradeço-a por compartilhar de seus conhecimento, seus “truques” de beleza (deixei de ser monacrespa para virar monalisa,rsrsrs) o meu muito obrigada por fazer parte dessa vitória!
- ❖ Não podemos esquecer dos amigos dos laboratórios LabECoM e LaboMol, não citarei os seus nomes como disse anteriormente. “Receio de esquecer um, de não fazer jus ao outro”... mas saibam que eu tenho por todos vocês um carinho, admiração, respeito, pois cada um em algum momento dessa minha caminhada, deixou comigo um pouco do seu conhecimento, da sua experiência, o que fez somar para que hoje pudesse chegar até o final.
- ❖ Aos amigos de Sapucaia, em especial a Flávia e o Maycon, que por muitas vezes compartilharam os meus momentos de angústia, tristeza, mas que sem dúvida fizeram que todos esses momentos tornassem momentos alegres e divertidos. A vocês o meu muito obrigada de coração!
- ❖ De modo geral, é preciso destacar o afeto, solidariedade e compreensão dos parentes. Sem o apoio dessas inumeráveis pessoas, a execução desse trabalho não teria sido possível.

Obrigada!

## DEDICATÓRIA

Ao meu querido avô José Raimundo Ramos (*in memoria*)  
Se gritar o seu nome, sei que não vai atender-me,  
pois agora restou comigo as melhores lembranças.  
Não vou lamentar, apenas quero que você saiba,  
que aprendi muito com você.  
Se hoje sou o que sou, foi por você.  
Se hoje choro, é porque está muito difícil te esquecer!  
São saudades que ficarão guardadas em meu peito.  
Então, meu muito obrigada por ter tido a honra  
de ser sua neta e compartilhar  
momentos felizes que estive ao seu lado.



*“De tudo na vida ficaram três coisas:  
a certeza de estarmos sempre começando...  
a certeza de que é preciso continuar...  
a certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar...  
Portanto devemos:  
Fazer das interrupções um caminho novo...  
da queda, um passo de dança...  
do medo, uma escada...  
do sonho, uma ponte...  
e da procura, um encontro.”  
(Fernando Sabino)*

## RESUMO

Células tumorais apresentam diversas adaptações metabólicas que as permitem apresentar altas taxas de crescimento. Dentre estas adaptações metabólicas, está o efeito Warburg, que se caracteriza pela alta taxa de fermentação láctica realizada mesmo com o fornecimento adequado de oxigênio para a célula. A caracterização dessas alterações tem permitido a identificação de novos alvos para o desenvolvimento de terapias antitumorais. Os salicilatos têm apresentado diversos efeitos antitumorais, além do efeito anti-inflamatório previamente proposto. Assim, o objetivo deste trabalho é investigar os efeitos dos salicilatos sobre as vias metabólicas de células tumorais. Para isto, as células MCF-7 de câncer de mama foram incubadas com concentrações crescentes de ácido acetilsalicílico e ácido salicílico e o efeito desses sobre diferentes alvos metabólicos foram avaliados. Os salicilatos inibiram a atividade da glicose-6-fostato desidrogenase (G6PDH) de forma dependente da concentração, sendo esta inibição de 100% na maior concentração (10 mM). A atividade da fosfofrutocinase também apresentou significativa inibição por estes fármacos, apresentando uma atividade residual de 20% na dose de 10 mM. Para avaliar a integridade de membrana, a atividade da lactato desidrogenase (LDH) foi medida. A atividade da LDH aumentou no sobrenadante diretamente proporcional ao aumento da concentração dos fármacos, evidenciando uma perda de integridade membranar. Por fim, o potencial redutor mitocondrial foi avaliado através do ensaio de MTT, demonstrando uma diminuição significativa da capacidade redutora mitocondrial de forma dependente da concentração de salicilatos. Estes resultados evidenciam uma diminuição da capacidade redutora celular, evidenciada pela inibição de G6PDH e consequente redução no MTT, o que pode levar à alteração química de lipídios de membrana e consequente extravasamento de conteúdo intracelular. Este trabalho suporta o início de um caminho na investigação dos efeitos metabólicos dos salicilatos em células tumorais, sugerindo a G6PDH como um importante alvo metabólico.

**Palavras-Chave:** glicose-6-fostato desidrogenase, salicilatos, câncer, metabolismo redox, MCF-7.

## ABSTRACT

Tumor cells present several metabolic adaptations that allow them to grow rapidly. Among these metabolic adaptations is the Warburg effect, which is characterized by high rate of lactic fermentation carried out even with an adequate supply of oxygen to the cell. The characterization of these changes has allowed the identification of new targets for the development of anti-tumor therapies. Salicylate has presented several anti-tumor actions, in addition to the previously proposed anti-inflammatory effect and. Thus, the aim of this work was to investigate the effects of salicylates on metabolic pathways of tumor cells. For this purpose, MCF-7 breast cancer cell line was incubated with increasing concentrations of (TRADUZIR) ácido acetilsalicílico e ácido salicílico and their effect on different metabolic targets was assessed. Salicylates inhibit the activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) in a concentration-dependent manner, with 100% inhibition at the highest concentration (10 mM). The PFK activity also showed significant inhibition by these drugs, with a residual activity of 20% at a dose of 10 mM. To assess membrane integrity, the activity of lactate dehydrogenase was measured. The LDH activity increased in the supernatant directly proportional to the increasing concentration, indicating a loss of membrane integrity. Finally, reduction of mitochondrial redox potential was assessed by MTT assay demonstrating a significant decrease in mitochondrial reductive capacity in salicylate concentration-dependent manner. These results show a decrease in cell reducing capacity, as evidenced by the inhibition of G6PDH and consequent MTT reduction, which may lead to chemical modification of membrane lipids and consequent leakage of intracellular content. This work supports the beginning of a journey in investigating the metabolic effects of salicylates in tumor cells, suggesting G6PDH as an important metabolic target.

Keys Words: glucose-6-phosphate dehydrogenase, salicylates, cancer, metabolism redox, MCF-7.

## LISTA DETABELAS E ILUSTRAÇÕES

<b>TABELA 1.</b> Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 por sexo no Brasil, exceto pele não melanoma.....	<b>17</b>
<b>FIGURA 1.</b> Marcadores do processo tumorigênico.....	<b>21</b>
<b>FIGURA 2.</b> Glicólise, Ácido Tricarboxílico, Cadeia de Transporte de elétrons e Via das pentoses.....	<b>24</b>
<b>FIGURA 3.</b> Atividade enzimática da glicose-6-fosfato desidrogenase.....	<b>32</b>
<b>FIGURA 4.</b> Atividade enzimática da fosfofrutocinase.....	<b>33</b>
<b>FIGURA 5.</b> Integridade membranar.....	<b>34</b>
<b>FIGURA 6.</b> Atividade mitocondrial.....	<b>35</b>
<b>FIGURA 7.</b> Visão global do metabolismo em tumores.....	<b>38</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AAS** Ácido acetilsalicílico
- ADP** Adenosina difosfato
- AINES** Anti-inflamatórios não esteroidais
- ATP** Adenosina trifosfato
- AS** Ácido salicílico
- 1,3- BPG** 1,3-Bifosfoglicerato
- Bcl<sub>2</sub>**Linfoma de células B 2
- COX**Ciclo-oxigenase
- COX-2**Isoforma2 ciclo-oxigenase
- DMEM** Meio de Eagle modificado por Dulbecco
- DMSO** Dimetilsulfóxido
- ERO** Espécies reativas de oxigênio
- F6P** Frutose 6-fosfato
- FADH<sub>2</sub>** Flavina adenina dinucleotídeo
- FBP** Frutose-1,6-bisfosfato
- G6P** Glicose-6-fosfato
- G6PDH** Glicose-6-fosfato desidrogenase
- GAP** Gliceraldeído-3-fosfato
- GLUT** Transportador de glicose
- GSH** Glutationa reduzida

**GSSG** Glutathiona forma oxidada

**HIF-1 $\alpha$**  Fator induzido por hipóxia-1 alfa

**HK** Hexocinase

**IDH-2** Isocitratodesidrogenaseisoforma2

**INCA** Instituto Nacional de Câncer

**LDH** Lactato desidrogenase

**MTT** Brometo de 3,4,5-dimetilazol-2,5-difeniltetrazólio

**NAD<sup>+</sup>** Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma oxidada

**NADH** Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida

**NADP<sup>+</sup>** Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma oxidada

**NADPH** Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida

**OMS** Organização Mundial da Saúde

**PBS** Solução salina tamponada com fosfato

**PDH** Piruvatodesidrogenase

**PDK** Piruvatodesidrogenasecinase

**PFK** Fosfofrutocinase

**PK** Piruvatocinase

**PEP** Fosfoenolpiruvato

**3PG3**-Fosfoglicerato

**TCA** Ácido tricarboxílico

**TRX** Tioredoxina

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	17
1.1 CÂNCER	17
1.2 METABOLISMO ENERGÉTICO	22
1.3 UTILIZAÇÃO DOS SALICILATOS PARA TRATAMENTO DO CÂNCER	25
<b>2 OBJETIVOS</b>	28
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	29
3.1 MATERIAIS	29
3.2 CULTURA DE CÉLULAS	29
3.3 TESTE DE ATIVIDADE MITOCONDRIAL	29
3.4 AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE MEMBRANAR	30
3.5 DOSAGEM DA ATIVIDADE DA ENZIMA PFK E DA G6PDH	30
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS	31
<b>4 RESULTADOS</b>	32
ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA G6PDH NA PRESENÇA DE AS E AAS	32
ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA PFK NA PRESENÇA DE AS E AAS	33
ATIVIDADE DA LACTATO DESIDROGENASE	34

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MITOCONDRIAL	35
<b>5 DISCUSSÃO</b>	<b>36</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b>	<b>40</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>41</b>
<b>8 APÊNDICE- TRABALHO PUBLICADO DURANTE MESTRADO</b>	<b>48</b>





# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Câncer

Atualmente o câncer é considerado como a doença do século, convertendo-se em um evidente problema de saúde pública mundial. Segundo os dados fornecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS), há uma projeção de 27 milhões de novos casos de câncer para o ano de 2030 em todo o mundo, além de 17 milhões de mortes pela doença, afetando principalmente os países em desenvolvimento, dentre eles o Brasil (OMS, 2013; INCA, 2014).

No Brasil, a estimativa segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA) é de aproximadamente 394 mil novos casos de câncer para o ano de 2014, que também será válida para o ano de 2015, acarretando 204 mil novos casos para o sexo masculino e 190 mil para o sexo feminino, não incluindo o câncer de pele não melanoma que é significativo no nosso país (INCA, 2014). O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente (excetuando o câncer de pele não melanoma), sendo o primeiro dentre as mulheres (TABELA 1).

Localização primária	casos novos	%			Localização primária	casos novos	%
Próstata	68.800	22,8%			Mama Feminina	57.120	20,8%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	5,4%	Homens	Mulheres	Cólon e Reto	17.530	6,4%
Cólon e Reto	15.070	5,0%			Colo do Útero	15.590	5,7%
Estômago	12.870	4,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
Cavidade Oral	11.280	3,7%			Glândula Tireoide	8.050	2,9%
Esôfago	8.010	2,6%			Estômago	7.520	2,7%
Laringe	6.870	2,3%			Corpo do Útero	5.900	2,2%
Bexiga	6.750	2,2%			Ovário	5.680	2,1%
Leucemias	5.050	1,7%			Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%
Sistema Nervoso Central	4.960	1,6%			Leucemias	4.320	1,6%

**Tabela 1- Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 por sexo no Brasil, exceto pele não melanoma (Retirado de INCA, 2014).**

O termo câncer é empregado para designar mais de uma centena de diferentes doenças que são caracterizadas por alterações nas células normais, o

que causa posteriormente o desenvolvimento de células anormais que se caracterizam por apresentarem um mal funcionamento no metabolismo celular levando a um crescimento desordenado e comprometendo tecidos e órgãos, sendo chamado de tumor (BINES, 2013; LIAN et al., 2013; CHEUNG et al., 2013).

O tumor é dividido em maligno e benigno. O maligno manifesta crescimento desordenado, sendo invasivo podendo espalhar-se para outros tecidos e órgãos caracterizando a metástase comum nesse tipo de tumor. Ao contrário do tumor benigno que tem crescimento de forma organizada e lento, apresentando limites nítidos e muito das vezes pode ser removido, e na maioria dos casos, não espalham para outras partes do corpo (SERGEI et al., 2010).

O comportamento dos diferentes tipos de câncer está relacionado a múltiplos fatores como sexo, idade, predisposição genética, exposição à irradiação ionizante e mutações genéticas. Sendo o câncer considerado uma doença genética, isso significa que uma célula normal ao replicar, começa a apresentar erros na transferência de genes tumorais, as cópias dos genes normais apresentaram mutações genética que são as células mutadas (NIGRO et al., 1989; FOSTER, 2008). As mutações genéticas são caracterizadas pelos oncogenes, que podem aumentar nos números de cópias gênicas ou até mesmo a simples troca de um único nucleotídeo já caracteriza uma alteração muito frequente na neoplasia (NIGRO et al., 1989; FOSTER, 2008).

Uma mutação muito frequente em tumores sólidos ocorre com a atuação de outra classe de genes, os genes supressores tumorais, que podem sofrer deleção ou lesão, levando a uma alteração neoplásica. Temos como exemplo o gene TP53 (NIGRO et al., 1989; FOSTER, 2008). Este gene codifica uma fosfoproteína nuclear *p53*, que apresenta um papel importante na sua forma normal que é a supressão da transformação neoplásica, no entanto, as mutações do gene resultam na incapacidade de interromper o ciclo celular ou desencadear a apoptose de tal gene que expõem a célula a um elevado risco (WARD et al., 2012; BANERJI e GIBSON, 2012; JANG et al., 2013).

Sabendo que as células tumorais apresentam alterações de correntes da influência dos vários tipos de fatores já descritos acima, outras características vêm

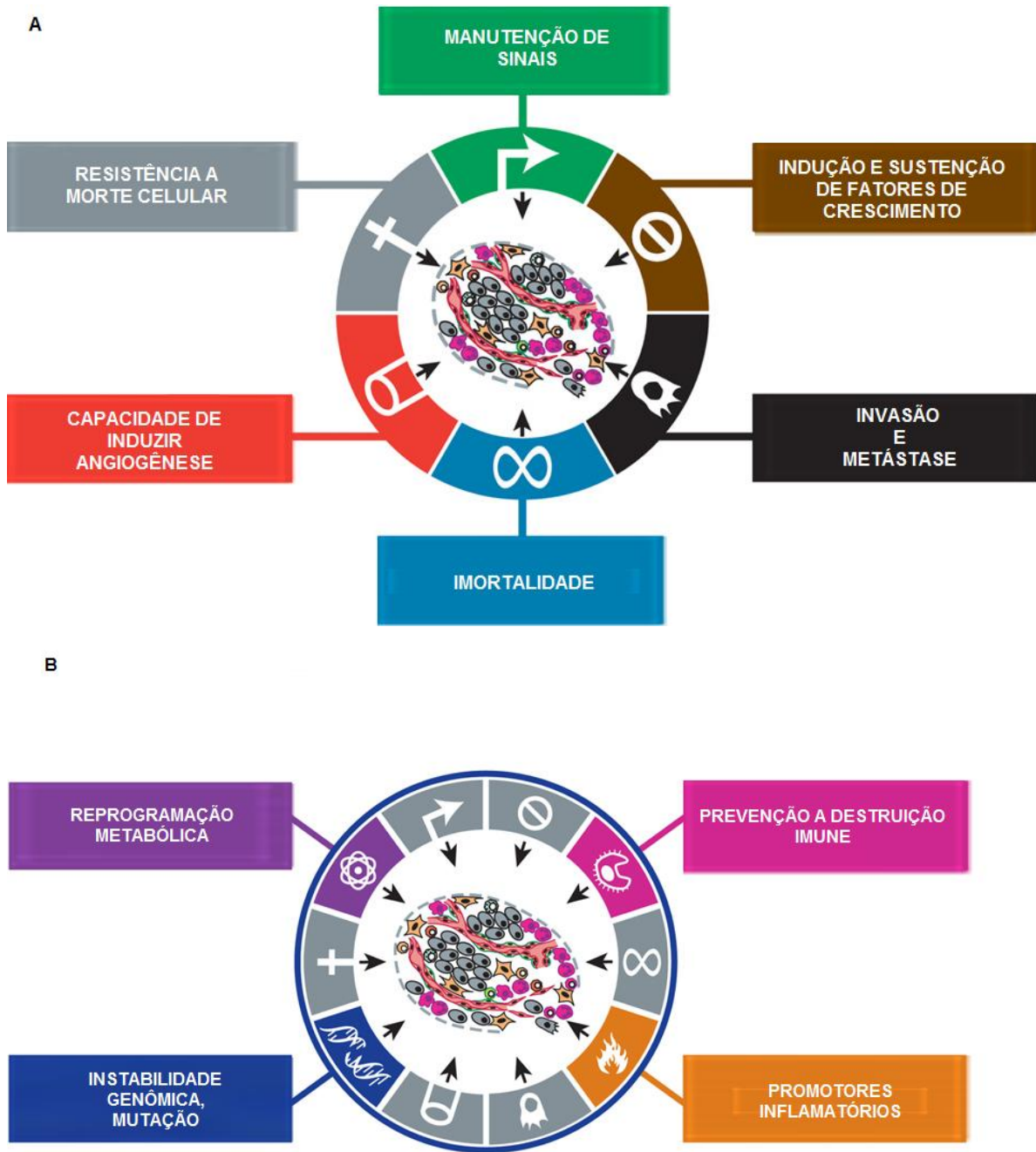
sendo listadas para complemento e o melhor entendimento da complexidade das células tumorais (HANAHAHAN e WEINBERG, 2011; NEILI, 2012). São eles: a capacidade de induzir angiogênese, invasão e metástase, imortalidade, resistência à morte celular, indução e sustentação de fatores de crescimento, bem como manutenção de sinais proliferativos (HANAHAHAN e WEINBERG, 2011; FIGURA 1A).

No entanto, atualmente, quatro novas características foram incluídas na lista sugerindo mecanismos adicionais as células tumorais, que são: prevenção da destruição imune, promotores inflamatórios, instabilidade genômica e a reprogramação metabólica celular (HANAHAHAN e WEINBERG, 2011; FIGURA 1B).

A reprogramação metabólica tem sido considerada uma característica emergente da célula tumoral, que estaria envolvida na disfunção do metabolismo energético de forma a sustentar as elevadas demandas proliferativas, sendo assim elas necessitam bastante de fontes energéticas para aumentar em tamanho para a replicação do seu DNA que demanda de grandes quantidades de proteínas, lipídeos e nucleotídeos (TENNANT et al.,2010; GANAPATHY-KANNIAPPAN e GESCHWIND, 2013).

Otto Warburg observou que em tecidos proliferativos normais e células tumorais, tanto na presença quanto na ausência de O<sub>2</sub> há um aumento da conversão de glicose a lactato ao invés da metabolização mediante a fosforilação oxidativa (Efeito Warburg ou glicólise aeróbica) (VANDER HEINDER et al., 2009). Com isso Warburg levantou a hipótese que devido às células proliferarem rapidamente suas mitocôndrias, estas estariam defeituosas, o que forçaria o metabolismo glicolítico. No entanto, agora está bem claro que a fosforilação oxidativa não está comprometida nas células tumorais (ZU e GUPPY, 2004). Como exemplo, no estudo com células de mama knockdown para *p32*, em gene altamente expresso em células tumorais, a mudança no metabolismo de fosforilação oxidativa para glicólise, levou ao comprometimento da tumorigênese. Sendo assim, a glicólise sozinha não consegue suprir as necessidades do crescimento tumoral tendo que se adequar a fosforilação oxidativa (FOLGA et al., 2010;LUNT e VANDER HEIDEN, 2011).

No entanto, devido às mudanças no metabolismo celular, as células desenvolvem adaptações para manter-se em condições favoráveis para a manutenção de energia dependente da taxa de  $O_2$  (VANDER HEIDEN et al., 2009; BUCHAKJIAN MR e KORNBLUTH, 2010; LUNT e VANDER HEIDEN, 2011; CHEUNG et al., 2013). No caso de tecidos diferenciados estão na presença de  $O_2$ , a glicose forma como produto o piruvato, que majoritariamente segue para mitocôndria sendo oxidado a  $CO_2$  e uma pequena parte será reduzido em lactato. Por outro lado, em condições com baixa concentração de  $O_2$  ou células em hipóxia a maior parte da glicose converte-se em lactato (glicólise anaeróbica). (HSU e SABATINI, 2008; VANDER HEIDEN et al., 2009; ROXBURGH e McMILLAN, 2014).



**Figura 1- Marcadores do processo tumorigênico. A - Características metabólicas com os seis marcadores tumorais. B - Características metabólicas com os quatro novos marcadores tumorais (Retirado e adaptado de HANAHAAN e WEINBERG, 2011).**

## 1.2 METABOLISMO ENERGÉTICO

O catabolismo de glicose é conhecido como glicólise, fonte de energia metabólica da maioria das células (NELSON e COX, 2000). A via glicolítica consiste em duas fases separadas. A primeira é a fase preparatória, a qual requer energia na forma de adenosina trifosfato (ATP) para ativar a molécula de glicose através da sua fosforilação, para as reações oxidativas, como demonstrado a seguir:  $\text{glicose} + \text{ATP} \rightarrow \text{glicose-6-fosfato (G6P)} + \text{adenosina difosfato (ADP)}$  e  $\text{frutose-6-fosfato (F6P)} + \text{ATP} \rightarrow \text{frutose-1,6-bisfosfato (FBP)}$  (FIGURA 2) (BUCHAKJIAN e KORNBLUTH, 2010). A fase de compensação inclui etapas de fosforilação que conservam energia na forma de ATP e nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma reduzida (NADH). A conversão de duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato (GAP) a 02 moléculas de piruvato é acompanhada pela formação de 04 ATP, a partir de ADP, que são formados nas reações:  $(2x) 1,3\text{-bifosfoglicerato (1,3-BPG)} + \text{ADP} \leftrightarrow (2x) 3\text{-fosfoglicerato (3PG)} + \text{ATP}$  e a  $(2x) \text{fosfoenolpiruvato (PEP)} + \text{ADP} \leftrightarrow (2x) \text{piruvato} + \text{ATP}$  (FIGURA 2) (BUCHAKJIAN e KORNBLUTH, 2010).

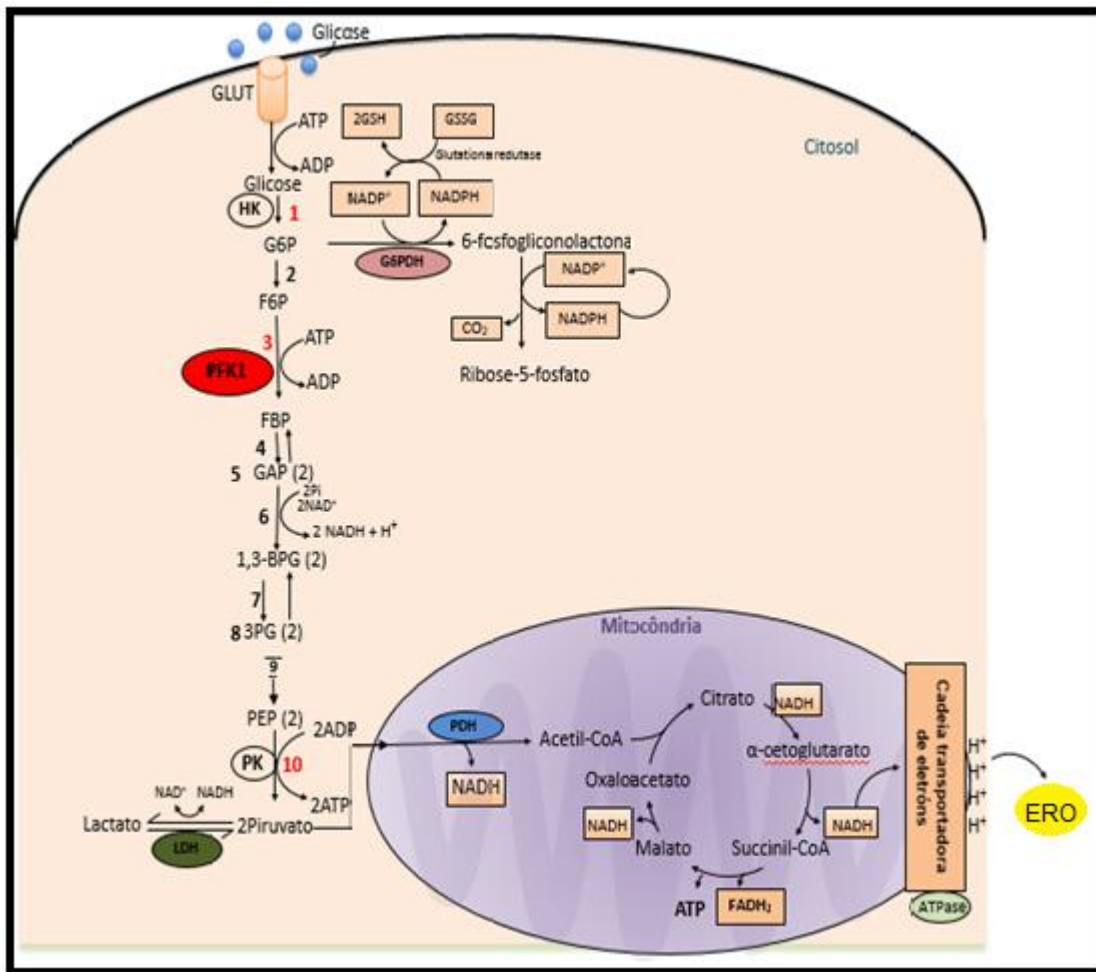
Na figura 2, as enzimas 1, 3 e 10 são pontos-chave para via glicolítica além de apresentarem reações irreversíveis em condições intracelulares que são catalisadas pelas enzimas: hexocinase (HK), fosfofrutocinase (PFK) e piruvatocinase (PK). Outra reação importante para a via glicolítica encontra-se na reação  $(2x) \text{GAP} + \text{P}_i + (\text{nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma oxidada}) \text{NAD}^+ \leftrightarrow (2x) 1,3\text{-BPG} + \text{NADH} + \text{H}^+$  com a formação de NADH essencial para formação de mais ATP, pelo processo de fosforilação oxidativa (FIGURA 2) (BUCHAKJIAN e KORNBLUTH, 2010).

O ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) acontece na mitocôndria na presença  $\text{O}_2$ , através de um conjunto de enzimas presentes na membrana interna desta organela. Este ciclo inicia-se com a entrada e conseqüente descarboxilação do piruvato pelo complexo piruvato desidrogenase (PDH), dando origem a uma molécula de acetil-CoA que é oxidada  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ . No final do ciclo são gerados 06 NADH, 02 flavina adenina dinucleotídeo ( $\text{FADH}_2$ ) e 02 moléculas de ATP para

uma molécula de glicose (BUCHAKJIAN e KORNBLUTH, 2010).

Na cadeia respiratória, os elétrons são carreados pelas proteínas que estão inseridas na membrana da crista mitocondrial, culminando com a redução de  $O_2$  a  $H_2O$ , sendo a energia do transporte de elétrons conservada na síntese de ATP pela fosforilação oxidativa (VOET et al., 2000; BANERJI e GIBSON, 2012; SENA et al., 2012). Em casos em que  $O_2$  é insuficiente para oxidação aeróbica do piruvato e do NADH produzido pela glicólise, a redução do piruvato é catalisada pela enzima lactato desidrogenase (LDH), regenerando a molécula de  $NAD^+$  como visto na reação:  $\text{piruvato} + \text{NADH} + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{lactato} + \text{NAD}^+$  (BUCHAKJIAN e KORNBLUTH, 2010; SENA e CHANDEL, 2012).

O  $O_2$  é o aceptor de elétrons na cadeia respiratória, formando como produto  $H_2O$  e liberando energia na forma de ATP, porém devido o processo ocorrer de forma contínua e lenta, produtos de degradação são formados, chamadas de espécies reativas de oxigênio (ERO) que são capazes de causar danos a todas as moléculas biológicas e ao DNA além de comprometer a função enzimática (RAHN et al., 1991; DZEJA et al., 2001; VOET et al., 2000; SENA e CHANDEL., 2012). O efeitos danosos provocados pelo ERO podem ser evitados por três sistemas antioxidantes presentes nas células que são: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato ( $NADPH/ NADP^+$ ), tioredoxina ( $TRX_{red}/TRX_{ox}$ ) e a glutationa ( $GSH/GSSG$ ) (VOET et al., 2000; CHUNG et al., 2003). Sendo a glutationa, o oxidante mais abundante no interior das células, o seu papel é importante na manutenção das funções biológicas por preservarem o organismo contra os danos oxidativo. No entanto, a glutationa necessita ser regenerada pelas células. Neste caso o NADPH participa nessa etapa sendo gerado na via das pentoses-fosfato por ação da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e 6-fosfogluconato-desidrogenase (NELSON e COX, 2000; GANAPATHY-KANNIAPPAN e GESCHWIND, 2013).



**Figura 2- Glicólise, Ácido Tricarboxílico, Cadeia de Transporte de elétrons e Via das pentoses. Legenda:** ATP Adenosina trifosfato; 1,3- BPG 1,3-Bifosfoglicerato; ERO Espécies reativas de oxigênio; F6P Frutose 6-fosfato; FADH<sub>2</sub> Flavina adenina dinucleotídeo; FBP Frutose-1,6-bisfosfato; G6P Glicose-6-fosfato; G6PDH Glicose-6-fosfato desidrogenase; GAP Gliceraldeído-3-fosfato; GLUT Transportador de glicose; GSH Glutaciona reduzida; GSSG Glutaciona forma oxidada; HK Hexocinase; LDH Lactato desidrogenase; NAD<sup>+</sup> Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma oxidada; NADH Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida; NADP<sup>+</sup> Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma oxidada; NADPH Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida; PDH Piruvatodesidrogenase; PFK Fosfofrutocinase; PK Piruvaticinase; PEP Fosfoenolpiruvato; 3PG 3-Fosfoglicerato (Retirado e adaptado de BUCHAKJIAN e KORNBLUTH, 2010).



### 1.3 UTILIZAÇÕES DOS SALICILATOS PARA TRATAMENTO DO CÂNCER

Os tratamentos convencionais do câncer ainda são: cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Sendo a quimioterapia, nos últimos anos, objeto de estudos para desenvolvimento de novos fármacos mais específicos e ativos que visem erradicar as células tumorais sem danificar os tecidos normais, que infelizmente no momento ainda não existem (LI et al., 2014). Uma proposta interessante, seria a combinação de inibidores da via glicolítica com fármacos antitumorais, dessa forma aumentaríamos a probabilidade de um tratamento para o câncer mais eficaz, uma vez que esta via é uma das principais fomentadoras dos tumores (HU et al., 2012). Então a inibição das principais enzimas chaves da via glicolítica HK, PFK e PK são alvos para tratamento do câncer uma vez que já apresentam inibidores sintéticos, como 2-deoxiglicose, Ionidamina e 3-bromopiruvato, respectivamente, porém ainda estão em estudos pré-clínicos (GONG et al., 2012; HITOSUGI e CHEN, 2013; JANG et al., 2013).

Outro fármaco já descrito na literatura com potencial ação antineoplásica é o clotrimazol, que diminui a viabilidade das células tumorais por inibir o fluxo glicolítico, com conseqüente decréscimo da concentração intracelular de ATP. Marcondes e colaboradores, recentemente identificaram uma ação direta do clotrimazol na PFK através da dimerização, uma vez que o formato mais ativo são os tetrâmeros e não os dímeros (MEIRA, et al., 2005; ZANCAN, et al., 2010; MARCONDES, et al., 2010).

Em 1988, pela primeira vez demonstrou-se que os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) preveniam o câncer de cólon (KUNE et al., 1988). O uso prolongado dos AINES e os resultados obtidos com os estudos foram divididos em duas séries de dados: os estudos epidemiológicos que documentaram a associação entre o uso de AINES e o risco de desenvolvimento da doença e as triagens clínicas demonstrando que atualmente a administração dos AINES previnem o câncer (RIGAS e KASHFI, 2005).

Os AINES são bem conhecidos pela ação antipirética e analgésica, mas também existem estudos que demonstram que o uso prolongado dos salicilatos ácido acetilsalicílico (AAS) e ácido salicílico (AS) apresentaram uma redução no risco do câncer: cólon, mama, próstata, pulmão e pele (CHOI et al., 2013). O mecanismo clássico da função terapêutica dos AINES é a inibição da enzima ciclo-oxigenase (COX) (DANNENBERG e SUBBARAMAIAH et al., 2003; ROSENTHAL e GLEW, 2009). Os artigos mais recentes citados abaixo demonstraram que os efeitos AAS não se mantiveram apenas na inibição da COX, mecanismo pelo qual é descrito como clássico para esse fármaco (KIM et al., 2001; LAI et al., 2008; SPITZ et al., 2009; THUN et al., 2012; GRONICH e RENNERT, 2013).

Pesquisadores investigaram o efeito do AAS na proliferação e apoptose de células SW480, uma linhagem celular de câncer de cólon retal humano que não expressa COX-2 (LAI et al., 2008). Os autores mostraram que o AAS poderia inibir a expressão de Bcl<sub>2</sub> e aumentar a expressão de Bax, que são proteínas que modulam a apoptose de maneira negativa e positiva, respectivamente, sendo que o declínio na taxa de Bcl<sub>2</sub>/Bax contribuiu para a indução da apoptose (LAI et al., 2008). Assim como no mecanismo proposto por Chung e colaboradores, também confirmou a apoptose em células tumorais, neste caso, a apoptose é desencadeada por um excesso na produção de ERO que levou à despolarização da mitocôndria por ação do AS (CHUNG et al., 2003).

Uma vez que o AAS e AS demonstraram efeitos antitumorais no tratamento dos diferentes tipos de câncer, os artigos que serão abordados a seguir visam elucidar os efeitos desses fármacos no tratamento do câncer de mama, uma vez que é o segundo tipo de câncer que mais mata mulheres em todo mundo (JEMAL et al., 2011). A estratégia desse estudo foi à combinação dos efeitos do AAS e exemestano para aumentar a eficácia do tratamento do câncer, que tem sido provado nesses últimos anos. O exemestano é um fármaco indicado para tratamento adjuvante em mulheres pós-menopausa com câncer de mama inicial, tendo como mecanismo de ação inibir o crescimento de tumores através do bloqueio da produção de estrogênio (MAUNSELL et al., 2014).

O resultado da combinação dos fármacos revelou a diminuição da viabilidade da célula de câncer de mama humano MCF-7, quando comparado com tratamento isolado, além de promover a diminuição da proteína Bcl<sub>2</sub> que desempenha o papel de fator antiapoptótico. Sendo assim as células MCF-7 estariam mais susceptíveis a apoptose, uma vez que Bcl<sub>2</sub> encontrou-se em níveis reduzidos (HU et al., 2012). Neste contexto, pesquisas apontaram que tecidos tumorais mamários apresentaram alta expressão de Bcl<sub>2</sub>, quando comparado com outros tecidos tumorais (ALIREZA et al., 2008). Então, Choi e colaboradores passaram a investigar a expressão de Bcl<sub>2</sub> e o efeito do AAS na proliferação de células MCF-7 e MDA-MB-231, ambas, linhagens de células de câncer de mama humano. A célula MCF-7 expressou altos níveis de Bcl<sub>2</sub> e respondeu bem aos efeitos do AAS, após o tratamento por 24 horas, no entanto, a MDA-MB-231 apresentou resultados contrários ao observado na MCF-7 (CHOI et al., 2013).

Sendo assim em uma abordagem inicial, nosso grupo estudou os efeitos dos salicilatos sobre o metabolismo glicolítico em células tumorais. Sumarizando, foi observado que os salicilatos são capazes de diminuir a viabilidade de células MCF-7 de forma dependente da concentração dos fármacos (SPITZ et al., 2009). Esse efeito apresentava a mesma eficácia que os efeitos dos fármacos sobre o consumo de glicose e a produção de lactato por esta linhagem celular. Adicionalmente, os salicilatos mostraram-se capazes de inibir nessa linhagem celular, a principal enzima regulatória da glicólise, a PFK. Um aprofundamento do mecanismo pelo qual os salicilatos produziam esse efeito mostrou uma inibição direta da enzima, o que poderia justificar parte dos seus efeitos sobre o metabolismo glicolítico (SPITZ et al., 2009).

Por outro lado, a simples inibição de uma enzima glicolítica, não seria um fator robusto o suficiente para propor essa classe de moléculas como possíveis fármacos antineoplásicos. Nesse sentido, seria imperativo aprofundar os conhecimentos dos efeitos desses fármacos sobre outras rotas metabólicas celulares a fim de corroborar com a proposição dos salicilatos como potenciais fármacos para o controle de neoplasias.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

O presente trabalho visa ampliar os conhecimentos acerca dos efeitos dos salicilatos sobre via glicolítica de células tumorais.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar a capacidade dos salicilatos em afetar o potencial redutor celular, através do funcionamento da enzima glicose-6-fostato desidrogenase (G6PDH);
- Correlacionar os efeitos sobre a glicose-6-fostato desidrogenase com os observados sobre a enzima fosfofrutocinase;
- Avaliar os efeitos dos salicilatos sobre a atividade mitocondrial da linhagem celular de câncer de mama (MCF-7).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAIS:

DMEM (Meio de Eagle modificado por Dulbecco), e soro fetal bovino obtidos da Gibco-Invitrogen Corporation (NY USA). As enzimas para a realização dos ensaios enzimáticos e outros reagentes foram obtidos da empresa Sigma ChemicalCo (MA, EUA). O ácido acetilsalicílico (AAS) cristalino e o ácido salicílico (AS) foram obtidos da empresa Sigma Aldrich Brasil Ltda (São Paulo, SP, Brasil). Demais reagentes foram obtidos da Merck do Brasil (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Todos os reagentes são de alto grau de pureza.

#### 3.2 CULTURA DE CÉLULAS

A linhagem celular de câncer de mama MCF-7 foi obtida do Banco de Células do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, UFRJ. As células MCF-7 foram mantidas em frascos de cultura e acondicionadas em estufa a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. A linhagem MCF-7 cresceu em meio DMEM e foram suplementadas com 10% de soro fetal bovino, glutamina (0,29 g/L) e bicarbonato de sódio (3,7 g/L), pH 7,4. O inóculo inicial foi de 5 x 10<sup>4</sup> células/mL, sendo subcultivadas a cada dois dias e mantidas em fase log de crescimento celular, como descrito por Holandino et al.,2001. O meio de cultura foi removido mantendo as células MCF-7 aderidas na placa e foram acrescentadas em meio fresco com a dissolução nas respectivas concentrações (0,5mM; 1mM; 3mM; 6mM; 10mM) de ambos os fármacos AAS e AS. Os fármacos foram dissolvidos no próprio meio de cultura e o pH foi ajustado para 7,4 com hidróxido de sódio 1M .

#### 3.3 TESTE DE ATIVIDADE MITOCONDRIAL

A atividade mitocondrial foi determinada pelo método de Mosmann (1983). As células MCF-7 (1 x 10<sup>4</sup> células x mL<sup>-1</sup>) foram cultivadas em placas de 96 poços, em meio de cultura apropriado. Após 24 horas, o meio de cultura em

contato com as células foi removido e substituído. Diferentes concentrações foram adicionadas de AAS e AS (0,5mM; 1mM; 3mM; 6mM; 10mM). Após 24 horas, retirou-se o sobrenadante que foi utilizado no item 3.4 e adicionou-se 5 mg/mL de uma solução de MTT (brometo de 3,4,5-dimetilazol-2,5-difeniltetrazólio) obtido da empresa Sigma ChemicalCo (MA, EUA) em solução salina tamponada com fosfato (PBS). As placas de cultura contendo essa solução foram deixadas por 3 horas a temperatura ambiente. Ao final dessa incubação, descartou-se o sobrenadante e os cristais de formazam produzidos, foram dissolvidos em 200  $\mu$ L de dimetilsulfóxido (DMSO). A absorbância do corante foi medida no comprimento de onda de 570 nm com a subtração do *background* em 650nm, utilizando-se o leitor de microplacas Victor 3 (PerkinElmer,EUA). Dados representam a média  $\pm$  erro-padrão de no mínimo 2 experimentos ( $n \geq 6$ ).

#### 3.4 AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE MEMBRANAR

A integridade membranar foi avaliada através da quantificação da atividade de LDH extravasada para o meio de cultura. O sobrenadante retirado da placa de 96 poços que ficou às 24 horas de incubação com e sem os fármacos e Triton-X (controle positivo) (CUESTA et al., 2005) . Foram utilizados 20  $\mu$ l desse sobrenadante e a atividade da LDH presente no meio de cultura foi avaliada pelo Kit Lactato desidrogenase (Bioclin). A LDH catalisa a redução do piruvato com o NADH, obtendo-se lactato e  $NAD^+$  foi avaliada pela medida da absorvância a 340 nm no leitor de microplacas Victor 3 (PerkinElmer, EUA). Dados representam a média  $\pm$  erro-padrão de no mínimo 2 experimentos ( $n \geq 6$ ).

#### 3.5 DOSAGEM DA ATIVIDADE DA ENZIMA PFK E DA G6PDH:

A linhagem celular foi crescida em placa de 24 poços até atingir a confluência. Posteriormente, o meio de cultura foi substituído e a linhagem foi incubada com os fármacos AAS e AS nas concentrações de 0,5mM; 1mM; 3mM; 6mM e 10mM durante 24 horas. As células foram, posteriormente, tripsinizadas,

centrifugadas (3.000 rpm x 10 min) e ressuspensas em tampão 10 mM fosfato de potássio, pH 7,4.

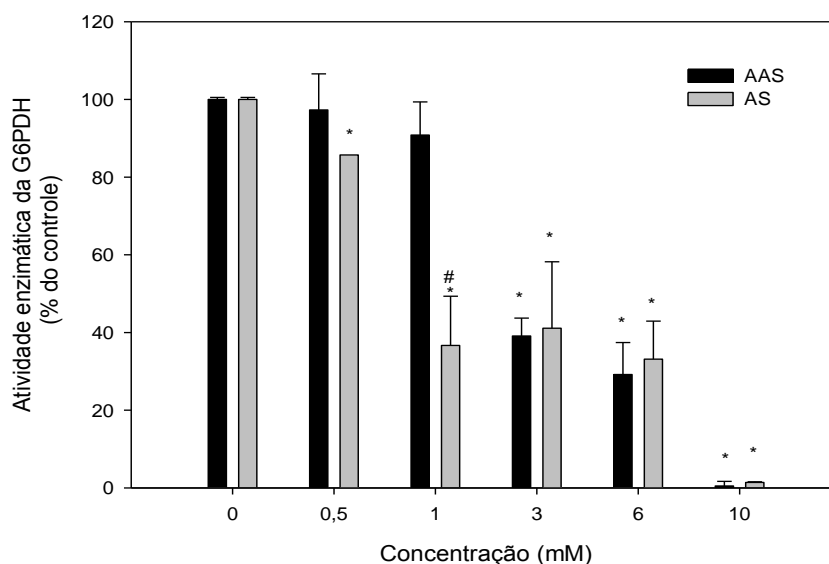
O ensaio acoplado para atividade da PFK foi utilizado um meio reacional que continha: 50 mM Tris-HCl (pH 8,2), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 mM F6P, 1 mM ATP, 1 mM NADH, 2 U/mLaldolase, 4 U/mLtriosefosfatoisomerase e 2 U/mL α-glicerofosfatoisomerase. Para a atividade da G6PDH o meio reacional continha: 50 mM Tris-HCl (pH 8,2), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM NADP<sup>+</sup>, 1 mM G6P. O volume final da reação, em todos os ensaios, foi de 200 μL, ou seja, 100 μL do meio reacional e 100 μL do lisado celular. A oxidação/redução do NADH/NAD<sup>+</sup> e de NADPH/NADP<sup>+</sup> foi acompanhada pela medida do decréscimo na absorvância a 340 nm no leitor de microplacas Victor 3 (PerkinElmer, EUA) (ZANCAN et al., 2010). A concentração de proteína da célula foi mensurada pela técnica de Lowry (LOWRY et al., 1951). Dados representam a média ± erro-padrão de no mínimo 2 experimentos (n ≥ 6).

### 3.6 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 (11.0, Systat Inc. CA, USA) integrado com *software* SigmaStat (v 3.5, Systat Inc. CA, USA). Os valores para cada grupo foram comparados por testes de *t*-Student pareados ou não pareados. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p \leq 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

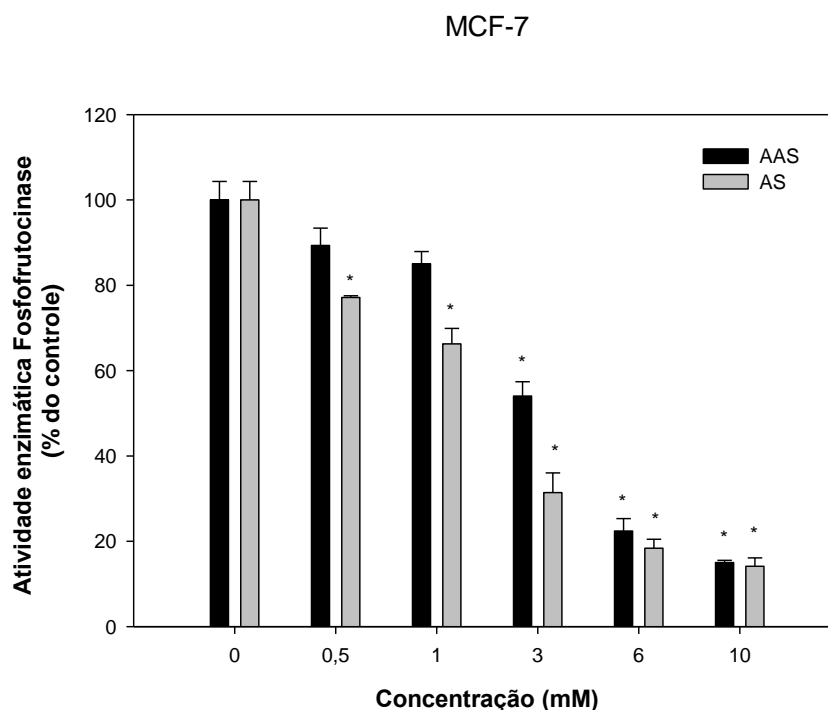
A fim de iniciar os estudos dos efeitos dos salicilatos sobre a capacidade redutora de células tumorais, a linhagem de tumor mamário humano, MCF-7, foi tratada por 24 horas na presença de diferentes concentrações de AAS e AS, ambos tamponados para descartar o efeito de alterações de pH, e a atividade da G6PDH foi avaliada. Como pode ser observado na figura 3, ambos os compostos são capazes de inibir fortemente essa enzima, atingindo 100 % de inibição a presença de 10 mM. Em baixas concentrações (0,5mM e 1mM ), pode-se observar um efeito mais eficiente do AS (barras cinzas) quando comparado ao AAS (barras pretas). Entretanto, essa diferença mantém-se a partir de 3mM quando ambos os compostos apresentam a mesma potência.



**Figura 3 – Efeito do AAS e AS sobre a atividade enzimática da glicose-6-fosfato desidrogenase na linhagem MCF-7.** O ensaio enzimático da G6PDH na presença de AAS (barras pretas) e AS (barras cinza), por 24 horas, foi realizada conforme descrito no Material e Métodos. Os valores são a média  $\pm$  erro padrão de no mínimo seis experimentos independentes ( $n \geq 6$ ), sendo  $*p < 0,001$  em relação ao controle  $\#p < 0,05$  em relação a grupo AAS.

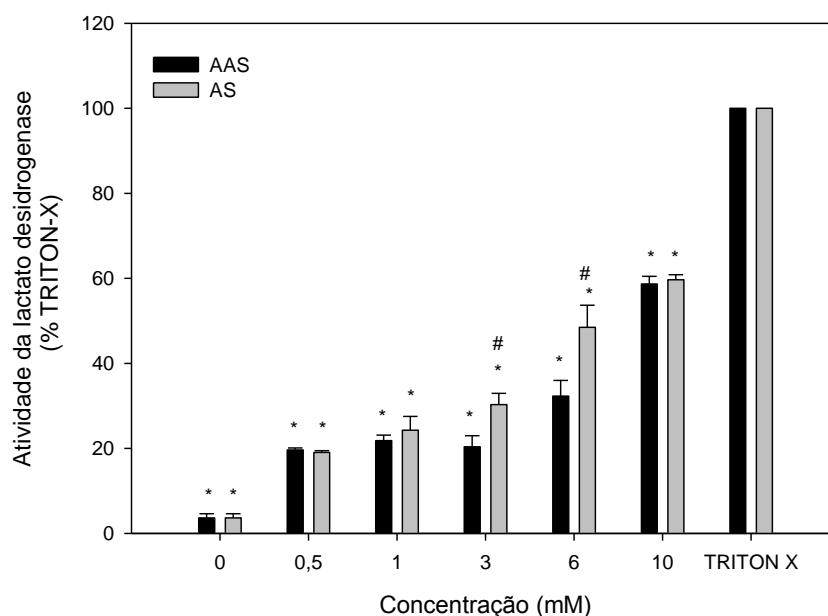


Comparando os efeitos do AS com o AAS sobre a atividade da PFK na linhagem MCF-7 tratada por 24 horas com os fármacos, Spitz e colaboradores também observaram uma maior eficácia do AS em concentrações baixas, compatíveis com as utilizadas no presente trabalho (SPITZ et al., 2009). A título de comparação, repetimos esse ensaio a fim de validar nossos resultados e corroborar a maior eficácia do AS em baixas concentrações. Como claramente demonstrado na figura 4, no presente trabalho confirmou-se que o AS (barras cinza) é mais eficiente, quando comparado ao AAS (barras pretas), em inibir a atividade PFK da linhagem MCF-7 tratada por 24 horas na presença dos fármacos. Nesse caso, o AS foi mais eficiente quando observada até a concentração de 3 mM, não havendo diferença em concentrações mais altas. Por outro lado, o efeito máximo atingido na presença de 10 mM dos fármacos foi de aproximadamente 80 % de inibição, significativamente menor que os 100 % observados para a G6PDH, como descritos acima.



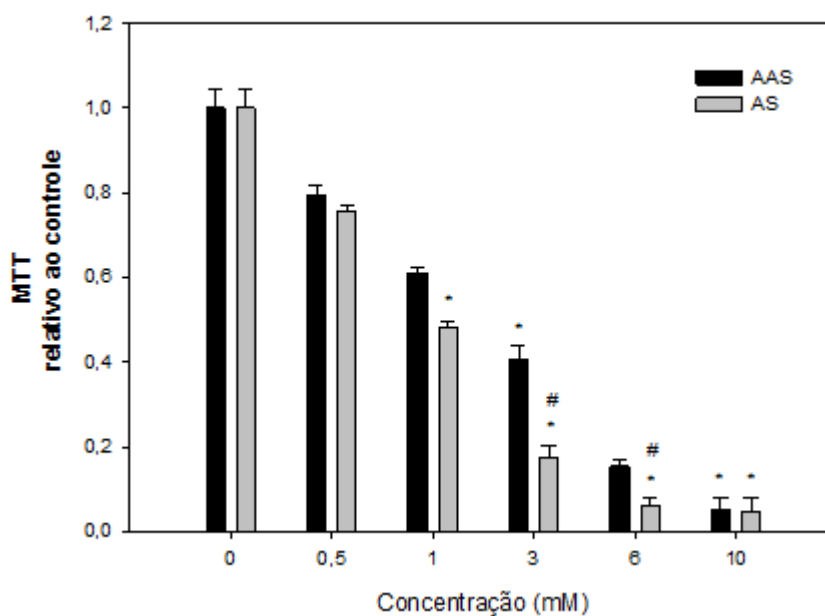
**Figura 4 – Efeito do AAS e AS sobre a atividade enzimática da fosfofrutocinase da linhagem MCF-7.** O ensaio enzimático da PFK na presença de AAS (barras pretas) e AS (barras cinza), por 24 horas, foi realizada conforme descrito no Material e Métodos. Os valores são a média  $\pm$  erro padrão de no mínimo seis experimentos independentes ( $n \geq 6$ ), sendo  $*p < 0,001$  em relação ao controle.

Sendo a G6PDH a enzima que controla o passo limitante para a via das pentoses-fosfato e sendo essa via fundamental para a redução de NADP<sup>+</sup> gerando NADPH, que por sua vez será utilizado, entre diversas outras finalidades, para reduzir a glutatona e proteger as células da ação de ERO, decidimos avaliar os efeitos dos salicilatos sobre uma das funções celulares mais dependentes da ação protetora da glutatona reduzida: a integridade da membrana plasmática (RONQUIST e WALDENSTROM, 2003). Para avaliar a integridade da membrana plasmática da linhagem MCF-7 tratadas por 24 horas na presença de diferentes concentrações de AS e AAS, medimos o extravasamento da LDH dessas células após o tratamento. Como podem ser observados na figura 5, ambos os compostos diminuem a integridade membranar de forma dependente da concentração, onde há uma relativa maior eficácia do AS (barras cinza) sobre o AAS (barras pretas), muito embora em uma faixa de concentração levemente diferente do que foi observado anteriormente (FIGURAS 3 e 4).



**Figura 5 – Efeito do AAS e AS sobre a integridade membranar da linhagem MCF-7.** O ensaio de LDH na presença de AAS (barras pretas) e AS (barras cinza), por 24 horas, foi realizada conforme descrito no Material e Métodos. Os valores são a média  $\pm$  erro padrão de no mínimo seis experimentos independentes ( $n \geq 6$ ), sendo  $*p < 0,001$  em relação ao controle e  $\# p = 0,03$  em relação a grupo AAS.

Por fim, avaliamos a capacidade dos salicilatos em afetar também a capacidade redutora mitocondrial, como indicador que o metabolismo oxidativo também seria afetado por esses compostos. Para isso, a linhagem MCF-7 foi tratada por 24 horas na presença de concentrações crescente de AS e AAS e a capacidade mitocondrial em reduzir o reagente MTT foi avaliada. Como pode ser claramente observado figura 6, os salicilatos inibem fortemente a capacidade redutora mitocondrial, sendo o AS (barras cinza) relativamente mais eficaz que o AAS (barras pretas). Nesse caso, a maior potência do AS se dá na mesma faixa de concentração que o observado para a integridade membrana.



**Figura 6 – Efeito do AAS e AS sobre a atividade mitocondrial da linhagem MCF-7.** O ensaio de MTT na presença de AAS (barras pretas) e AS (barras cinza), por 24 horas, foi realizada conforme descrito no Material e Métodos. Os valores são a média  $\pm$  erro padrão de no mínimo seis experimentos independentes ( $n \geq 6$ ), sendo \* $p < 0,05$  em relação ao controle e #  $p < 0,05$  em relação ao grupo AAS.

## 5 DISCUSSÃO

Atualmente, o desenvolvimento de fármacos antitumorais, requer que estes fármacos sejam capazes de agir em diferentes alvos celulares, afetando preferencialmente, diferentes aspectos da fisiologia da célula tumoral (HANAHAN e WEINBERG, 2011). Nesse caso, afetar as principais características que possibilitam que os tumores mantenham uma elevada taxa proliferativa nas condições mais adversas, permite que se proponham moléculas com potenciais fármacos para o controle de neoplasias. Dentre essas características, ganham força à alta taxa glicolítica tumoral, sua capacidade de resistir ao estresse oxidativo e às altas concentrações de ERO geradas pelo seu próprio metabolismo e pelo metabolismo das células adjacentes, afetadas pela presença de altas concentrações de citocinas pró-inflamatórias, e a capacidade simultânea de sustentar um metabolismo fermentativo (glicolítico) e oxidativo (alta taxa redutora mitocondrial) (GATENBY e GILLIES,2004; XU et al., 2005; ASHRAFIAN, 2006; EASTON e HOUGHTON, 2006; SHAW et al., 2006; MATHUPALA et al., 2007; HSU e SABATINI, 2008;HANAHAN e WEINBERG, 2011; MAI et al., 2013, SEMENZA, 2013, SEDLAKOVA et al., 2014; WEIGELT et al., 2014).

O presente trabalho inicia a caracterização de que os salicilatos são capazes de atacar simultaneamente essas três características de uma linhagem de carcinoma mamário humano, a conhecida e amplamente utilizada linhagem MCF-7. A capacidade de salicilatos, em particular o AS e o AAS, em afetar o consumo de glicose e a produção de lactato na linhagem MCF-7 foi caracterizada anteriormente como uma consequência da inibição direta da principal enzima glicolítica, PFK (SPITZ et al., 2009). Nesse trabalho os autores demonstraram que os salicilatos são capazes de afetar diretamente a enzima, dissociando seus tetrâmeros ativos em dímeros inativos. Esse é um mecanismo comum de diferentes inibidores fisiológicos, como citrato e o próprio ATP, e farmacológicos (clotrimazol) da enzima (SOLA-PENNA et al., 2010). Como consequência da inibição da PFK, observou-se uma profunda inibição da produção de lactato por

estas células, com efeito, mais brando sobre o consumo de glicose, sugerindo um efeito mais pronunciado sobre a capacidade dessas células em realizar o “Efeito Warburg” (SPITZ et al., 2009).

Considerado como uma característica exclusiva de células proliferativas e um dos principais marcos de células tumorais, o “Efeito Warburg” tem sido alvo para o estudo do desenvolvimento de fármacos antitumorais (BAYLEY e DEVILEE, 2012). O “Efeito Warburg” fruto da estabilização do fator induzido por hipóxia-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), leva à superexpressão da piruvato desidrogenase cinase (PDK) aumentando a fosforilação de PDH e, por conseguinte, sua inibição. Como resultado, há um favorecimento da fermentação láctica, mesmo com o aporte normal de O<sub>2</sub> para célula, caracterizando o “Efeito Warburg” (SEMENZA, 2008; SEMENZA, 2008). Essa alta taxa glicolítica fermentativa visa suprir a célula com a produção energética necessária para suportar as diversas vias anabólicas que tumores realizam simultaneamente, suportando a mitose. Ao mesmo tempo, ocorre alta taxa de oxidação mitocondrial, especialmente a partir de glutamina, a fim de fornecer à célula esqueletos carbônicos que serão utilizados para o anabolismo.

Assim, a glutamina não é totalmente oxidada, pelo contrário, é utilizada pelo isocitrato desidrogenase isoforma 2 (IDH-2) para converter o  $\alpha$ -cetoglutarato formado pela oxidação sequencial da glutamina em glutamato e do glutamato nesse  $\alpha$ -cetoácido em isocitrato e posteriormente em citrato, que, ao sair da mitocôndria gera acetil-CoA e oxaloacetato fomentando tanto a via de biossíntese lipídica quanto a via de biossíntese de aminoácidos (FIGURA 7) (SCHULZE e HARRIS, 2012).

Dessa forma, tem-se uma adaptação metabólica que permite, entre outras coisas, garantir a alta taxa proliferativa, a proteção contra ERO e a evasão de vias pró-apoptóticas.

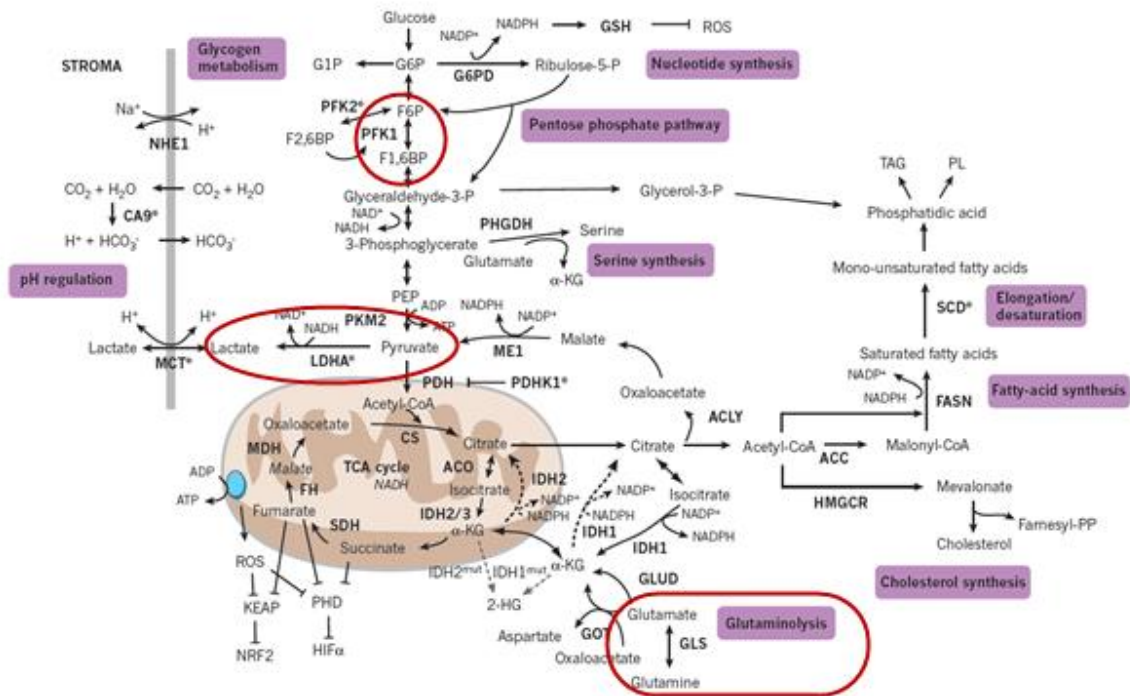


Figura 7. Visão global do metabolismo em tumores. (Retirado de SCHULZE e HARRIS, 2012).

Mesmo sem a pretensão de propor formalmente os salicilatos como reais candidatos antitumorais, o presente trabalho foi capaz de demonstrar que algumas dessas propriedades tumorais garantidas pelo “Efeito Warburg” são fortemente afetadas por estes fármacos. Por exemplo, a alta capacidade em inibir a enzima G6PDH é um indicativo de que a capacidade destas células em resistir aos efeitos danosos de ROS estaria comprometida. Oxidando a G6P em 6-fosfoglucono- $\delta$ -lactona, essa enzima reduz o  $\text{NADP}^+$  em NADPH, e juntamente com a 6-fosfogluconato desidrogenase que ao oxidar o 6-fosfogluconato em ribulose-5-fosfato também reduz  $\text{NADP}^+$  em NADPH essas enzimas da via das pentoses-fosfato contribuem com a maior parte do NADPH celular e, conseqüentemente, como a capacidade celular em reduzir a glutathiona e proteger-se contra danos relacionados ao estresse oxidativo (BOLÁNOS et al., 2010; CHENG et al., 2013).

Assim, uma vez que a 6-fosfogluconato desidrogenase é uma enzima *downstream* a G6PDH, é de se esperar que a inibição dessa última acarrete em um grande prejuízo no conteúdo celular de NADPH e, conseqüentemente, na capacidade celular de reparar danos causados por ERO, já que o NADPH é, em

grande parte, utilizado pela enzima glutathione redutase para reduzir a glutathione que funciona como acceptor dos elétrons desemparelhados das espécies radicalares (ZHU et al.,2009; GANAPATHY-KANNIAPPAN e GESCHWIND,2013) (FIGURA 7).

Dentre os principais danos, certamente está à integridade membranar, já que os fosfolipídeos são conhecidos alvos destes radicais livres (RONQUIST e WALDENSTROM, 2003). Dessa forma, deveria ser esperado que a forte inibição da G6PDH traria graves consequências para a integridade da membrana plasmática celular. Essa hipótese mostrou-se verdadeira no presente trabalho, já que houve grave comprometimento da integridade membranar, causado pelos salicilatos, culminando com o extravasamento da enzima citosólica, a LDH, utilizada aqui como indicador da integridade da membrana plasmática.

Finalmente, arrematando uma sequência de danos celulares, os salicilatos mostraram-se eficientes em afetar o metabolismo mitocondrial. Este metabolismo, como descrito acima, em condições nas quais ocorre o “Efeito Warburg”, é fundamental para o fornecimento de esqueletos de carbono, necessários para suprir o anabolismo celular. Dessa forma, a inibição da capacidade redutora mitocondrial demonstrada no presente trabalho é um forte indicativo de que os salicilatos levam a escassez destes esqueletos, o que culminaria com os efeitos já relatados destes compostos sobre o anabolismo celular (SPITZ et al., 2009).

Portanto, o presente trabalho inicia um estudo onde pretende-se caracterizar os diferentes alvos metabólicos atingidos pelo tratamento de células tumorais humanas com salicilatos.

## 6 CONCLUSÃO

- Salicilatos foram eficientes em inibir a enzima glicose-6-fosfato desidrogenase;
- Salicilatos promoveram uma inibição de forma dependente a concentração, sobre a atividade da fosfrutocinase;
- Salicilatos promoveram danos na integridade membranar;
- Os salicilatos mostraram-se eficientes em afetar o metabolismo mitocondrial;

Todos estes resultados juntos mostraram que o ácido salicílico foi mais eficiente do que ácido acetilsalicílico.



## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALIREZA A, RAHELEH S, ABBASS R, MOJGAN M, MOHAMADREZA M, GHOLAMREZA M, SHADI B. **An immunohistochemistry study of tissue bcl-2 expression and its serum levels in breast cancer patients.** Ann N Y Acad Sci. v.1138, p.114-20, 2008.

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

BANERJI V e GIBSON BS. **Targeting Metabolism and Autophagy in the Context of Haematologic Malignancies.** International Journal of Cell Biology, v. 2012, p.9, 2012.

BAYLE JP e DEVILEE P. **The Warburg effect in 2012.** Current Opin Oncol, v.24, p. 62-67, 2012.

BINES J. **Pesquisa em câncer de mama: uma jornada em curso.** Rio de Janeiro, Instituto Nacional de Câncer 2013. <[http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/jose\\_bines\\_pesquisa\\_cancer\\_mama.pdf](http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/jose_bines_pesquisa_cancer_mama.pdf)> Acessado em janeiro 2014.

BOLAÑOS JP, ALMEIDA A, MONCADA S. **Glycolysis: a bioenergetic or a survival pathway?** Trends Biochem Sci, v.35, p. 145-9, 2010.

BUCHAKJIAN MR e KORNBLUTH. **The engine driving the ship: metabolic steering of cell proliferation and death.** Nat Rev Mol Cell Bio, v. 11, p. 715-27, 2010.

CASTONGUAY A, RIOUX N, DUPERRON C, JALBERT G. **Inhibition of lung tumorigenesis by NSAIDs: a working hypothesis.** Ex Lung Res, v.24, p.605-615, 1998.

CONSTANTINO GM, DA PAULA JVG, DONATE MP. **Fundamentos de Química Experimental.** São Paulo, Editora da Universidade de São Paulo, 2004.

CUESTA E, BOADA J, PERALES JC, ROIG T, BERMUDEZ J. **Aspirin inhibits NF-kappaB activation in a glycolysis-depleted lung epithelial cell line.** Eur J Pharmacol, v.11, p.158-64, 2005.

CHENG YL, CAI P, JIANG J, WANG C, GAO H, FENG C, WANG H, PAN Y, YANG. **Sirt 1 inhibition by melatonin exerts antitumor activity in human osteosarcoma cells.** Eur J Pharmacol, v.715, p. 219-229, 2013.

CHEUNG KJ, GABRIELSON E, WERB Z, EWALD AJ. **Collective Invasion in Breast Cancer Requires a Conserved Basal Epithelial Program** Cell, v.155, p. 1639–1651, 2013.

CHOI B-H, CHAKRABORTY G, BAEK K, YOON HS. **Aspirin-induced Bcl-2 translocation and its phosphorylation in the nucleus trigger apoptosis in breast cancer cells.** Experimental & Molecular Medicine, v. 45, 2013.

CHUNG YM, BAE YS, LEE SY. **Molecular ordering of ROS production, mitochondrial changes, and caspase activation during sodium salicylate-induced apoptosis.** Free Radic Biol Med, v.34, p.434-42, 2003.

DANNENBERG AJ e SUBBARAMAIAH. **Targeting cyclooxygenase-2 in human neoplasia: rationale and promise.** Cancer Cell, v.4, p.431-6, 2003.

DZEJA PP, HOLMUHAMEDODOV EL, OZCAN C, POCAR D, JAHANGIR A, TERZIC A. **Mitochondria: gateway for citoprotection.** Circ.Res.Baltimore, v. 89, p. 744-746, 2001.

EASTON JB e HOUGHTON PJ. **mTOR and cancer therapy.** Oncogene, v.25, p. 6436-6446, 2006.

FOGAL V, RICHARDSON AD, KARMALI PP, SCHEFFLER IE, SMITH JW, RUOSLAHTI E. **Mitochondrial p32 protein is a critical regulator of tumor metabolism via maintenance of oxidative phosphorylation.** Mol. Cell. Biol, v. 30, p. 1303-18, 2010.

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

GATENBY RA e GILLIES RJ. **Why do cancers have high aerobic glycolysis?** Nat.Rev.Cancer, v.4, p. 891-899, 2004.

GANAPATHY-KANNIAPPAN S e GESCHWIND JF. **Tumor glycolysis as a target for cancer therapy: progress and prospects.** Mol Cancer, v.152, 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.

GRONICH N e RENNERT G. **Beyond aspirin- cancer prevention with statins, metformin and bisphosphonates.** Clinical Oncology, 2013.

HANAHAN D e WEINBERG RA. **Hallmarks of Cancer** Cell, v.100, p. 57–70, 2000.

HANAHAN D e WEINBERG RA. **Hallmarks of Cancer: The Next Generation** Cell, v. 144, p.646–674, 2011.

HITOSUGI T e CHEN J. **Post-translational modifications and the Warburg effect.** Oncogene, p. 1-7, 2013.

HOLANDINO C, VEIGA VF, RODRIGUES ML, MORALES MM, CAPELLA MAM, ALVIANO CS. **Direct current decreases cell viability but not Pglycoprotein expression and function in human multidrug resistant leukaemic cell.** Bioelectromagnetics, v. 22, p.470-478, 2001.

HU LX, DU YY, ZHANG Y, PAN YY. **Synergistic effects of exemestane and aspirin on MCF-7 human breast cancer cells.** Asian Pac J Cancer Prev, v.13, p. 5903-8, 2012.

HSU PP e SABATINI DM. **Cancer cell metabolism: Warburg and beyond.** Cell, v. 134, p.703-7, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil.** Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/index.asp?ID=1> > Acessado em janeiro de 2014.

JANG M, KIM SS, LEE J. **Cancer cell metabolism: implications for therapeutic targets.** Experimental & Molecular Medicine, v.45, 2013.

JEMAL A, BRAY F, CENTER MM, FERLAY J, WARD E, FORMAN D. **Global cancer statistics.** CA Cancer J Clin, v.61, p. 69-90, 2011.

KIM JK KIM YJ, FILLMORE JJ, CHEN Y, MOORE I, LEE J, YUAN M, LI ZW, KARIN M, PERRET P, SHOELSON SE, SHULMAN GI. **The effect of salicylates on insulin sensitivity.** J.Clin.Invest. v. 108, p. 437-446, 2001.

KUNE G, KUNE S,WATSON LF. **Colorectal Cancer Risk, Chronic Illnesses, Operations, andMedications: Case Control Results from the Melbourne Colorectal Cancer Study.** Cancer Res, v. 48, p.4399–4404, 1988.

LAI MY, HUANG JA, LIANG ZH, JIANG HX, TANG GD. **Mechanisms underlying aspirin-mediated growth inhibition and apoptosis induction of cyclooxygenase-2 negative colon cancer cell line SW480.** World. J. Gastroenterol, v. 14, p. 4227-4233, 2008.

LI JY, DUAN XF, WANG LP, XU YJ, HUANG L, ZHANG TF, LIU JY, LI F, ZHANG Z, YUE DL, WANG F, ZHANG B, ZHANG Y. **Selective depletion of regulatory T cell subsets by docetaxel treatment in patients with nonsmall cell lung cancer.**J Immunol Res, v. 2014, 2014.

LIAN L, LI W, LI ZY, MAO YX, ZHANG YT, ZHAO YM, CHEN K, DUAN WM, TAO M. **Inhibition of MCF-7 breast cancer cell-induced platelet aggregation using a combination of antiplatelet drugs.** *Oncol Lett*, v.5, p. 675-680, 2013.

LUNT SY e VANDER HEIDEN MG .**Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation.** *Annu Rev Cell Dev Biol*, v.27, p.441-64, 2011.

LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** *J Biol Chem*, v.93, p. 265-75, 1951.

MAI CW, KANG YB, PICHKA MR. **Should a Toll-like receptor 4 (TLR-4) agonist or antagonist be designed to treat cancer? TLR-4: its expression and effects in the ten most common cancers.** *Onco Targets Ther*, v.6, p. 1573-1587, 2013.

MARCONDES MC, SOLA-PENNA M, ZANCAN P. **Clotrimazole potentiates the inhibitory effects of ATP on the key glycolytic enzyme 6-phosphofructo-1-kinase.** *Arch.Biochem.Biophys*, v.497, p.62-67, 2010.

MATHUPALA S, COLEN C, PARAJULI P, SLOAN A. **Lactate and malignant tumors: A therapeutic target at the end stage of glycolysis.** *Journal of Bioen.and Biomem*, v. 39, p. 73-77, 2007.

MAUNSELL E, GOSS PE, CHLEBOWSKI RT, INGLE JN, ALÉS-MARTÍNEZ JE, SARTO GE, FABIAN CJ, PUJOL P, RUIZ A, COOKE AL, HENDRIX S, THAYER DW, ROWLAND KM, DUBÉ P, SPADAFORA S, PRUTHI S, LICKLEY L, ELLARD SL, CHEUNG AM, WACTAWSKI-WENDE J, GELMON KA, JOHNSTON D, HILTZ A, BRUNDAGE M, PATER JL, TU D, RICHARDSON H. **Quality of life in MAP.3 (Mammary Prevention 3): A Randomized, Placebo-Controlled Trial Evaluating Exemestane for Prevention of Breast Cancer.** *J Clin Oncol*, 2014.

MEIRA DD, MARINHO-CARVALHO MM, TEXEIRA CA, VEIGA VF, DA POIAN AT, HOLANDINO C, FREITAS MS, 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.

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.

NELSON, DL e COX, MM. **Lehninger Principles of Biochemistry.** 3<sup>a</sup> ed., New York: Worth Publishers, 2000.

NIGRO JM; BAKER SJ; PREISINGER AC; JESSUP JM; HOSTETTER R; CLEARY K; BIGNER SH; DAVIDSON N; BAYLIN S; DEVILEE P. **Mutations in the p53 gene occurs in diverse human tumour types.** *Nature*, v. 342, p.705-708,

1989.

NEILI D P. **The diverse and complex roles of NF- $\kappa$ B subunits in cancer.** Nature Reviews Cancer, v.12, p.121-132, 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS), Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acessado em outubro de 2013.

RAHN CA, BOMBICKDW, DOOLITTLE DJ. **Assessment of mitochondrial membrane potential as an indicator of cytotoxicity.** Fundam. Appl. Toxicol, v. 16, p. 435-448, 1991.

RIGAS B, e KASHFI K. **Molecular targets of nitric-oxide-donating aspirin in cancer.** The Molecular Biology of Colorectal Cancer, v. 314, p.1–8, 2005.

ROSENTHAL MD e GLEW HR. **Medical Biochemistry: Human Metabolism in health and disease.** A John Wiley & Sons: United States of America, 2009.

RONQUIST G e WALDENSTROM A. **Imbalance of plasma membrane ion leak and pump relationship as a new a etiological basis of certain disease states.** J.Intern.Med, v. 254, p. 517-526, 2003.

ROXBURGH CS e McMILLAN DC. **Cancer and systemic inflammation: treat the the tumour and treat the host.** Br J Cancer, p. 1-4, 2014.

SEDLAKOVA O, SVASTOVA E, TAKACOVA M, KOPACEK J, PASTOREK J, PASTOREKOVA S. **Carbonic anhydrase IX, a hypoxia-induced catalytic component of the pH regulating machinery in tumors.** Front Physiol, v.4, p.400, 2014.

SEMENZA GL. **Hypoxia-inducible factor 1 and cancer pathogenesis.** IUBMB Life, v.60, p. 591-597, 2008.

SEMENZA GL. **Tumor metabolism: cancer cells give and take lactate.** J Clin Invest, v. 118, p. 3835-3837, 2008.

SEMENZA GL. **HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations.** J Clin Invest, v.123, p.3664-3671, 2013.

SENA LA eCHANDEL NS. **Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species.** Mol Cell, v.48, 2012.

SERGEI GRIVENNIKOV, GRETEN FR, KARIN M. **Immunity, Inflammation, and Cancer.** Cell, v.140, p. 883–899, 2010.

SOLA-PENNA M, DA SILVA D, COELHO WS, MARINHO-CARVALHO MM, ZANCAN P. **Regulation of mammalian muscle type 6-phosphofructo-1-kinase and its implication for the control of the metabolism.** IUBMB Life, v. 62, p. 791-796, 2010.

SCHULZE A e HARRIS AL. **How cancer metabolism is tuned for proliferation and vulnerable to disruption.** Nature, v. 491, p. 364-373, 2012.

SHAW RJ. **Glucose metabolism and cancer.** Current Opinion in Cell Biolog, v. 18, p. 598-608, 2006.

SPITZ GA, FURTADO CM, SOLA-PENNA M, ZANCAN P. **Acetylsalicylic acid, 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.

TENNANT DA, DURÁN RV, GOTTLIEB E. **Targeting metabolic transformation for cancer therapy.** Nat Rev Cancer, v.10, p.267-77, 2010.

THUN MJ, JACOBS EJ, PATRONO C. **The role of aspirin in cancer prevention.** Nature Reviews, v. 9, p. 259-266, 2012.

VANDER HEIDEN GM, CANTLEY CL, THOMPSON BC .**Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation.** Science, v.324, 2009.

VOET D, VOET GJ, PRATT CW. **Fundamentos de bioquímica.** Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000.

WARD PS e THOMPSON CB. **Metabolic Reprogramming: A Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate.** Cancer Cell, v. 20, p. 297-308, 2012.

WEIGELT B, EBERLE C, COWELL CF, NG CKY, REIS-FILHO JS. **Metaplastic breast carcinoma: more than a special type.** Nature Rev.Canc, 2014.

ZANCAN P, SOLA-PENNA M, FURTADO CM, 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.

ZUXL e GUPPYM. **Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction.** Biochem. Biophys. Res. Commun, v.313, p.459-65, 2004.

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

XU RH, PELICANO H, ZHOU Y, CAREW JS, FENG L, BHALLA KN, KEATING MJ, HUANG. **Inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia.** *Cancer Res*, v.65, p. 613-621, 2005.

## **8 APÊNDICE- TRABALHO PUBLICADO DURANTE O MESTRADO**

8.1 Apêndice A: Resveratrol decrease breast cancer cell viability and glucose metabolism by inhibiting 6-phosphofructo-1-kinase