

Joana Catarina Vieira Miranda

**Influência dos polimorfismos dos genes MCT1  
e MCT4 e da sua expressão no efeito do 3-BP  
em células tumorais**

Dissertação apresentada no Instituto Universitário de Ciências da Saúde, para obtenção do grau de Mestre em Terapias Moleculares

**Orientação:**

Professora Doutora Odília Marques de Queirós  
Instituto Universitário de Ciências da Saúde  
Departamento de Ciências/Instituto de Investigação e Formação  
Avançada em Ciências e Tecnologias da Saúde

Professora Doutora Roxana Falcão Moreira  
Instituto Universitário de Ciências da Saúde  
Departamento de Ciências/ Instituto de Investigação e Formação  
Avançada em Ciências e Tecnologias da Saúde

maio de 2016



---

## **AGRADECIMENTOS**



**“Não sou nada. Nunca serei nada. Não posso querer ser nada. À parte disso, tenho em mim todos os sonhos do mundo.” Álvaro de Campos**

Quero expressar o meu mais sincero reconhecimento e agradecimento a todos aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para que este trabalho fosse possível e que me apoiaram neste percurso. A todos vocês, o meu mais sincero obrigada!

Em primeiro lugar, quero agradecer à Professora Doutora Odília Queirós, o profissionalismo e a disponibilidade com que orientou este trabalho. Agradeço a sua constante dedicação, a infinita paciência, o gosto pela investigação científica e os seus ensinamentos que foram imprescindíveis. Agradeço ainda o seu apoio e amizade ao longo deste percurso. O meu mais sincero obrigada por tudo.

À Professora Doutora Roxana Falcão, coorientadora deste trabalho, agradeço pelo apoio, pela partilha do saber e pelas palavras de amizade. Agradeço ainda pela excelente coordenação do Mestrado e pelo elevado profissionalismo que me incutiu durante este longo percurso.

Ao Instituto Universitário de Ciências da Saúde IUCS/CESPU, agradeço por me ter proporcionado todas as condições para a minha formação académica, possibilitando a aquisição das capacidades que hoje possuo. Agradeço a todos os elementos do Departamento de Ciências, aos seus docentes, investigadores, técnicos e auxiliares por todo o apoio e amizade disponibilizados no decorrer deste projeto.

E porque o laboratório não é apenas um local de trabalho e a amizade é um fator imprescindível no sucesso pessoal e profissional, não poderia esquecer de agradecer às minhas colegas Ana Margarida, Andrea, Diana, Elsa, Joana Barbosa, Joana Vieira e Juliana. Agradeço-vos pela boa disposição no laboratório, pela constante disponibilidade, pelo companheirismo, pelo apoio nos momentos mais difíceis, pelas palavras certas nos momentos certos e sobretudo pela amizade. Um agradecimento

especial à Andrea pela ajuda indispensável em algumas experiências laboratoriais. À Joana Barbosa e à Juliana agradeço ainda todo o apoio, a infinita disponibilidade, o exemplo de profissionalismo, em especial à Juliana pela amizade que foi crescendo, dia após dia.

À Ana Margarida, amiga e colega de Mestrado, agradeço a amizade, o companheirismo e o apoio ao longo destes anos. Agradeço ainda todos os momentos de partilha de dúvida e incerteza, que permitiram ultrapassar da melhor forma as dificuldades encontradas ao longo deste percurso.

À Joana Vieira agradeço o companheirismo, a constante disponibilidade e a facilidade com que a amizade foi crescendo. Não poderia deixar de agradecer a disponibilidade na formatação desta dissertação.

À Diana agradeço o apoio incondicional ao longo deste percurso, em todos os momentos, quer a nível científico, como a nível pessoal. Agradeço todos os ensinamentos laboratoriais, a disponibilidade constante e a infinita paciência. Destaco a sua simplicidade e humildade, e ainda responsabilidade e profissionalismo, não só para comigo, mas para com todos os colegas de laboratório. Não tenho palavras para agradecer todo o apoio e amizade. Muito obrigada por tudo.

Ao Helder, futuro companheiro de vida, agradeço o amor incondicional, o companheirismo, a imensa paciência e todo o apoio dado nos momentos mais difíceis, que não foram raros no último ano. Agradeço ainda o incentivo para continuar, porque desistir nunca foi a melhor solução, apesar dos obstáculos desta longa caminhada. Muito obrigada por tudo.

Por último e não menos importante, agradeço aos meus pais, em especial à minha mãe, porque sem eles este projeto não seria possível. Agradeço-lhes pelo amor incondicional, pelo apoio e conselhos sempre oportunos, e sobretudo pelos sacrifícios a que se propuseram para que eu pudesse terminar esta dissertação. Não tenho mais palavras para agradecer todo o apoio que me prestaram. Pelos valores de vida que me transmitiram, o amor e o incentivo de uma vida melhor é a eles que dedico este trabalho!

---

**RESUMO/ABSTRACT**



As células tumorais recorrem essencialmente à glicólise aeróbia para a obtenção da energia necessária para a sua proliferação celular, sendo esta adaptação metabólica designada por “Efeito de Warburg”. O lactato produzido neste processo é transportado para o exterior das células pelos transportadores de ácidos monocarboxílicos (MCTs), aumentando dessa forma a acidez do microambiente tumoral e permitindo a sobrevivência das células tumorais. Recentemente, foram identificados *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) nos genes codificantes dos MCTs, nomeadamente no MCT1 e MCT4, que podem originar alterações na atividade destes transportadores, em particular no que se refere ao efluxo de lactato. Nos últimos anos têm sido desenvolvidos vários compostos com ação antitumoral, com diversos alvos terapêuticos, sendo a atividade metabólica da célula tumoral, um excelente alvo no desenvolvimento de terapias mais direcionadas. Entre esses compostos encontra-se o 3-bromopiruvato (3-BP), um inibidor metabólico derivado do piruvato, presumivelmente transportado pelos MCTs e que tem como alvo principal a enzima hexocinase II (HK II). A inibição da HK II, pela ação do 3-BP, reduz os níveis de ATP e NADPH e bloqueia o processo de glicólise em células tumorais, diminuindo ou impossibilitando a sua proliferação.

No presente estudo, foi realizada a genotipagem dos polimorfismos T1470A (presente no gene MCT1) e C44T (presente no gene MCT4) num painel alargado de linhas celulares tumorais. Uma vez que as células tumorais apresentam elevadas taxas glicolíticas e os MCTs desempenham um papel fundamental no seu metabolismo e na ação do 3-BP, pretendeu-se avaliar o efeito citotóxico deste composto nas linhas em estudo e correlacionar esse efeito com a expressão dos MCTs e com a presença dos polimorfismos referidos.

Os resultados obtidos através da avaliação da toxicidade do 3-BP mostraram que a sensibilidade ao composto foi distinta entre os diferentes tipos de cancro em análise. As linhas tumorais HCT-15 de adenocarcinoma colorretal e HeLa de adenocarcinoma cervical mostraram ser as mais sensíveis ao composto. Pelo contrário, as linhas SCC09 e SCC25 de adenocarcinoma da cavidade oral, apresentaram-se como as mais resistentes ao 3-BP, sendo que em ambas foi impossível determinar o valor exato de IC<sub>50</sub>. Relativamente à expressão das proteínas MCT1 e MCT4, todas as linhas tumorais utilizadas apresentaram expressão destes transportadores, à exceção da linha MDA-MB-231 que não apresentou expressão de MCT1. Os níveis de expressão das proteínas MCT1/MCT4 mostraram ser significativos em todas as linhas tumorais, principalmente nas linhas tumorais de carcinoma da cavidade oral e de adenocarcinoma hepatocelular.

Assim, as linhas tumorais com maior sensibilidade ao 3-BP deveriam exibir elevada expressão de MCTs, visto estes mediarem o transporte do composto para o interior da célula tumoral. Contudo, estes resultados não se correlacionaram com a toxicidade do 3-BP. A ausência de correlação observada no presente trabalho pode ser atribuída a outras causas, como por exemplo, a localização destas proteínas na célula ou defeitos genéticos que afetem a sua atividade normal mas não a sua expressão.

Em relação à genotipagem dos polimorfismos T1470A e C44T, também não se observou nenhum efeito direto da sua influência na expressão dos MCTs e na sensibilidade das células ao 3-BP. No entanto, demonstrou-se que a linha tumoral SK-BR-3, homocigota mutante para ambos os polimorfismos, apresentava um menor efluxo de lactato, bem como uma maior resistência ao composto, consistente com o genótipo apresentado, apesar de apresentar expressão global relevante de ambas as proteínas. Assim, a presença dos polimorfismos poderá afetar não a expressão dos MCTs, mas sim a sua localização e/ou atividade, sendo que a toxicidade do 3-BP poderá também estar dependente do património genético de cada linha celular, uma vez que esta associação não foi consistente para todas as linhas celulares analisadas.

Perante os resultados obtidos, pode-se concluir que não foi possível observar nenhuma associação direta entre a expressão global dos MCTs, a presença de polimorfismos nos genes destes transportadores e o efeito citotóxico do 3-BP nas células tumorais. Estudos complementares deverão ser realizados, nomeadamente estudos da atividade da proteína, medindo o transporte de substratos dos MCTs e de localização celular. É de salientar no entanto, que este trabalho permitiu observar que o 3-BP apresentou efeito citotóxico num painel alargado de linhas celulares tumorais correspondendo a diversos tipos de cancro, podendo ser considerado no futuro a sua utilização ao nível de terapia antitumoral.

**Palavras-chave:** “Efeito de Warburg”, 3-bromopiruvato (3-BP), ácidos monocarboxílicos, transportadores de monocarboxilatos (MCTs).

Cancer cells rely mainly on aerobic glycolysis to obtain the energy required for their proliferation, a process also known as "Warburg Effect". The lactate produced in this process is transported outside the cell by the monocarboxylate transporters (MCTs), thereby increasing the tumour microenvironment acidity and favouring tumour survival. Recently, single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the genes coding for MCTs, in particular in MCT1 and MCT4, have been identified, which can alter the transporters activity, namely concerning the lactate efflux.

In the last years, several antitumor compounds with different therapeutic targets have been developed, being cancer metabolic activity one of the emergent and promising targets. One of such compounds is 3-bromopyruvate (3-BP), a metabolic inhibitor derived from pyruvate that targets hexokinase II (HK II) enzyme and that is probably transported by MCTs. The HK II inhibition by 3-BP reduces ATP and NADPH levels and block the glycolysis pathway in cancer cells, reducing or preventing their proliferation.

In the present study the polymorphisms T1470A present in the gene MCT1 and C44T present in the gene MCT4 were genotyped in several cancer cell lines. As cancer cells have high glycolytic rates and MCTs play a key role in their metabolism and in 3-BP action, it was aim of this work to assess the cytotoxic effect of this compound in a panel of cancer cell lines, correlate this effect with the MCTs expression and with the presence of the referred polymorphisms.

The different cancer cells lines analyzed in this work presented different sensitivity to 3-BP, being the cancer cell lines HCT-15 of colon adenocarcinoma and HeLa of cervical adenocarcinoma the most sensitive ones. In contrast, SCC09 and SCC25 lines of oral cavity adenocarcinoma, were the most resistant cell lines to the compound, and it was not possible to determine the exact  $IC_{50}$  value. All cancer cell lines presented MCT1 and MCT4 expression, except MDA-MB-231 cells where no expression of MCT1 was observed. The expression levels of the MCT1/MCT4 were considerable in all cancer lines, namely in the oral cavity carcinoma cells and hepatocellular adenocarcinoma. Therefore, it was expected that the cancer lines with higher sensitivity to 3-BP exhibit high expression of MCTs, as they mediate the transport of the compound into the cancer cell. However, no direct correlation between MCTs expression and 3-BP toxicity was observed. The lack of correlation found in this study can be possibly attributed to other

causes, including protein all localization or genetic defects leading to the alteration of their normal activity, but not affecting their expression.

Regarding the genotyping of T1470A and C44T polymorphisms, it was also not observed a direct association between the presence of the polymorphisms and the MCTs expression or the cells' sensitivity to 3-BP. However, it has been demonstrated that the cancer line SK-BR-3, homozygous mutant for both polymorphisms, present a lower efflux of lactate as well as higher resistance to 3-BP, consistent with the respective genotype, although this cell line presented relevant expression of both MCT1/MCT4. Thus, the presence of polymorphisms may affect not the MCT expression, but its localization and/or activity, being 3-BP toxicity probably also dependent of the genetic heritage of each cell line, as this association was not consistent for all cell lines analysed.

The results obtained in this project did not show a direct association between the expression of MCTs, the presence of polymorphisms in MCTs genes and the 3-BP cytotoxic effect in cancer cells. Further studies should be performed, including determination of MCTs activity and their cellular localization. Nevertheless, this study demonstrated the cytotoxic effect of 3-BP in a vast panel of cancer cell lines, indicating that its use can be valuable in the future as co-adjuvant in antitumor therapy.

**Keywords:** "Warburg effect", 3-bromopyruvate (3-BP), monocarboxylic acids, monocarboxylate transporters (MCTs).

---

## ÍNDICE



AGRADECIMENTOS.....	III
RESUMO/ABSTRACT .....	VII
ÍNDICE .....	XIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XVII
ÍNDICE DE TABELAS .....	XXI
ABREVIATURAS .....	XXV
INTRODUÇÃO .....	1
1.1. METABOLISMO DO CANCRO .....	3
1.1.1. “EFEITO DE <i>WARBURG</i> ” .....	6
1.1.2. INFLUÊNCIA DOS TRANSPORTADORES DE ÁCIDOS MONOCARBOXÍLICOS NO METABOLISMO DO CANCRO.....	12
1.1.2.1. TRANSPORTADOR DE ÁCIDOS MONOCARBOXÍLICOS 1 (MCT1) ..	15
1.1.2.2. TRANSPORTADOR DE ÁCIDOS MONOCARBOXÍLICOS 4 (MCT4) ..	16
1.1.3. POLIMORFISMOS GENÉTICOS NOS GENES ENVOLVIDOS NO METABOLISMO DAS CÉLULAS TUMORAIS: IMPLICAÇÕES NA SUSCETIBILIDADE E NO TRATAMENTO .....	18
1.1.3.1 PREVALÊNCIA E IMPLICAÇÕES DOS POLIMORFISMOS NOS TRANSPORTADORES DE ÁCIDOS MONOCARBOXÍLICOS MCT1 E MCT4 .....	19
1.2. TERAPIAS ANTITUMORAIS DIRECIONADAS AO METABOLISMO DO CANCRO .....	22
1.2.1. 3-BROMOPIRUVATO.....	24
1.3. OBJETIVOS .....	27
MATERIAIS E MÉTODOS .....	29
2.1. LINHAS CELULARES TUMORAIS E CONDIÇÕES DE CULTURA .....	31
2.2. SUBCULTURA DE LINHAS CELULARES TUMORAIS .....	32
2.3. CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO DE LINHAS CELULARES TUMORAIS.....	33
2.4. EXTRAÇÃO DE DNA GENÓMICO DE LINHAS CELULARES TUMORAIS.....	34
2.5. ANÁLISE DA INTEGRIDADE, PUREZA E QUANTIFICAÇÃO DO DNA GENÓMICO .....	34
2.6. ANÁLISE DO POLIMORFISMO T1470A DO GENE MCT1 E DO POLIMORFISMO C44T DO GENE MCT4 .....	35
2.6.1. AMPLIFICAÇÃO DO DNA.....	35
2.6.2. ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS T1470A E C44T POR RFLP .....	36
2.6.3. ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS T1470A E C44T POR HRM.....	37

2.7.	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR ATRAVÉS DO ENSAIO SRB.....	38
2.7.1.	DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE CELULAR.....	39
2.7.2.	DETERMINAÇÃO DO IC <sub>50</sub> PARA O 3-BROMOPIRUVATO NAS LINHAS CELULARES TUMORAIS.....	39
2.8.	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS MCT1 E MCT4.....	40
2.8.1.	EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	40
2.8.2.	SEPARAÇÃO DE PROTEÍNAS POR SDS-PAGE.....	41
2.8.3.	WESTERN-BLOT.....	41
2.9.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
	RESULTADOS.....	45
3.1	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO 3-BROMOPIRUVATO NUM PAINEL DE LINHAS CELULARES TUMORAIS.....	47
3.2.	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS MCT1 E MCT4.....	51
3.3.	GENOTIPAGEM DO POLIMORFISMO T1470A DO GENE MCT1.....	57
3.3.1.	ANÁLISE DO POLIMORFISMO T1470A POR PCR-RFLP.....	58
3.3.2.	ANÁLISE DO POLIMORFISMO T1470A POR HRM.....	59
3.4.	GENOTIPAGEM DO POLIMORFISMO C44T DO GENE MCT4.....	63
3.4.1.	ANÁLISE DO POLIMORFISMO C44T POR PCR-RFLP.....	64
3.4.2.	ANÁLISE DO POLIMORFISMO C44T POR HRM.....	65
3.5.	AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE LACTATO EXTRACELULAR.....	68
	DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES.....	71
	PERSPETIVAS FUTURAS.....	79
	BIBLIOGRAFIA.....	87

---

## ÍNDICE DE FIGURAS



<b>Figura 1:</b> Características do cancro. ....	4
<b>Figura 2:</b> Novos marcos característicos emergentes do cancro.....	5
<b>Figura 3:</b> Metabolismo da glicose em células mamíferas. ....	6
<b>Figura 4:</b> Representação do metabolismo através de fosforilação oxidativa ou glicólise anaeróbica em células diferenciadas normais e por glicólise aeróbica ou “Efeito de Warburg” em células tumorais. ....	7
<b>Figura 5:</b> Enzimas glicolíticas e transportadores da glicólise. ....	10
<b>Figura 6:</b> Topologia da membrana proposta da família MCT.....	13
<b>Figura 7:</b> Simbiose metabólica entre células tumorais expostas a diferentes pressões de oxigénio. ....	17
<b>Figura 8:</b> Estrutura química do agente alquilante 3-bromopiruvato .....	24
<b>Figura 9:</b> Possíveis mecanismos de ação do 3-bromopiruvato numa célula tumoral.....	25
<b>Figura 10:</b> Efeito do 3-BP na viabilidade celular das linhas tumorais de cancro de adenocarcinoma colorretal, adenocarcinoma cervical, carcinoma hepatocelular e carcinoma da cavidade oral, avaliado pelo ensaio SRB. ....	48
<b>Figura 11:</b> Expressão proteica do MCT1 e MCT4 avaliada por Western-blot em linhas celulares tumorais de adenocarcinoma de mama, carcinoma hepatocelular, adenocarcinoma cervical, glioblastoma, adenocarcinoma colorretal e carcinoma da cavidade oral.....	53
<b>Figura 12:</b> Análise por Imunocitoquímica da expressão das proteínas MCT1 e MCT4, em diferentes linhas celulares.....	57
<b>Figura 13:</b> Representação esquemática da análise eletroforética dos produtos de PCR-RFLP com a enzima BccI, correspondentes aos diferentes genótipos para o polimorfismo T1470A presente no gene MCT1.....	59
<b>Figura 14:</b> Resultados da análise da curva de melting do DNAg, para a amplificação de uma região de 123 bp, contendo o polimorfismo T1470A presente no gene MCT1. ....	60
<b>Figura 15:</b> Representação esquemática da análise eletroforética dos produtos de PCR-RFLP com a enzima PpuMI, correspondentes aos diferentes genótipos para o polimorfismo C44T presente no gene MCT4.....	64
<b>Figura 16:</b> Resultados da análise da curva de <i>melting</i> do DNAg, para a amplificação de uma região de 138 bp, contendo o polimorfismo C44T presente no gene MCT4. ....	65



---

## ÍNDICE DE TABELAS



<b>Tabela 1:</b> Família de transportadores de ácidos monocarboxílicos.....	14
<b>Tabela 2:</b> Alvos moleculares atualmente explorados com potencial atividade antitumoral.....	23
<b>Tabela 3:</b> Painel de linhas tumorais utilizadas no presente trabalho, respetivo meio base de cultura e tipo de cancro do qual foram isoladas.....	31
<b>Tabela 4:</b> Sequência dos primers utilizados na amplificação de fragmentos de DNA genómico contendo o local de polimorfismo em estudo, para o método PCR-RFLP....	35
<b>Tabela 5:</b> Condições de PCR utilizados na amplificação de fragmentos de DNA genómico contendo o local de polimorfismo em estudo, para o método PCR-RFLP....	36
<b>Tabela 6:</b> Sequência dos primers utilizados na amplificação de fragmentos de DNA genómico contendo o local de polimorfismo em estudo, por HRM.....	38
<b>Tabela 7:</b> Condições de HRM utilizadas na amplificação de fragmentos de DNA genómico contendo o local de polimorfismo em estudo. ....	38
<b>Tabela 8:</b> IC <sub>50</sub> do 3-BP determinado para o painel de linhas tumorais, avaliado pelo ensaio de SRB.....	49
<b>Tabela 9:</b> Correlação entre os valores de IC <sub>50</sub> e a expressão proteica das linhas tumorais. Para efeitos de determinação de percentagem relativa de cada um dos transportadores nas diferentes linhas celulares, considerou-se como controlo a linha que apresentava maior expressão de cada transportador, respetivamente.....	54
<b>Tabela 10:</b> Genotipagem do polimorfismo T1470A presente no gene MCT1, nas linhas celulares tumorais, determinada por PCR-RFLP e HRM, e o respetivo valor de IC <sub>50</sub> do 3-BP.....	61
<b>Tabela 11:</b> Genotipagem do polimorfismo C44T presente no gene MCT4 nas linhas celulares tumorais determinada por PCR-RFLP e HRM, e o respetivo valor de IC <sub>50</sub> do 3-BP.....	66
<b>Tabela 12:</b> Concentração extracelular de ácido láctico em culturas de células de adenocarcinoma de mama e glioblastomas, incubadas sem qualquer tratamento.....	68



---

## ABREVIATURAS



<b>3-BP</b>	3-bromopiruvato
<b>A</b>	
<b>A</b>	Adenina
<b>ACC</b>	Acetil-CoA Carboxilase
<b>Ala</b>	Alanina
<b>Asp</b>	Aspartato
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>B</b>	
<b>BSA</b>	Albumina Bovina Sérica
<b>C</b>	
<b>°C</b>	Graus celsius
<b>C</b>	Citosina
<b>CA9</b>	Anidrase Carbónica 9
<b>CHC</b>	$\alpha$ -Ciano 4-hidroxicinamato
<b>CPE</b>	Epitélio do Plexo Coroíde
<b>D</b>	
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
<b>DMEM F12</b>	Meio DMEM suplementado com uma solução de hidrocortisona
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>DNAc</b>	DNA complementar
<b>DNAg</b>	DNA genómico
<b>dNTPs</b>	Desoxinucleótidos Trifosfatos
<b>D.O.</b>	Densidade Ótica
<b>D.P.</b>	Desvio Padrão
<b>E</b>	
<b>ECL</b>	Quimioluminescência
<b>EDTA</b>	Ácido Etilenodiaminotetracético
<b>F</b>	
<b>Fwd</b>	<i>Primer Forward</i>
<b>G</b>	
<b>G</b>	Guanina
<b>G3P</b>	Gliceraldeído-3-Fosfato
<b>GAPDH</b>	Gliceraldeído 3 Fosfato Desidrogenase
<b>GLU</b>	Glutamina
<b>GLUT</b>	Transportador de glicose

<b>H</b>	
<b>H<sup>+</sup></b>	Ião hidrogénio
<b>HbO<sub>2</sub></b>	Hemoglobina Oxigenada
<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	Ião bicarbonato
<b>HIF-1</b>	Fator de transcrição 1
<b>HK</b>	Hexocinase
<b>HK II</b>	Hexocinase II
<b>HRM</b>	<i>High Resolution Melting</i>
<b>HRP</b>	Peroxidase de rábano silvestre
<b>I</b>	
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentração de fármaco requerido para reduzir a viabilidade celular em 50%
<b>IGF-1</b>	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
<b>L</b>	
<b>LDH</b>	Lactato Desidrogenase
<b>LDHA</b>	Lactato Desidrogenase A
<b>M</b>	
<b>MCT1</b>	Transportador de ácidos monocarboxílicos 1
<b>MCT4</b>	Transportador de ácidos monocarboxílicos 4
<b>MCTs</b>	Transportadores de ácidos monocarboxílicos
<b>mg</b>	Miligramas
<b>min</b>	Minutos
<b>mL</b>	Mililitros
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
<b>N</b>	
<b>NADPH</b>	Dinucleotídeo de Adenina Nicotinamida Fosfato Reduzido
<b>NHE1</b>	Permutador Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> 1
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>O</b>	
<b>OS</b>	Sobrevivência global
<b>P</b>	
<b>Pb</b>	Pares de bases
<b>PBS</b>	Tampão Fosfato Salino
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase
<b>PDK1</b>	Piruvato desidrogenase cinase 1
<b>PHDs</b>	Prolil hidroxilases

<b>PPP</b>	Via das pentoses fosfato
<b>PSA</b>	Persulfato de amónia
<b>p/v</b>	Peso por volume
<b>R</b>	
<b>Rev</b>	<i>Primer Reverse</i>
<b>RFLP</b>	Polimorfismo no comprimento de fragmentos de DNA obtidos por restrição enzimática
<b>RFS</b>	Intervalo livre de recidiva
<b>RPE</b>	Epitélio do Pigmento Retinal
<b>rpm</b>	Rotações Por Minuto
<b>RPMI</b>	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<b>S</b>	
<b>SBF</b>	Soro Bovino Fetal
<b>SDS</b>	Dodecil Sulfato de Sódio
<b>SDS-PAGE</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida de dodecil sulfato de sódio
<b>seg</b>	Segundos
<b>SMCTs</b>	Transportadores de ácidos monocarboxílicos com transporte de sódio acoplado
<b>SNPs</b>	Polimorfismos de base única
<b>SRB</b>	Sulforrodamina B
<b>T</b>	
<b>T</b>	Timina
<b>TBST</b>	Solução salina de Tween-20 tamponada com Tris
<b>TCA cycle</b>	Ciclo de <i>Krebs</i>
<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético
<b>TEMED</b>	N,N,N',N' – Tetrametilenodiamina
<b>Tris</b>	2-Amino-2-hidroximetil-propamo-1,3-diol
<b>V</b>	
<b>V</b>	Volt
<b>Val</b>	Valina
<b>v/v</b>	Volume por volume
<b>μ</b>	
<b>μg</b>	Micrograma
<b>μL</b>	Microlitro
<b>μM</b>	Micromolar



## CAPÍTULO I

---

## INTRODUÇÃO



## 1.1. METABOLISMO DO CANCRO

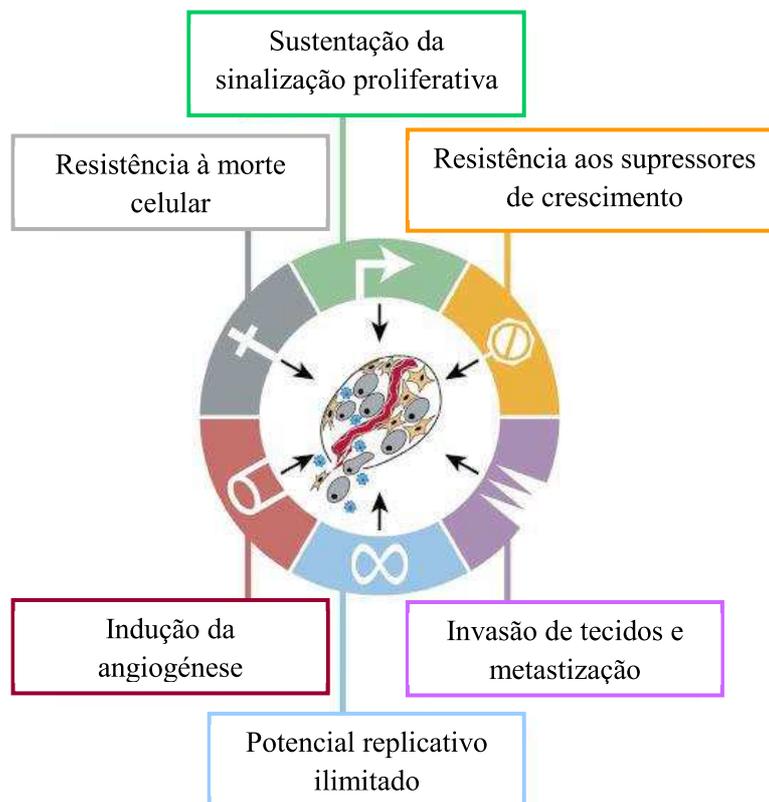
O cancro é um problema de saúde pública, principalmente nos países desenvolvidos. Atualmente, é a segunda causa de morte nos Estados Unidos da América, e pensa-se que possa ultrapassar as mortes relacionadas com doenças coronárias nos próximos anos (1). Em 2006, 21% da população mundial já possuía um registo clínico de pelo menos um tipo de cancro. Porém, a sua frequência na Ásia (8%) e em África (11%) é menor do que no resto do mundo (1). Num estudo de 2008 estimava-se que iriam ocorrer 12,7 milhões de novos casos de cancro e 7,6 milhões de mortes por ano, sendo que 56% eram novos casos e 63% das mortes ocorriam nos países em desenvolvimento (1).

A nível mundial, os tipos de cancro diagnosticados com maior frequência são o cancro do pulmão (12,7%), o cancro da mama (10,9%) e o cancro colorretal (9,7%). Em Portugal, dados entre 2009 e 2014, indicam que os tipos de cancro com maior taxa de incidência são o cancro da próstata, da mama e colorretal. Em 2012, os cancros que se revelaram mais letais foram o cancro da próstata, em que a taxa de mortalidade fixou-se em 36,6 por cada 100 mil habitantes; seguido do cancro da traqueia, brônquios e pulmão, com uma taxa de mortalidade de 34,5 por cada 100 mil habitantes; e o cancro da mama, com uma taxa de mortalidade de 31,8 por cada 100 mil habitantes. Os dados obtidos em Portugal estão de acordo com os números obtidos na União Europeia (2).

Tendo em conta estes dados epidemiológicos, que apresentam o cancro como um problema com elevada taxa de incidência e mortalidade na população mundial, torna-se de extrema relevância a investigação científica nesta área. Apesar do contínuo avanço na investigação de terapias antitumorais, verificam-se ainda hoje, inúmeros casos de ineficácia do tratamento devido em grande parte, a mecanismos de resistência por parte do tumor. Assim, torna-se urgente o conhecimento profundo da biologia da célula tumoral e a descoberta de novos alvos terapêuticos, que conduzam à conceção de novos fármacos e a tratamentos mais eficazes.

Durante o processo de carcinogénese, as células adquirem diferentes propriedades que estão na base da sua elevada capacidade proliferativa e malignidade. Em 2000, Hanahan e Weinberg propuseram um conjunto de seis marcos característicos do cancro, que não são mais do que seis alterações essenciais na fisiologia celular, responsáveis pelo

crescimento e sobrevivência das células tumorais (Figura 1) (3). Tais marcos característicos incluem a resistência à morte celular programada; a vascularização sustentada que permite a indução da angiogénese; o potencial replicativo ilimitado e a invasão dos tecidos e metastização; a resistência aos supressores de crescimento e a sustentação da sinalização proliferativa (3, 4).

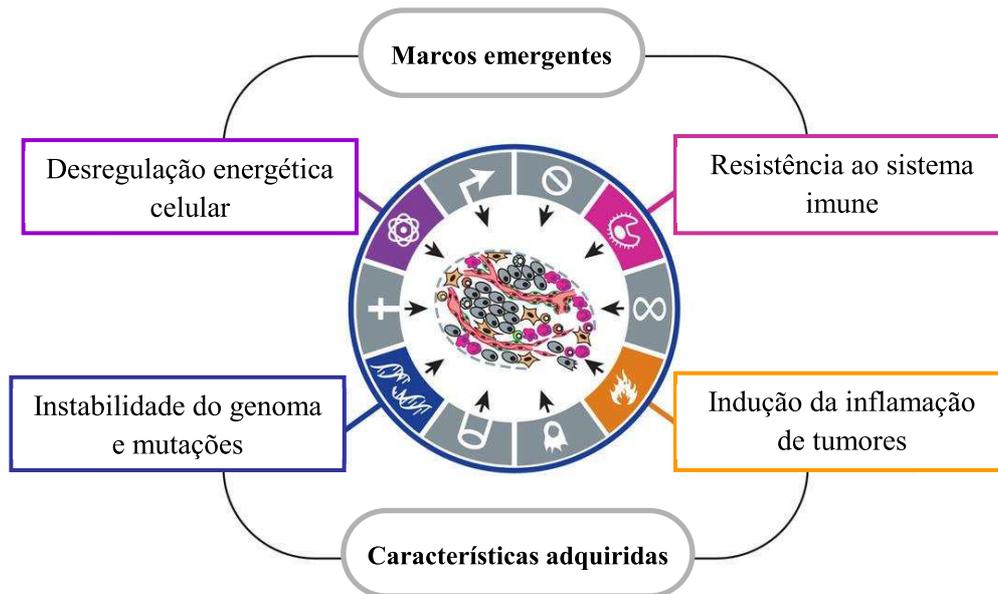


**Figura 1:** Características do cancro. A distinção dos seis marcos característicos do cancro fornecem uma base sólida para a compreensão da biologia do cancro, nomeadamente na capacidade que o cancro dispõe para o crescimento e para a metastização. Os marcos característicos do cancro são a resistência à morte celular; indução da angiogénese; potencial replicativo ilimitado; invasão de tecidos e metastização; resistência aos supressores de crescimento e sustentação da sinalização proliferativa Adaptada de (3).

As células normais que progressivamente vão sofrendo transformações, adquirem algumas destas alterações, dando origem a células tumorais. Após vários processos de transformação, as células tumorais progridem originando um cancro.

No seguimento da investigação da biologia da célula tumoral, Hanahan e Weinberg realizaram um estudo posterior onde indicaram quatro marcos característicos adicionais (Figura 2): 1) o desenvolvimento da instabilidade genómica nas células tumorais, desencadeando mutações aleatórias incluindo rearranjos cromossómicos, que

desencadeiam a progressão do tumor; 2) inflamação por células imunitárias inatas, destinadas a combater infecções, em lesões pré-malignas ou malignas, sendo responsável pela resposta inflamatória do tumor e consequente progressão do mesmo; 3) a capacidade de modificar ou reprogramar o metabolismo celular, a fim de mais eficazmente conseguir a proliferação neoplásica, 4) a capacidade das células tumorais para escapar à destruição imunológica, em particular através dos linfócitos T e B, dos macrófagos e células *natural killer* (5).



**Figura 2:** Novos marcoss característicos emergentes do cancro. Os novos marcoss emergentes representam capacidades que as células tumorais adquirem para poderem proliferar, metastizar e sobreviver ao sistema imunológico. Os marcoss característicos envolvem a desregulação energética celular, a instabilidade do genoma e mutações, resistência ao sistema imune e a indução da inflamação de tumores. Adaptado de (5).

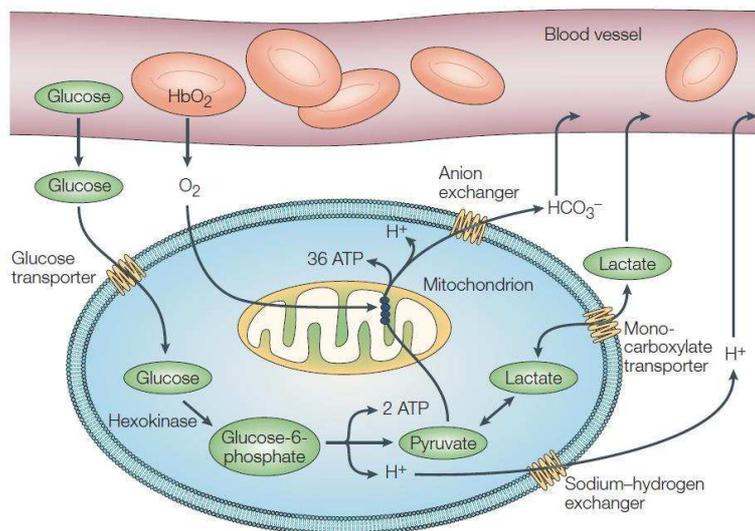
Entre os novos marcoss emergentes do cancro, a alteração do metabolismo energético, tem vindo a ser alvo de um crescente número de estudos por parte da comunidade científica. A reprogramação metabólica da célula tumoral pode contribuir para o seu potencial replicativo e invasivo. Assim, o conhecimento detalhado do metabolismo da célula tumoral pode levar à identificação de novos alvos terapêuticos e desenvolvimento de novos compostos, que podem ser utilizados num tratamento mais específico e eficaz contra o cancro, evitando a proliferação neoplásica (5).

No organismo humano, os nutrientes são fornecidos às células por forma a garantir a sua sobrevivência. Caso a disponibilidade de nutrientes exceda os níveis necessários para suportar a divisão celular, o organismo possui sistemas de controlo que impedem a

proliferação celular descontrolada. As células tumorais ultrapassam esses sistemas de controlo, através da aquisição de mutações genéticas que alteram a funcionalidade das vias de sinalização (4, 6). As células tumorais apresentam diferentes exigências metabólicas em relação à maioria das células diferenciadas normais. Estas exigências de reprogramação bioquímica visam satisfazer as necessidades das células para abastecer as reações anabólicas, de forma a sustentar a sua elevada taxa de crescimento e proliferação (7).

### 1.1.1. “EFEITO DE *WARBURG*”

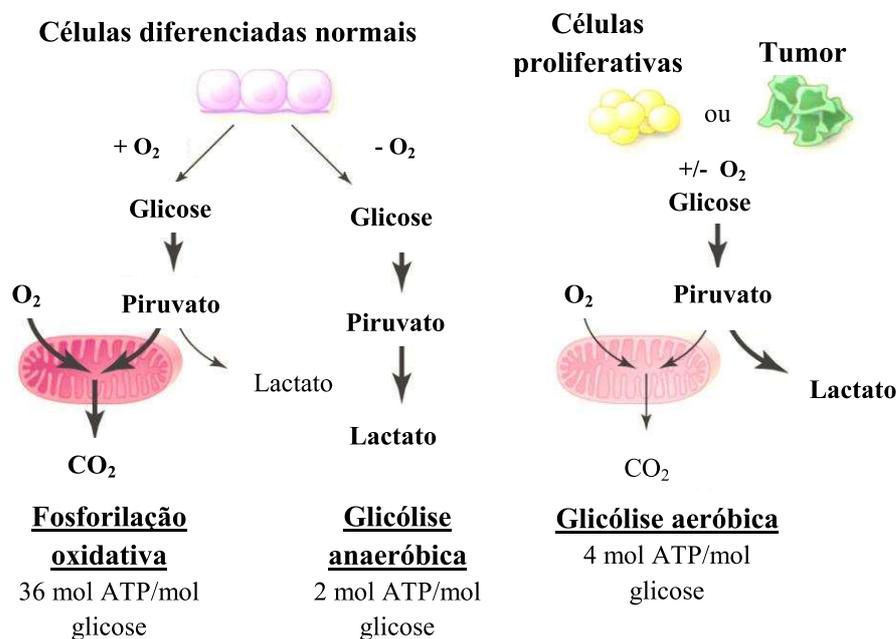
Em condições de hipóxia ou na ausência de sistemas mitocondriais, as células diferenciadas normais consomem a glicose transformando-a em lactato, num processo denominado de glicólise anaeróbia ou fermentação láctica. Contudo, se a mitocôndria estiver funcional, a presença de oxigénio inibe a fermentação láctica (“Efeito de Pasteur”), e a célula recorre à fosforilação oxidativa para a obtenção de energia. A glicose é convertida em piruvato, sendo este totalmente oxidado na mitocôndria através do ciclo de *Krebs* e da cadeia respiratória, com formação de 36 moléculas de ATP por cada molécula de glicose, sendo um processo mais rentável energeticamente para a célula (Figura 3) (8-10).



**Figura 3:** Metabolismo da glicose em células mamíferas. A corrente sanguínea fornece glicose e oxigénio para os tecidos. A glicose é incorporada na célula através de transportadores específicos, sendo convertida inicialmente em glicose-6-fosfato pela hexocinase e, em seguida a piruvato, originando 2 moléculas de ATP por cada molécula de glicose. Na presença de oxigénio, o piruvato é totalmente oxidado, com formação de 36 moléculas de ATP por cada molécula de glicose. Na ausência de oxigénio, o piruvato é reduzido a lactato, que é exportado a partir da célula.

Note-se que ambos os processos produzem iões de hidrogénio ( $H^+$ ) exportados para o exterior da célula, provocando a acidificação do meio extracelular. **Abreviaturas:**  $HbO_2$  - hemoglobina oxigenada;  $HCO_3^-$  - bicarbonato (9).

As células tumorais apresentam uma adaptação do metabolismo da glicose, relativamente às células normais diferenciadas, que consiste no recurso à glicólise aeróbia, mesmo na presença de oxigénio. Este processo também denominado “Efeito de *Warburg*” desvia o piruvato do processo oxidativo, levando ao aumento da produção de lactato, um processo menos rentável energeticamente para a célula tumoral, com uma molécula de glicose o rendimento energético é de apenas 2 moléculas de ATP (Figura 4) (6).



**Figura 4:** Representação do metabolismo através de fosforilação oxidativa ou glicólise anaeróbica em células diferenciadas normais (painel da esquerda) e por glicólise aeróbica ou “Efeito de *Warburg*” em células tumorais (painel da direita). Na presença de oxigénio, as células diferenciadas normais metabolizam a glicose em piruvato, sendo que a maior parte deste entra na mitocôndria, onde é totalmente oxidado pelo processo de fosforilação oxidativa. O oxigénio é necessário neste processo, por funcionar como aceitador final de eletrões. Quando o oxigénio está ausente, as células metabolizam a glicose em piruvato e transformam-no em lactato através da glicólise anaeróbica. Este processo resulta na diminuição da produção de ATP em comparação com a fosforilação oxidativa, sendo menos rentável para a célula. Nas células tumorais, a maior parte da glicose é convertida em lactato, processo denominado de glicólise aeróbica, independentemente da presença de oxigénio (“Efeito de *Warburg*”) Adaptado de (6).

Apesar do menor rendimento energético, o “Efeito de *Warburg*” apresenta vantagens para a sobrevivência e proliferação das células tumorais. Estas estão sujeitas, na maioria das vezes, a condições flutuantes de disponibilidade de oxigénio, ocorrendo

frequentemente situações de hipóxia, devido à elevada proliferação celular e crescimento tumoral e ao seu consequente afastamento dos vasos sanguíneos. Este facto poderia ser letal para as células tumorais, se recorressem apenas à fosforilação oxidativa, processo dependente de oxigénio para gerar energia para os seus processos metabólicos (11). Assim, o “Efeito de *Warburg*” assegura uma maior sobrevivência das células tumorais, se o oxigénio se tornar limitado. Além disso, este metabolismo apresenta outras vantagens, como por exemplo o acesso a precursores biossintéticos (12). As células tumorais quando proliferam rapidamente necessitam de precursores biossintéticos, nomeadamente de precursores de carbono envolvidos na biossíntese de novas células. A via glicolítica e a via das pentoses fosfato são ricas em fontes de precursores essenciais para a biossíntese de ácidos nucleicos, fosfolípidos, ácidos gordos, colesterol e porfirinas. Alguns intermediários da via glicolítica são ainda utilizados na síntese de triglicéridos e fosfolípidos, bem como na produção de alguns aminoácidos e precursores de nucleótidos, sendo todas estas moléculas necessárias à proliferação celular (13, 14). A glutamina, um dos aminoácidos mais abundantes na corrente sanguínea e fundamental no metabolismo da célula tumoral, tem como principais funções a síntese de nucleótidos, a oxidação para a produção de energia celular sob a forma de ATP, o fornecimento de carbono e azoto para a proliferação celular e funciona ainda como precursor da gluconeogénese e da lipogénese (6, 13, 15). Desta forma, a elevada taxa glicolítica na célula tumoral, mesmo na presença de oxigénio, garante a sua sobrevivência, bem como a sua rápida proliferação (16).

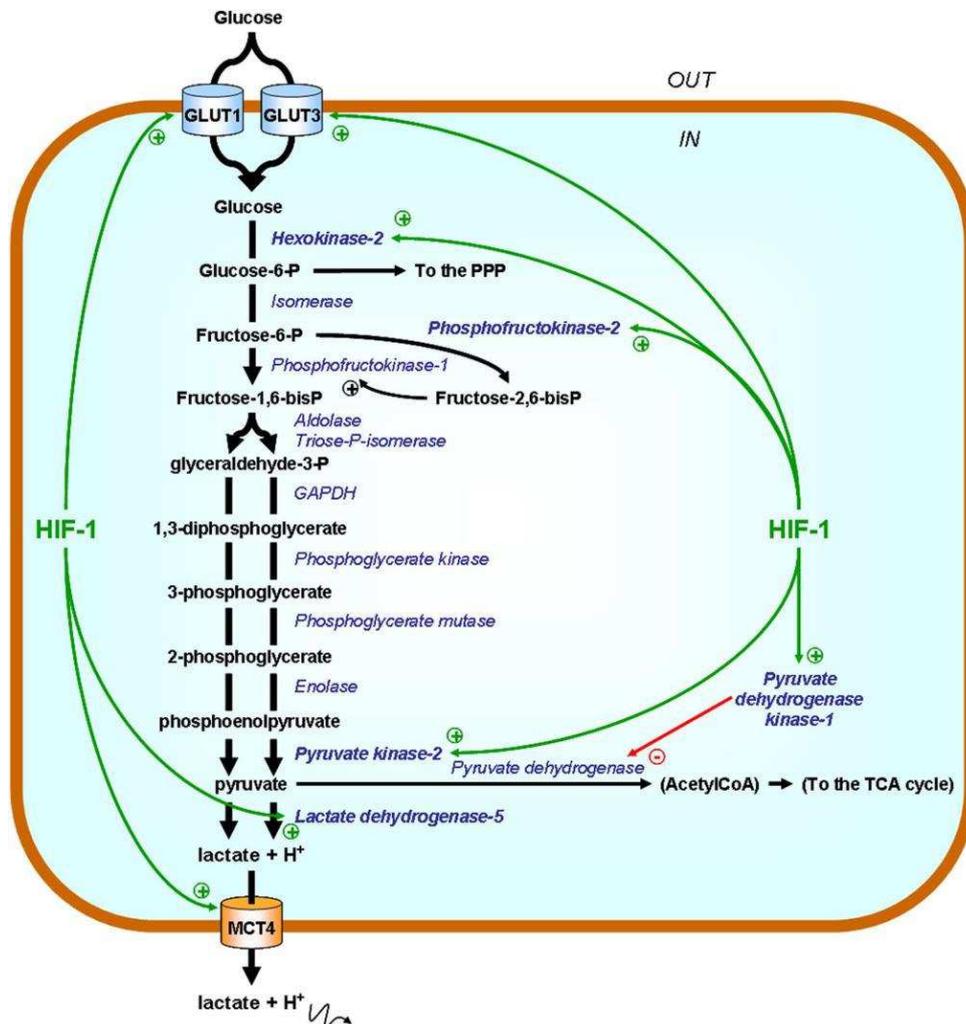
O aumento da taxa glicolítica e o rápido consumo de glicose permite ainda que a célula consiga obter a energia necessária, apesar do menor rendimento do processo utilizado para oxidação da glicose. Adicionalmente, o aumento da taxa glicolítica para obtenção de energia, mesmo na presença de oxigénio, aumenta a produção de lactato no seu meio intracelular. O ácido láctico é exportado para o exterior das células tumorais, através de transportadores específicos, sendo responsável pela acidificação do meio extracelular, característico do microambiente tumoral (17). Este microambiente ácido ativa metaloproteinases que são responsáveis pela degradação da matriz extracelular, aumentando consequentemente a capacidade de migração e invasão das células tumorais, e sendo também responsável pela resistência ao sistema imune e a tratamentos quimioterápicos e radioterápicos (18, 19).

Otto Warburg, foi um cientista alemão na área da fisiologia, bioquímica e medicina do século XX, que descreveu as alterações metabólicas da célula tumoral anteriormente descritas. Verificou que as células tumorais apresentavam taxas glicolíticas muito superiores ao normal, mesmo quando mantidas na presença de oxigênio, em comparação com células saudáveis. Esta observação foi a primeira alteração específica do metabolismo de uma célula tumoral a ser descrita. *Warburg* mencionou ainda que, as células tumorais recorriam à glicólise aeróbia como método de obtenção de energia preferencial, devido a possíveis defeitos no metabolismo energético da mitocôndria, que poderiam estar na base da progressão do cancro (8, 13).

Apesar de inicialmente se ter atribuído estas alterações metabólicas das células tumorais a danos mitocondriais que impediriam dessa forma a fosforilação oxidativa, vários estudos posteriores atribuíram o aumento das taxas glicolíticas nas células tumorais não só a estes danos (as mitocôndrias estão funcionais em vários casos), como também a alterações em alguns oncogenes e genes supressores tumorais e a uma desregulação da glicólise (muitas das células tumorais com “Efeito de *Warburg*” mantêm a funcionalidade da mitocôndria) (6, 10, 20). Apesar destes recentes estudos contrariarem o que foi anteriormente postulado por *Warburg* (do metabolismo glicolítico típico das células tumorais se dever à não funcionalidade mitocondrial), é de salientar que ainda hoje, os seus princípios estão na base de muita investigação relacionada com o metabolismo do cancro. A glicólise aeróbia e o aumento de expressão de genes envolvidos no metabolismo glicolítico são duas características comuns à maior parte das células tumorais (4).

A desregulação das vias energéticas por parte das células tumorais é devido à ativação de determinados oncogenes, entre os quais se inclui o fator de transcrição HIF-1 (21). O HIF-1 é responsável pela regulação e ativação de vários genes associados ao metabolismo da glicose, incluindo genes codificantes do transportador de glicose (GLUT); diversas enzimas envolvidas no metabolismo celular (nomeadamente a lactato desidrogenase A (LDHA), a piruvato desidrogenase cinase 1 (PDK1) e a hexocinase (HK)) e o transportador de ácidos monocarboxílicos 4 (MCT4) (9). A glicose-6-fosfato, proveniente da primeira reação da glicólise, é produzida em abundância nas células tumorais, devido ao aumento da expressão quer de transportadores GLUT, quer da hexocinase (responsável pela conversão de glicose a glicose-6-fosfato), podendo além

da sua utilização na via glicolítica ser desviada para a via das pentoses fosfato, produzindo NADPH. Este garante a síntese de lípidos e constituintes celulares, e ainda a produção de antioxidantes que protegem a célula contra o *stress* oxidativo, encontrado em tumores (Figura 5) (13).



**Figura 5:** Enzimas glicolíticas e transportadores da glicólise. As enzimas glicolíticas estão representadas a letra itálico azul e os substratos a preto. As setas verdes apontam para elemento alvo pelo fator de transcrição 1 (HIF-1) diretamente envolvido na aceleração do fluxo glicolítico. **Abreviaturas:** GAPDH - Gliceraldeído 3 Fosfato Desidrogenase; GLUT - transportador de glicose; MCT4 - transportador de ácidos monocarboxílicos 4; PPP - via das pentoses fosfato; TCA cycle – Ciclo de Krebs (22).

Vários estudos correlacionam os níveis de GLUT com o comportamento agressivo do tumor, assim como o seu potencial invasivo e metastático nas células tumorais, especialmente o GLUT1 e o GLUT3 (22). Tem sido referido o aumento da expressão de GLUT1 em muitos tipos de cancro, nomeadamente, cancro pancreático, hepático, renal, pulmonar, colorretal, cervical, cerebral, da mama, do esófago e do ovário (23). O

GLUT3 é a isoforma predominante nas células da glia que apresentam um comportamento bastante agressivo do tumor. Sabe-se ainda, que esta isoforma pode estar presente no cancro da laringe (24, 25). Existem evidências, em células tumorais, de que o controlo principal do fluxo glicolítico é efetuado não só pelo GLUT, mas também pela HK, como referido anteriormente. Nas células tumorais, a isoforma predominante da HK é a hexocinase II (HK II), que se encontra ligada à membrana externa das mitocôndrias por um canal dependente da voltagem (13, 22). A HK II está ligada diretamente à mitocôndria, capturando o ATP recém sintetizado. Além da HK II escapar à inibição pelo produto da reação glicose-6-fosfato, ao contrário do que acontece com a isoforma hexocinase I (HK I), a sua localização mitocondrial é considerada um ponto crucial, pois permite utilizar não só o ATP citosólico, como também o mitocondrial, levando assim à rápida formação de glicose-6-fosfato e à ativação do fluxo glicolítico (13, 14).

O aumento de fluxo glicolítico conduz a uma elevada produção de piruvato que é posteriormente reduzido a lactato pelas células tumorais. A redução é conseguida através do aumento da expressão da lactato desidrogenase (LDH), bem como da atividade reduzida do transportador de piruvato mitocondrial e da enzima piruvato desidrogenase. Devido ao aumento dos níveis de lactato nas células tumorais, torna-se necessário que este seja transportado para o meio extracelular. O transporte de lactato para o meio extracelular através da membrana plasmática ocorre por um simporte com protões, através dos MCTs, principalmente o MCT4, de modo a evitar a acidificação do meio intracelular. A sua expressão é mais evidenciada no desenvolvimento do cancro em condições de hipóxia. A diminuição da quantidade de piruvato oxidado, via ciclo de *Krebs* e fosforilação oxidativa, e o aumento da produção de lactato são fundamentais para o crescimento e sobrevivência dos tumores. Este facto permite que a biossíntese de lactato regenere o  $\text{NAD}^+$  para sustentar o fluxo glicolítico e evitar a produção de NADH mitocondrial, e consequentemente a fosforilação oxidativa (7).

O lactato produzido em grandes quantidades pelas células glicolíticas pode ser utilizado como combustível energético pelas células tumorais com disponibilidade em oxigénio. Estas fazem o influxo do lactato através dos MCTs, transformando-o em piruvato e utilizam-no no metabolismo oxidativo (13, 26). Este processo denomina-se por simbiose metabólica, entre células tumorais em hipóxia e células tumorais mais

oxidativas, através da glicólise aeróbica, que permite a produção de moléculas de ATP, tão importantes para as reações anabólicas que intervêm na proliferação celular (14).

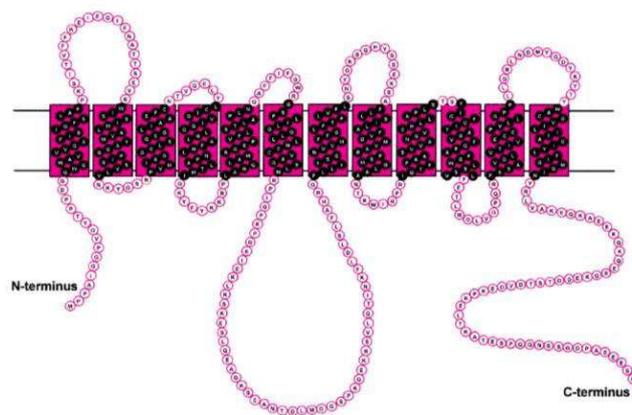
### 1.1.2. INFLUÊNCIA DOS TRANSPORTADORES DE ÁCIDOS MONOCARBOXÍLICOS NO METABOLISMO DO CANCRO

Como referido, as células tumorais apresentam uma elevada taxa glicolítica com consequente aumento da produção e efluxo de lactato, tornando o ambiente extracelular mais ácido. As células tumorais sobrevivem e proliferam, evitando a apoptose, graças a esse efluxo de lactato e de prótons, gerando-se assim um gradiente de pH entre o meio intracelular ( $\geq 7,4$ ) e o meio extracelular (6,7-7,1) (27). Este gradiente é mantido através da expressão de transportadores de prótons, entre os quais se incluem os MCTs, que fazem o efluxo dos mesmos para o meio extracelular, tornando assim o meio intracelular mais alcalino e o meio extracelular mais ácido. (13).

Em alguns tecidos com elevadas taxas glicolíticas, como por exemplo o músculo esquelético branco (principalmente em condições de exercício físico intenso) e as hemácias, que obtêm energia através da glicólise, ocorre produção de grandes quantidades de lactato (28). Em outros tecidos do organismo humano, como o coração e o músculo esquelético vermelho, o lactato pode por sua vez ser utilizado como fonte de energia, onde os MCTs realizam o influxo de lactato para célula. O mesmo acontece nos rins e no fígado, em que o transporte de lactato é realizado através dos MCTs, sendo depois utilizado no processo de gluconeogénese (28). Nas células tumorais, a produção de lactato também é elevada, uma vez que as células obtêm energia essencialmente através da glicólise aeróbica (13). A acumulação de lactato intracelular resulta num *feedback* negativo inibindo a glicólise, e consequente apoptose celular. Assim, o transporte de lactato, para o exterior da célula é fundamental para a funcionalidade das células tumorais (13).

Duas famílias de transportadores de lactato já foram identificadas: os MCTs e os transportadores de ácidos monocarboxílicos com transporte de sódio acoplado (SMCTs). Os SMCTs constituem uma família com apenas dois membros descritos, o SLC5A8 e o SLC5A12 e encontram-se expressos principalmente nos rins e no intestino (29). Quanto aos MCTs, constituem uma família de 14 membros designada por

SLC16A (Tabela 1). Cada uma das proteínas membro desta família contém 12 domínios transmembranares. Esta estrutura apresenta um grande *loop* entre os domínios transmembranares 6 e 7, que possui uma gama de 29 a 105 resíduos de aminoácidos (30). As regiões transmembranares são altamente conservadas, ao passo que as regiões hidrofílicas apresentam pouca conservação (N- e C- terminais), o que indica que não serão responsáveis pelo transporte (Figura 6). A variabilidade é comum no domínio 12 dos transportadores, e pensa-se que essas variações na sequência estão relacionadas com o substrato específico ou com a regulação da atividade de transporte (29).



**Figura 6:** Topologia da membrana proposta da família MCT (28).

A família de genes SLC16 humano tem uma nomenclatura descompassada, devido aos MCTs terem sido nomeados na ordem da sua caracterização funcional, enquanto que os genes SLC16 foram enumerados de acordo com as sequências de DNA complementar (DNAc) que foram sendo disponibilizadas (31).

Vários compostos exógenos e endógenos são substratos dos MCTs, incluindo o lactato, o piruvato, o butirato, os corpos cetônicos, o acetato e  $\gamma$ -hidroxibutirato (29, 32). Dos 14 membros da família dos MCTs, apenas quatro são considerados transportadores de ácidos monocarboxílicos como o lactato, o piruvato e os corpos cetônicos, sendo estes os MCT1, MCT2, MCT3 e MCT4. Os restantes transportadores são descritos no transporte de outros substratos, como por exemplo hormonas da tiroide T3 e T4 ou ácidos aromáticos (31). Dos MCTs que são transportadores de ácidos monocarboxílicos, apenas serão abordados o MCT1 e MCT4, uma vez que são estes que apresentam uma maior ubiquidade e uma maior expressão em células tumorais, e são alvos do presente estudo. Recentemente, foram realizados estudos para ambos os genes, relativos a polimorfismos existentes que podem interferir no transporte dos ácidos monocarboxílicos, nomeadamente no transporte do lactato.

**Tabela 1:** Família de transportadores de ácidos monocarboxílicos (MCTs). **Abreviaturas:** RPE - Epitélio pigmentar da retina; CPE - Epitélio do plexo coroíde. Adaptado de (29).

<b>Proteínas</b>	<b>Gene</b>	<b>Expressão em tecidos</b>	<b>Principais substratos</b>
<b>MCT1</b>	SLC16A1	Ubíqua	Lactato, piruvato, corpos cetônicos
<b>MCT2</b>	SLC16A7	Rim, Cérebro	Lactato, piruvato, corpos cetônicos
<b>MCT3</b>	SLC16A8	Epitélio pigmentar da retina (RPE), Epitélio do plexo coroíde (CPE)	Lactato
<b>MCT4</b>	SLC16A3	Músculo esquelético, condrócitos, leucócitos, testículos, pulmão, placenta, coração	Lactato, piruvato, corpos cetônicos
<b>MCT5</b>	SLC16A4	Cérebro, rim, músculo, pulmão, ovário, placenta, coração	---
<b>MCT6</b>	SLC16A5	Rim, músculo, cérebro, coração, pâncreas, próstata, pulmão, placenta	---
<b>MCT7</b>	SLC16A6	Cérebro, pâncreas, músculo	---
<b>MCT8</b>	SLC16A2	Fígado, coração, cérebro, timo, intestino, ovários, próstata, pâncreas, placenta	T3 e T4
<b>MCT9</b>	SLC16A9	Endométrio, testículos, ovários, mama, cérebro, rim, adrenal, RPE	---
<b>MCT10</b>	SLC16A10	Rim, intestino, músculo, placenta, coração	Aminoácidos aromáticos
<b>MCT11</b>	SLC16A11	Pele, pulmão, ovários, mama, pâncreas, RPE, CPE	---
<b>MCT12</b>	SLC16A12	Rim	---
<b>MCT13</b>	SLC16A13	Mama, células da medula óssea	---
<b>MCT14</b>	SLC16A14	Cérebro, coração, ovários, mama, pulmão, pâncreas, RPE, CPE	---

### 1.1.2.1. TRANSPORTADOR DE ÁCIDOS MONOCARBOXÍLICOS 1 (MCT1)

O MCT1 é o membro da família dos MCTs mais estudado e está presente na maioria dos tecidos (29, 33). O gene humano SLC16A1, que codifica para o MCT1, localiza-se no cromossoma 1. A proteína é composta por 494 aminoácidos e apresenta um peso molecular de ~ 54kDa (34). A principal função do MCT1 é permitir o influxo e efluxo de lactato em função do estado metabólico da célula. No fígado e no rim, o MCT1 é responsável pela entrada de lactato nas células, visto ser um substrato da gluconeogénese, processo importante na formação de glicose, em situações em que esta escasseia no sangue (32, 35). No coração e no músculo esquelético vermelho, o MCT1 é responsável por fazer o influxo de lactato e corpos cetónicos para o interior dos miócitos, sendo estes depois oxidados na mitocôndria. Estes compostos são importantes combustíveis, quando se encontram em concentrações elevadas, podendo ser utilizados como fonte de energia. Assim, existe uma forte correlação entre a quantidade de MCT1 que é expressa nas fibras musculares e a sua capacidade oxidativa (35).

Além do coração e do músculo esquelético vermelho, o MCT1 também é responsável pelo influxo dos mesmos ácidos monocarboxílicos através da barreira hematoencefálica para serem utilizados pelos neurónios como combustíveis respiratórios, sendo aí transportados através do MCT1 ou MCT2. Ambas as isoformas usam os ácidos monocarboxílicos como substratos, nomeadamente o piruvato e o lactato, sendo que o MCT2 apresenta maior afinidade para os mesmos. Tanto no caso do músculo esquelético como no cérebro, existe cooperação entre as duas isoformas MCT (MCT1 e MCT2) envolvidas no fluxo de ácido láctico. Em alguns casos, a afinidade mais elevada para o piruvato e o lactato pode levar a que esta função seja cumprida pelo MCT2 (35). Em tecidos como os linfócitos T, o metabolismo energético é na sua maioria glicolítico, com grande produção de lactato. O MCT1 é quem medeia o efluxo deste monocarboxilato para o meio extracelular. Dados recentes realçam a importância do MCT1 durante a ativação e proliferação dos linfócitos T em repouso. Esta proliferação é acompanhada pela ativação do metabolismo glicolítico e consequente aumento da produção e efluxo de lactato (35).

O MCT1 pode ser importante nas alterações redox que ocorrem entre o NADH (forma reduzida) e o  $\text{NAD}^+$  (forma oxidada) nas células. Mais especificamente, em situações em que o rácio  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  citosólico leva a alterações no rácio [lactato]/[piruvato] e vice-versa. Como os ácidos monocarboxílicos são rapidamente transportados, quer para o interior, quer para o exterior das células pela forma MCT1, este rácio depende da atividade deste transportador (35). Foram ainda apresentadas propostas adicionais de funções para o MCT1, como mediar o transporte de alguns fármacos através da membrana plasmática das células epiteliais no rim e no intestino e através da barreira hematoencefálica (36).

Em tecidos como as células tumorais em condições de hipóxia, que dependem mais da glicólise como método de obtenção de energia, observa-se elevada produção de lactato, (resultado da glicólise) que será exportado juntamente com os prótons, através essencialmente do MCT1, associado ao MCT4, para o microambiente tumoral (35).

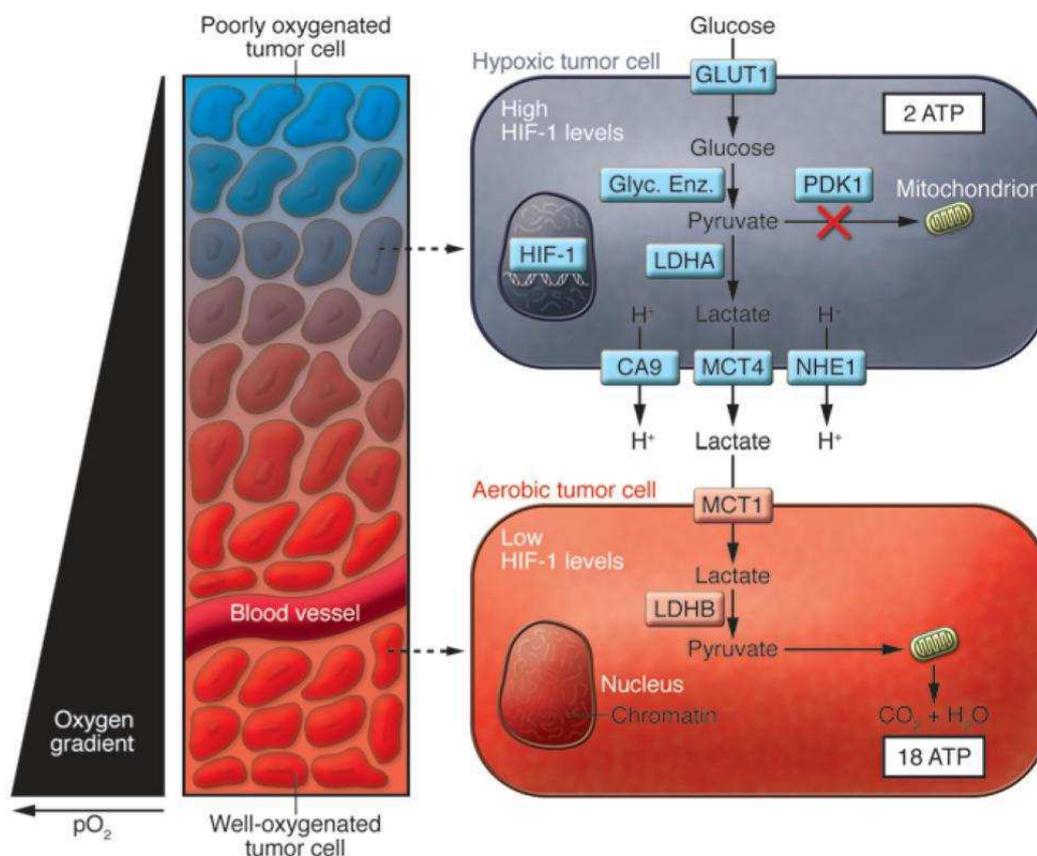
### 1.1.2.2. TRANSPORTADOR DE ÁCIDOS MONOCARBOXÍLICOS 4 (MCT4)

O gene humano SLC16A3 que codifica para o MCT4 localiza-se no cromossoma 17 (37). A proteína contém 465 aminoácidos, correspondendo a um peso molecular de ~ 49kDa. O MCT4 é predominantemente expresso em células com elevadas taxas glicolíticas, tais como o músculo esquelético branco e as hemácias, sugerindo que a sua função fisiológica está relacionada essencialmente com o efluxo de lactato (37, 38). O papel do MCT4 é suportado pela sua elevada expressão na placenta, onde está envolvido na transferência de lactato para a circulação materna (29).

Embora o MCT1 e MCT4 estejam presentes nas membranas das células normais, existe indicação da sua expressão estar aumentada nas células tumorais. Este facto deve-se à elevada produção de lactato e do seu consequente efluxo pela célula (39, 40). O efluxo de lactato é mediado principalmente pelo MCT4, enquanto que o MCT1 é responsável por reintroduzir o lactato nas células tumorais com maior disponibilidade de oxigénio (Figura 7) (26, 31, 41). Assim, observa-se que os transportadores MCT1 e MCT4 apresentam expressão distinta nas células tumorais, relacionado com o facto de estes permitirem uma simbiose metabólica entre as células aeróbias e células em hipóxia. O

MCT4 é mais expresso em células altamente glicolíticas, que exportam elevada quantidade de lactato para o meio extracelular, sendo este utilizado pelas células tumorais com metabolismo oxidativo, que possuem maior expressão de MCT1 (26).

A função do MCT1 e MCT4 é assim, reduzir a acidificação intracelular durante as condições de elevado fluxo glicolítico, restabelecendo o pH intracelular durante a reoxigenação, após um período de hipóxia (35). A regulação funcional dos MCTs está associada a uma proteína auxiliar, a chaperona CD147, que funciona como regulador da localização e expressão das isoformas MCT1, MCT3 e MCT4. A chaperona, associada aos MCTs localizados na membrana celular permite o transporte de substâncias para locais específicos, nomeadamente do ácido láctico (33). Foi descoberto que a glicoproteína CD44 e o seu ligando principal, o ácido hialurônico, também estão envolvidos na associação dos MCT1/MCT4 com a chaperona CD147 na agressividade do tumor e na resistência a tratamentos quimioterápicos (42).



**Figura 7:** Simbiose metabólica entre células tumorais expostas a diferentes pressões de oxigênio. Dependendo da localização do tumor e a distância aos vasos sanguíneos, as células tumorais podem estar sujeitas a vários níveis de exposição ao oxigênio. As células tumorais mais afastadas dos vasos sanguíneos encontram-se normalmente em hipóxia, apresentando uma elevada expressão do fator de transcrição HIF-1, bem como de enzimas glicolíticas. Esse aumento conduz a uma elevada formação de ácido láctico, o qual é exportado pelo transportador MCT4. Pelo contrário, as células tumorais com maior disponibilidade de oxigênio captam o lactato produzido pelas células em

hipóxia, normalmente através do transportador MCT1, sendo este utilizado como fonte energética por estas células. **Abreviaturas:** LDHA/B - lactato desidrogenase A/B; PDK1 - piruvato desidrogenase cinase 1; MCT1/4 - transportadores de ácidos monocarboxílicos 1/4; CA9 - anidrase carbônica 9; NHE1 - permutador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 1; HIF - 1-fator indutível por hipóxia. Figura adaptada de (41).

### 1.1.3. POLIMORFISMOS GENÉTICOS NOS GENES ENVOLVIDOS NO METABOLISMO DAS CÉLULAS TUMORAIS: IMPLICAÇÕES NA SUSCETIBILIDADE E NO TRATAMENTO

*Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) são polimorfismos com alteração de um único nucleótido, sendo a forma mais frequente de variações genéticas. Há evidências de que os SNPs podem ser usados como promissores biomarcadores com base na genética individual, de forma a antever respostas terapêuticas e o prognóstico em doentes com cancro (43).

Mutações nos MCTs podem fornecer uma explicação para algumas condições fisiopatológicas observadas (32). Defeitos na isoforma MCT1 podem estar associados a deficiências no transporte de lactato nas hemácias e tecidos musculares. Na literatura, um estudo efetuado por Merezhinskaya revelou a existência de três mutações *missense* no gene MCT1, em cinco doentes com deficiência sintomática no transporte de lactato. Este estudo parece ter sido a primeira pesquisa realizada ao nível de mutações clinicamente relevantes no gene do transportador MCT1 (44). Estudos posteriores, de genotipagem de polimorfismos no gene MCT1 na população chinesa, detetaram sete novas variantes genéticas no gene SLC16A1, das quais, quatro eram consideradas novas variantes (32).

Um estudo de Pértega-Gomes e os seus colaboradores, revelou o aumento da expressão do transportador MCT4 nas células com lesão no cancro da próstata, relacionando o aumento da expressão desta proteína com um mau prognóstico (45). Um estudo posterior, com base na população chinesa, revelou que foram identificadas 46 variações genéticas no gene MCT4, das quais 33 eram novas mutações, com 5 variantes *nonsynonymous* (mutação de um nucleótido que leva à alteração da sequência de aminoácidos da proteína). No entanto, dessas 5 variantes *nonsynonymous*, apenas uma compromete a função da proteína (37). Tendo em conta que a função do transportador MCT4 é permitir o efluxo de ácido láctico a partir de tecidos glicolíticos no sangue,

mutações neste gene podem levar à diminuição da exportação de lactato, apresentando consequências prejudiciais. Estas consequências são nomeadamente a acidificação do meio intracelular, a diminuição da simbiose metabólica e, em última instância, a morte da célula.

### 1.1.3.1 PREVALÊNCIA E IMPLICAÇÕES DOS POLIMORFISMOS NOS TRANSPORTADORES DE ÁCIDOS MONOCARBOXÍLICOS MCT1 E MCT4

#### MCT1

O polimorfismo do gene MCT1 genotipado no presente estudo foi o T1470A (que consiste na troca de uma timina (T) por uma adenina (A) na posição 1470 do gene e leva à substituição do aminoácido ácido aspártico, na posição 490, por ácido glutâmico (Asp490Glu)) (32). O polimorfismo localizado no gene MCT1, designado por T1470A no presente estudo, possuiu anteriormente a nomenclatura de A1470T. Alguns estudos mais antigos utilizam a anterior nomenclatura.

Num estudo realizado em 2000, Merezhinskaya e colaboradores não atribuíram qualquer efeito patológico à presença do polimorfismo T1470A, apesar da velocidade de transporte do lactato ser abaixo do normal nos indivíduos heterozigotas, considerando estas alterações variações normais (44). Num estudo posterior, onde foi efetuado um estudo populacional num grupo étnico chinês da população de Singapura, verificou-se que a frequência alélica de base nucleotídica T e A eram de 34,7% e 65,3% respetivamente, com uma percentagem de heterozigotas de 51% (n=95). Como o ácido glutâmico e o ácido aspártico são ambos grupos amino, com propriedades físico-químicas semelhantes, os autores sugerem que a substituição não resultaria numa alteração prejudicial. Isto é consistente com os resultados obtidos utilizando o *software* Poli-Phen que presumiu que este SNP seria benigno e improvável de ter qualquer efeito significativo sobre a função da proteína (32). No entanto, outros estudos relativamente à influência da presença deste polimorfismo na atividade do MCT1, vieram contradizer o estudo anterior, onde revelaram que o polimorfismo está associado a uma redução de transporte de lactato nas células musculares, utilizando atletas como modelo de estudo (46-48). Na literatura, existem muitos artigos que fazem referência a estudos com

desportistas e que correlacionam o polimorfismo T1470A com os níveis de lactato exportado pelas células musculares. Durante o exercício físico, nomeadamente anaeróbico, o transporte de lactato é fundamental para o metabolismo e regulação do pH intracelular. O efluxo de ácido láctico permite que outras células possam usufruir dele, nomeadamente células que realizem a gluconeogénese, como por exemplo, o rim e o fígado, ou que usem o lactato como combustível respiratório, como é o caso do coração. Num estudo de Raúl Pérez Prieto, foi estudada a recuperação ativa por parte de atletas, através da capacidade de transporte do lactato acumulado para o exterior das células musculares. Verificou-se que os indivíduos que possuíam o alelo selvagem apresentaram significativamente maior capacidade no transporte do lactato na recuperação ativa do que os indivíduos portadores do alelo para a mutação. Como indivíduos homocigotas mutantes apresentaram menor capacidade no efluxo do lactato, são mais suscetíveis a apresentarem lesões musculares. Neste estudo concluiu-se que o MCT1 era determinante na mobilização do lactato sanguíneo nos períodos de máxima velocidade de efluxo (49).

Num outro estudo de Fedotovskays, foi demonstrado que existe uma frequência significativamente maior do alelo selvagem em atletas de resistência do que no grupo controlo (cidadãos saudáveis sem qualquer experiência de desporto competitivo). Os atletas masculinos de remo que possuem o alelo para a mutação mostraram redução na capacidade do transporte de lactato para a corrente sanguínea. Os elevados níveis de lactato nas células musculares esqueléticas podem induzir a expressão de genes associados a hipertrofia muscular, como IGF-1 e a hormona de crescimento. Vários estudos indicam que a acumulação de lactato nos músculos esqueléticos e na corrente sanguínea podem auxiliar os atletas a alcançar um maior nível de hipertrofia muscular. Consequentemente, os atletas adquirem um nível atlético de alta *performance*, podendo nestes casos o polimorfismo T1470A não ter efeito prejudicial no exercício físico (47).

Foi também avaliado o efeito de alguns polimorfismos nos genes MCTs no prognóstico de doentes com cancro de pulmão na população chinesa. Para o polimorfismo T1470A, os doentes que apresentam os genótipos AA e TA mostraram uma sobrevivência global (OS) e um intervalo livre de recidiva (RFS) superiores aos doentes homocigóticos normais que revelaram menores benefícios na quimioterapia adjuvante. A OS consiste no período de tempo, a partir da data de diagnóstico, que os doentes com cancro

conseguem sobreviver à doença. A RFS consiste no período de tempo, a partir do início do tratamento, que os doentes com cancro sobrevivem sem quaisquer sinais e/ou sintomas de cancro. A quimioterapia adjuvante melhorou significativamente o prognóstico de doentes homozigotas mutantes e heterozigotas, o que não se verificou em doentes que apresentam o alelo selvagem (50). Fei e Guo e colaboradores, também avaliaram os efeitos de alguns polimorfismos nos genes que codificam para MCTs, mas em relação ao prognóstico de doentes com cancro colorretal. Os doentes que apresentam genótipo homozigota mutante e heterozigota demonstraram uma OS e um RFS significativos. A ausência do polimorfismo nestes doentes poderá contribuir para a progressão do cancro colorretal. Em ambos os estudos com doentes com cancro de pulmão e colorretal em que se avaliou o efeito nomeadamente do polimorfismo T1470A, verificou-se que este pode afetar os resultados clínicos esperados, em relação à quimioterapia (43).

## **MCT4**

O polimorfismo C44T presente no gene MCT4 (responsável pela troca de uma citosina (C) por uma timina (T) na posição 44 do gene) leva à substituição do aminoácido alanina, na posição 44 por valina (Ala15Val), e localiza-se na parte N-terminal da proteína. Esta mutação é suscetível de afetar o funcionamento do transportador no acoplamento energético, sendo provavelmente prejudicial, de acordo com o previsto com o *software* Polyphen. Num estudo de 2012, onde se efetuou um estudo populacional na população de Singapura, foi revelado que a frequência alélica da base nucleotídica T (específica para a mutação) é de 0,011 na população chinesa e de 0,042 na população indiana (37). São praticamente inexistentes os estudos realizados até ao momento referentes à análise funcional de polimorfismos do MCT4, sendo esta a única publicação que refere um possível efeito deletério deste polimorfismo em humanos (37).

O estudo do polimorfismo T1470A (presente no gene MCT1) e do polimorfismo C44T (presente no gene MCT4), bem como de outros polimorfismos, pode ajudar a prever a resposta à quimioterapia em doentes com cancro. O estudo da genotipagem pode auxiliar na resposta aos tratamentos quimioterápicos, embora após validação em estudos futuros (43, 50).

## 1.2. TERAPIAS ANTITUMORAIS DIRECIONADAS AO METABOLISMO DO CANCRO

O “Efeito de Warburg” é uma característica das células tumorais, que lhes possibilita a obtenção de energia, bem como de precursores biossintéticos para a proliferação de novas células. A reprogramação do metabolismo celular que suporta a sobrevivência e a proliferação das células tumorais é reconhecida como um marco característico do cancro. Este marco é um alvo terapêutico específico, uma vez que as células normais diferenciadas apresentam uma taxa metabólica inferior comparativamente as células tumorais (51). O ácido láctico tem um papel importante nas características do tumor, pelos seus níveis elevados estarem associados a um pior prognóstico, contribuindo diretamente para a progressão do tumor (52). Assim, têm surgido terapêuticas antitumorais tendo como alvo as vias metabólicas, incluindo enzimas metabólicas, vias de sinalização que regulam o metabolismo celular e inibidores de transportadores incluindo MCTs, sendo que algumas destas terapêuticas estão já em fase pré-clínica (53-55). No entanto, tal como referido neste capítulo, no ponto 1.1, as células tumorais apresentam outros marcos que as caracterizam, que são também elas alvos terapêuticos (Tabela 2).

De entre os compostos desenvolvidos destaca-se o 3-bromopiruvato (3-BP), um potente agente alquilante que tem como função inibir a proliferação das células tumorais, através da inibição da HK II, que por sua vez inibe a glicólise e consequentemente induz a morte celular (56). Um dos estudos existentes acerca deste composto refere que este é capaz de induzir a apoptose em carcinomas hepatocelulares, quer *in vitro*, quer *in vivo* (20). Encontra-se descrito que os MCTs estão envolvidos no mecanismo de ação do 3-BP, nomeadamente mediando o influxo do composto para o interior das células tumorais, podendo assim a sua ação citotóxica e antitumoral ser influenciada pela expressão e atividade destes transportadores, os quais poderão depender da presença dos polimorfismos anteriormente referidos (57).

**Tabela 2:** Alvos moleculares atualmente explorados com potencial atividade antitumoral (20, 26, 58, 59).

<b>Grupo alvo</b>	<b>Alvo molecular específico</b>	<b>Compostos</b>	<b>Efeitos</b>
<b>Glicólise</b>	Via glicolítica	2-desoxiglicose	Inibição da via da glicose
	Hexocinase I e II (HK I e II)	3-bromopiruvato (3-BP)	Inibição da atividade enzimática e dissociação da mitocôndria
	Piruvato desidrogenase cinase 1 (PDK1)	Dicloroacetato	Diminuição da inibição da piruvato desidrogenase pela PDK1
	Lactato desidrogenase A (LDHA)	siRNA	Inibição
<b>Síntese de ácidos gordos</b>	Acetil-CoA carboxilase (ACC)	Sorafen A	Inibição
	Síntese de ácidos gordos (FASN)	Cerulenin	Inibição
<b>HIF</b>	HIF-1 $\alpha$ protil hidroxilases (PHDs)	$\alpha$ -cetogluturato	Ativação de PHDs para a inibição do HIF
	HIF-1 $\alpha$	Equinomicina	Inibição da sua ligação ao DNA
	ERO	N-acetilcisteína, vitamina C	A neutralização das ERO reduz a atividade da HIF-1
<b>Efluxo de prótons</b>	MCT1	$\alpha$ -ciano-4-hidroxicinamato (CHC) Bioflavonoides Lonidamine	Inibição
	MCT4	Lonidamine Simvastatina	Inibição
	Permutador Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> 1	Cariporide	Inibição
	Anidrase carbónica 9	Indisulam sulfonamida	Inibição
	Permutador HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /Cl <sup>-</sup>	S-3705	Inibição
<b>Outros</b>	AMPK	Biguanidas (metformina) e hiazolidinediones	Ativação
	eIF4E	Oligonucleotido antisense	Inibição da translação mediada por eIF4E

### 1.2.1. 3-BROMOPIRUVATO

O 3-BP é um agente alquilante derivado do piruvato, que piruvila proteínas na maioria no grupo SH de resíduos de cisteína, tendo como consequência a sua perda de funcionalidade (Figura 8) (60-62). O 3-BP tem a particularidade de ser uma pequena molécula que se liga covalentemente, com eficácia e especificidade aos locais ativos de certas enzimas, inativando-as (62, 63).

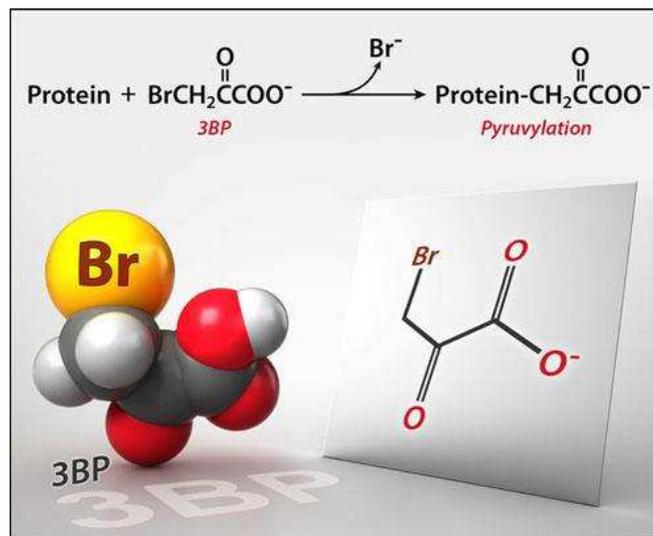
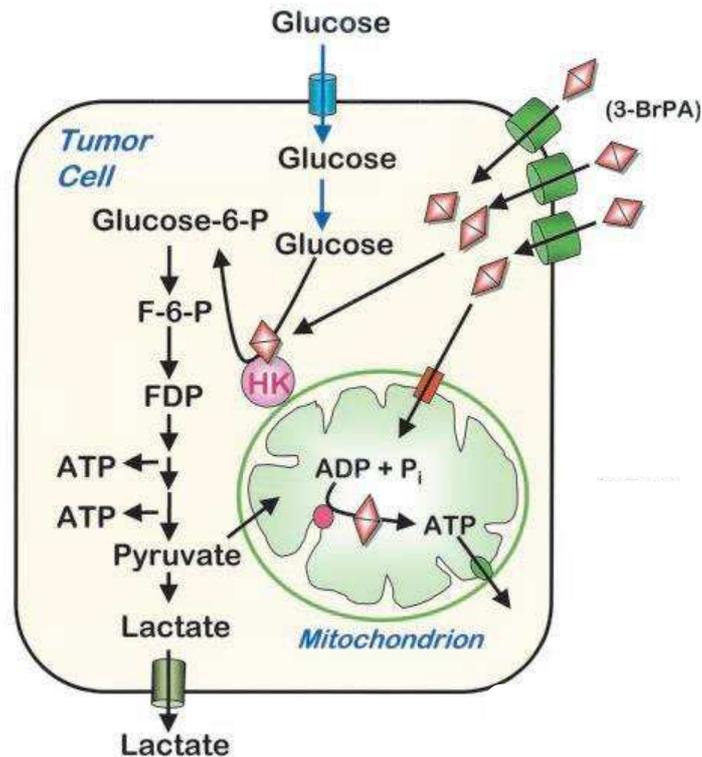


Figura 8: Estrutura química do agente alquilante 3-bromopiruvato (3-BP) (63).

A maioria dos alvos conhecidos do 3-BP está envolvida no metabolismo energético das células, levando à diminuição do ATP, e consequentemente à morte das células tumorais por autofagia (64), necrose (65) ou apoptose (66), dependendo do tipo de cancro. Alguns dos alvos do 3-BP são enzimas da via glicolítica como a HK II e a GAPDH, a succinato desidrogenase na mitocôndria, e proteínas de organelos como o retículo endoplasmático e os lisossomas (67-69). O 3-BP inibe a glicólise através da inativação da enzima chave desta via glicolítica, a HK II, tendo também ação inibitória ao nível da fosforilação oxidativa, diminuindo consequentemente a produção de ATP de forma drástica (Figura 9) (56, 63, 70). Como a glicólise é a fonte de energia mais utilizada pelas células tumorais para sustentar o seu crescimento descontrolado, observa-se a superexpressão da HK II, que está diretamente relacionada com um mau prognóstico (71). O 3-BP induz uma modificação covalente na HK II, provavelmente em resíduos de cisteína, dissociando-o a partir da mitocôndria. O 3-BP reduz os níveis

de ATP e NADPH, bloqueando a glicólise e a via das pentoses fosfato em células tumorais, diminuindo o seu crescimento ou desencadeando a apoptose (71, 72).



**Figura 9:** Possíveis mecanismos de ação do 3-bromopiruvato (3-BP) numa célula tumoral. O 3-BP, um composto análogo ao piruvato, entra na célula através de transportadores específicos, os transportadores de ácidos monocarboxílicos (MCTs) e inibe a produção de ATP celular. A inibição de ATP pode ser efetuada através da glicólise, pela inibição da hexocinase II, ou através da fosforilação oxidativa (70).

As células tumorais apresentam elevada expressão de HK II em relação às células normais, visto possuírem um metabolismo altamente glicolítico, por forma a manter os elevados níveis de fornecimento de ATP para o desenvolvimento do tumor. Deste modo, a utilização de inibidores glicolíticos como terapias antitumorais, nomeadamente o 3-BP, que tem como alvo esta enzima, pode conduzir a uma terapêutica bastante seletiva para as células tumorais, poupando as células normais (73).

Considera-se que o 3-BP é um agente anticancerígeno bastante promissor, visto que ao contrário de muitos outros compostos utilizados em quimioterapia, não atua no metabolismo dos ácidos nucleicos, nem nas vias de transdução de sinal, mas sim no metabolismo energético da célula tumoral (70). Os quimioterápicos que têm os ácidos nucleicos como alvo são eficazes em alguns tipos de cancro mas não em todos, apesar de os ácidos nucleicos serem sintetizados em todas as células tumorais. Este facto

ocorre porque existem vários processos metabólicos para suportar o metabolismo da proliferação tumoral, e não apenas um único, específico de cada tumor (74).

Apesar de o 3-BP ser um composto bastante promissor com atividade antitumoral, testado *in vitro* e *in vivo*, ainda não foi introduzido na prática clínica em humanos, com a exceção de um caso recente de um doente de 16 anos diagnosticado com carcinoma hepatocelular em estado avançado. O doente apresentava dor abdominal, aumento dos níveis das enzimas hepáticas no sangue, aumento do tamanho do baço e necrose. Devido à gravidade da situação, o doente não possuía requisitos para cirurgia. O hospital juntamente com um grupo científico, que estudava o efeito antitumoral do 3-BP, decidiram administrar o composto, em várias fases de tratamento. Apesar da sua situação preocupante, o doente revelou sinais de recuperação. No entanto, foram observados aumento dos níveis de amónia devido à lise celular, por parte das células hepáticas, pré ascite e edema, que revelaram ser os principais problemas para o doente. Isto porque a função hepática estava sobrecarregada devido à rápida destruição das células tumorais, por desintoxicação do fígado. Apesar das células hepáticas saudáveis estarem a regenerar, não era suficiente para compensar a rápida destruição do tumor. A morte do doente foi provocada pela sobrecarga da função hepática. Porém, o doente sobreviveu por um período superior ao esperado (até dois anos após diagnóstico), com melhor qualidade de vida, atribuída ao tratamento com o 3-BP (63). A falta de ensaios clínicos prende-se com o facto de o 3-BP poder apresentar toxicidade sistémica, devido a uma janela terapêutica relativamente estreita (75), pelo que mais estudos devem ser realizados em relação ao modo como deve ser realizada a sua administração.

Os critérios fundamentais para seleccionar um agente anticancerígeno direccionado para o metabolismo energético são ter como alvo a proliferação exacerbada das células tumorais, de forma a reduzir efeitos secundários nas células normais que apresentam uma taxa metabólica inferior e recorrer na sua maioria à fosforilação oxidativa. Contudo, esta análise deve ser cuidada, uma vez que algumas células normais recorrem também à glicólise como principal fonte de energia, embora numa taxa inferior. Em suma, apesar de vários desenvolvimentos na terapia antitumoral tendo como alvo as vias metabólicas, o cancro é um sistema complexo que depende de vários componentes para proliferar, e todos eles devem ser tidos em conta no desenvolvimento de novas terapias (63).

### 1.3. OBJETIVOS

As células tumorais estão sujeitas, na maior parte das vezes, a condições de hipóxia devido à elevada proliferação celular, o que poderia ser letal para estas células, se recorressem apenas à fosforilação oxidativa, processo dependente de oxigénio, para produzir energia para os seus processos metabólicos (11). Assim, as células tumorais recorrem ao “Efeito de *Warburg*”, para desviarem o piruvato do processo oxidativo (8, 13). O piruvato é convertido posteriormente a lactato, sendo exportado para o exterior, através dos MCTs, que são fundamentais para a sobrevivência das células tumorais (13).

Recentemente, foram descritos SNPs nos MCTs que podem levar a algumas alterações na sua atividade (32). Lean e Lee, realizaram um estudo na população chinesa, que revelou sete novas variantes genéticas no gene SLC16A1 pertencente ao transportador MCT1, dos quais, quatro eram novas variantes. O polimorfismo T1470A, presente no gene MCT1, foi encontrado como sendo o SNP mais comum, apresentando uma frequência alélica de base nucleotídica T e A de 34,7% e 65,3% respetivamente (32). Em estudos recentes, foi avaliado o efeito de polimorfismos no gene MCT1, em doentes com cancro do pulmão e cancro colorretal após cirurgia, sujeitos a tratamentos quimioterápicos. Em ambos os estudos, em que se avaliou o efeito nomeadamente do polimorfismo T1470A, verificou-se que os indivíduos homozigotas para a mutação não apresentam os resultados clínicos esperados, em relação à quimioterapia (43, 50). Em relação a mutações genéticas no gene MCT4, um estudo de Lean e Lee, revelou a existência de 46 variações genéticas, com 5 variantes *nonsynonymous*. O polimorfismo C44T, presente no gene MCT4, apresenta uma frequência alélica da base nucleotídica T (específica para a mutação) de 0,011 na população chinesa e de 0,042 na população indiana, tendo sido previsto um efeito deletério deste polimorfismo (37). Existem várias terapias antitumorais, tendo como alvo a via glicolítica ou as vias de sinalização que regulam o metabolismo celular. O 3-BP é um inibidor metabólico que inibe a produção de ATP celular através da glicólise e da fosforilação oxidativa mitocondrial (63, 70).

Neste trabalho procedeu-se à genotipagem do polimorfismo T1470A (presente no gene MCT1) e do polimorfismo C44T (presente no gene MCT4) num painel alargado de linhas celulares tumorais. Escolheram-se para a genotipagem células de diferentes tipos de cancro, nomeadamente adenocarcinoma de mama, carcinoma hepatocelular,

adenocarcinoma cervical, glioblastoma, adenocarcinoma colorretal e carcinoma da cavidade oral. Uma vez que as células tumorais apresentam elevadas taxas glicolíticas, e os MCTs desempenham um papel fundamental no seu metabolismo, pretendeu-se avaliar o efeito citotóxico do 3-BP e correlacionar esse efeito com a expressão e atividade dos MCTs.

Neste sentido, o presente trabalho teve como principais objetivos:

- i. Avaliação do efeito citotóxico do 3-BP num painel de diferentes linhas celulares tumorais;
- ii. Avaliação da expressão proteica do MCT1 e MCT4 em linhas celulares tumorais e posterior correlação desses resultados com o efeito citotóxico do 3-BP;
- iii. Genotipagem do polimorfismo T1470A (presente no gene MCT1) e do polimorfismo C44T (presente no gene MCT4) e posterior correlação desses resultados com a expressão do respetivo MCT e com o efeito citotóxico do 3-BP.

## **CAPÍTULO II**

---

## **MATERIAIS E MÉTODOS**



## 2.1. LINHAS CELULARES TUMORAIS E CONDIÇÕES DE CULTURA

Neste trabalho foi usado um painel alargado de linhas celulares tumorais humanas, descritas na tabela 3. Foram selecionadas as linhas MCF-7, MDA-MB-231, ZR-75-1 e SK-BR-3 de adenocarcinoma de mama; Hep G2 e Hepa 1-6 de carcinoma hepatocelular; HeLa de adenocarcinoma cervical; U251MG, U373MG e U87MG de glioblastoma; HT-29, HCT-15 e Caco-2 de adenocarcinoma colorretal e SCC09 e SCC25 de carcinoma da cavidade oral. Todas as linhas tumorais foram obtidas através da *American Type Culture Collection* (ATCC, EUA).

**Tabela 3:** Painel de linhas tumorais utilizadas no presente trabalho, respetivo meio base de cultura e tipo de cancro do qual foram isoladas.

<b>Tipo de cancro</b>	<b>Linha tumoral</b>	<b>Meio de cultura</b>
Adenocarcinoma de mama	<b>MCF-7</b>	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (RPMI)
	<b>MDA-MB-231</b>	
	<b>ZR-75-1</b>	
	<b>SK-BR-3</b>	
Carcinoma hepatocelular	<b>Hep G2</b> <b>Hepa 1-6</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM)
Adenocarcinoma cervical	<b>HeLa</b>	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (RPMI)
Glioblastoma	<b>U251MG</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM)
	<b>U373MG</b>	
	<b>U87MG</b>	
Adenocarcinoma colorretal	<b>HT-29</b> <b>HCT-15</b> <b>Caco-2</b>	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i> (DMEM)
Carcinoma da cavidade oral	<b>SCC09</b> <b>SCC25</b>	Meio DMEM F12 suplementado com uma solução de hidrocortisona (DMEM F12)

Para o crescimento e manutenção das culturas celulares *in vitro*, estas foram cultivadas em frascos de 25 cm<sup>2</sup> (Invitrocell), designados daqui em diante por T25, e incubadas numa incubadora húmida a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> (Water Jacketed CO<sub>2</sub> Incubators, Shel Lab). Todas as experiências envolvendo cultura celular foram realizadas em condições assépticas numa câmara de fluxo laminar de segurança biológica de classe 2 (Scanlaf, MARS). Todo o material usado foi pulverizado com etanol a 70% (v/v) e a

câmara de fluxo foi exposta a radiação ultravioleta por um período de 15 minutos antes e após a manipulação do material biológico.

As linhas celulares MCF-7, MDA-MB-231, ZR-75-1, SK-BR-3 e HeLa foram cultivadas em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) (Lonza); as células de carcinoma da cavidade oral foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) F12 com L-glutamina e hidrocortisona para uma concentração final de 40 ng/mL (DMEM F12) (Sigma-Aldrich), todas as outras linhas celulares foram cultivadas em meio DMEM (Lonza) (Tabela 3). Todos os meios foram suplementados com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF, Gibco™, Invitrogen Corporation) e 1% de solução de antibiótico (*penicillin-streptomycin*, Sigma- Aldrich). Estes meios serão designados, daqui em diante, por meio de cultura.

## 2.2. SUBCULTURA DE LINHAS CELULARES TUMORAIS

As linhas celulares tumorais foram crescidas no respetivo meio de cultura a 37°C e numa atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. Quando a cultura celular atingia cerca 80% de confluência (três ou quatro dias após o plaqueamento, dependendo da linha celular), era realizada uma passagem das células para um novo frasco para manter a cultura em fase exponencial de crescimento, e para evitar o *stress* celular provocado pela competição de espaço e nutrientes. Para realizar a subcultura celular o meio foi removido, e as células foram gentilmente lavadas com 2 mL de tampão fosfato salino (PBS)<sup>1</sup>. De seguida, foram adicionados 300 µl de tripsina (TrypLE™ Express) (Gibco™, Invitrogen Corporation) e as células foram incubadas a 37°C durante 2 a 5 minutos, até se observar o seu destacamento do frasco. Para inativar a ação da tripsina, foi adicionado 1 mL de meio de cultura e as células destacadas foram ressuspensas no meio. Todos os reagentes foram pré-aquecidos a 37°C num banho termostaticado (Precistern, Selecta), de forma a evitar um choque térmico nas células.

Para determinar a densidade celular da cultura, um volume de suspensão celular (20 µL) foi adicionado a um volume igual de azul de tripano (Sigma-Aldrich) e as células foram contadas numa câmara de *Neubauer*. A determinação do número de células viáveis/mL da suspensão celular foi efetuada através da contagem das células incolores, sendo que

---

<sup>1</sup> **PBS:** 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 6,4 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,2.

as células coradas de azul correspondiam a células mortas. O volume apropriado da suspensão celular foi inoculado num T25 num volume final de 5 mL de meio de cultura, por forma a assegurar um crescimento adequado para a realização das experiências futuras.

### 2.3. CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO DE LINHAS CELULARES TUMORAIS

Para manter as culturas celulares por longos períodos de tempo, preservar as características fenotípicas das células e inibir a perda de viabilidade, todas as linhas celulares tumorais usadas neste trabalho foram regularmente criopreservadas.

Para o congelamento das células utilizaram-se culturas celulares na fase exponencial do seu crescimento. As células foram tripsinizadas como descrito no ponto 2.2. e centrifugadas a 1000 rpm durante 5 minutos (Eppendorf centrifuge 5424). Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet*, que continha as células, foi gentilmente ressuspensado em 1 mL de meio de cultura suplementado com 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich). A suspensão celular foi transferida para criotubos (Cryovial®, Simport), que foram colocados num contentor com isopropanol, guardado a -80°C durante 24 horas, para um congelamento gradual das células, proporcionando uma maior viabilidade celular. Depois desse tempo, os criotubos foram transferidos para um contentor contendo azoto líquido.

Para o descongelamento de linhas celulares tumorais, os criotubos contendo as células congeladas, foram colocados num banho termostaticado a 37°C. As células foram gentilmente ressuspensas num pequeno volume de meio e transferidas para um frasco T25 com um volume de meio superior ao normal (8 mL). A utilização deste volume superior teve como objetivo aumentar a diluição do DMSO presente no meio de congelamento, reduzindo o seu grau de toxicidade. O T25 foi em seguida colocado na estufa durante a noite, para que as células aderissem ao frasco, e no dia seguinte o meio de cultura foi substituído por meio de cultura novo, para que todo o DMSO fosse eliminado.

## 2.4. EXTRAÇÃO DE DNA GENÓMICO DE LINHAS CELULARES TUMORAIS

O DNA genómico (DNAg) das diferentes linhas celulares tumorais descritas na tabela 3, foi extraído usando os kits comerciais *QIAamp DNA Mini Kit* (QIAGEN) e *NZY Tissue gDNA Isolation kit* (Nzytech), de acordo com as instruções fornecidas pelos fabricantes. Os kits comerciais são preparados para uma extração simples e rápida, com elevado grau de pureza. Os kits de extração baseiam-se em sucessivas centrifugações em colunas de sílica e utilizam tampões de lise contendo proteinase K e dodecil sulfato de sódio (SDS) para a lise celular. O DNAg é seletivamente absorvido pela coluna e os restantes organelos celulares, tais como proteínas e sais, são removidos em lavagens sucessivas. O DNAg das linhas celulares tumorais foi eluído em 30 µL de água ultra pura e armazenado a -20°C.

## 2.5. ANÁLISE DA INTEGRIDADE, PUREZA E QUANTIFICAÇÃO DO DNA GENÓMICO

De modo a avaliar a integridade, pureza e concentração das amostras de DNAg, foram realizadas análises espectralfotométricas e eletroforéticas. A densidade ótica (D.O.) a 260nm, 280nm e 230nm foi medida num NanoDrop (Thermo Scientific - NanoDrop2000) para determinar a concentração e o grau de pureza do DNAg. A contaminação por proteínas e RNA foi avaliada através da análise da razão  $D.O._{260nm}/D.O._{280nm}$ . A contaminação por compostos fenólicos foi avaliada através da análise da razão  $D.O._{260nm}/DO_{230nm}$ . A análise da integridade foi avaliada por análise eletroforética em gel de agarose 1% (Nzytech) em TAE 1×<sup>2</sup>, utilizando 5 µL de amostra de DNAg juntamente com 1 µL de tampão de aplicação 6×<sup>3</sup> por poço e 5 µL do marcador de pesos moleculares λHindIII (Thermo Scientific). A eletroforese correu durante cerca de 40 minutos, com uma voltagem de 80V. Depois da corrida, procedeu-se à aquisição da imagem utilizando o sistema BIO DOC-IT™ *Imaging System* (UVP).

---

<sup>2</sup> TAE 1×: Tris 40 mM, acetato de sódio 5 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0.

<sup>3</sup> Tampão de aplicação 6×: Glicerol 30% (v/v); azul de bromofenol 0,25% (p/v).

## 2.6. ANÁLISE DO POLIMORFISMO T1470A DO GENE MCT1 E DO POLIMORFISMO C44T DO GENE MCT4

### 2.6.1. AMPLIFICAÇÃO DO DNA

A amplificação dos fragmentos de DNA, correspondentes aos locais contendo os polimorfismos a analisar, foi realizada recorrendo à técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Para a amplificação dos genes foi usada uma mistura reacional com um volume final de 50  $\mu\text{L}$ , contendo 150 ng de DNAg, 5  $\mu\text{L}$  de tampão de enzima 10 $\times$  (Thermo Scientific), 4  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (25mM, Thermo Scientific), 1  $\mu\text{L}$  de dNTPs (10mM, Nzytech), 0,75  $\mu\text{L}$  de Taq DNA polimerase e 0,25  $\mu\text{L}$  de *Pfu* DNA polimerase (produzidas no laboratório), 0,15  $\mu\text{L}$  de cada *primer* (100  $\mu\text{M}$ ) e água ultrapura para perfazer o volume. O controlo negativo foi realizado usando a mesma mistura reacional mas sem DNAg, sendo este substituído por igual volume de água. Para cada polimorfismo em análise foram usados *primers* específicos obtidos através da StabVida, (Oeiras, Portugal), cujas sequências estão indicadas nas tabelas 4 e 6.

**Tabela 4:** Sequência dos primers utilizados na amplificação de fragmentos de DNA genómico contendo o local de polimorfismo em estudo, para o método PCR-RFLP. **Abreviaturas:** Fwd: *primer forward*; Rev: *primer reverse*; pb: pares de bases.

Gene	Polimorfismo	Sequência	Tamanho do produto amplificado
MCT1	<b>T1470A</b>	Fwd: 5' AGGAAGAGACCAGTATAGATG 3' Rev: 5' CATGGATTCAGACTGGACTT 3'	123 bp
MCT4	<b>C44T</b>	Fwd: 5' TCTGAAGGGGGACAGGTGAG 3' Rev: 5' CAGTGATGACGAAACAGCCGA 3'	138 bp

Após a receção dos *primers*, estes foram reconstituídos em água ultra pura, numa concentração final de 100  $\mu\text{M}$ . Programou-se o termociclador (Bio-Rad C1000<sup>TM</sup> *Thermal Cycler*), especificamente para cada reação de PCR, como indicado nas tabelas 5 e 7.

**Tabela 5:** Condições de PCR utilizados na amplificação de fragmentos de DNA genômico contendo o local de polimorfismo em estudo, para o método PCR-RFLP.

Condições de amplificação	Polimorfismo		Número de ciclos
	T1470A	C44T	
Desnaturação inicial	95°C, 5 min	95°C, 5 min	1
Desnaturação	95°C, 30 seg	95°C, 30 seg	39
Emparelhamento dos <i>primers</i>	55°C, 30 seg	59,5°C, 30 seg	
Extensão	72°C, 1 min	72°C, 1 min	1
Extensão final	72°C, 7 min	72°C, 7 min	

Depois da reação, os produtos amplificados de ambos os genes foram analisados. A análise foi realizada através de análise eletroforética em gel de agarose 2% (Nzytech) em tampão SGTB 1× (Grisp). Foram aplicados 5 µL do produto amplificado por PCR e ainda o marcador de pesos moleculares Ladder IV (Thermo Scientific). A eletroforese correu 40 minutos, com uma voltagem de 110V. Depois da corrida, procedeu-se à aquisição da imagem utilizando o sistema BIO DOC-IT™ *Imaging System* (UVP). Após se ter verificado que os fragmentos de PCR obtidos estavam em boas condições, procedeu-se à análise dos polimorfismos T1470A e C44T, pelos métodos de PCR-RFLP (descrito no ponto 2.6.2) e *High Resolution Melting* (HRM) (descrito no ponto 2.6.3.).

## 2.6.2. ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS T1470A E C44T POR RFLP

A técnica de PCR-RFLP permite identificar a presença ou ausência do polimorfismo, após a amplificação por PCR seguido de digestão enzimática. Os polimorfismos podem inserir ou remover locais de reconhecimento de uma enzima de restrição. A perda do local de restrição irá resultar no aparecimento de um fragmento maior. A formação de um novo local de restrição irá resultar na perda do fragmento maior que é substituído por dois fragmentos menores.

Para a análise dos polimorfismos T1470A e C44T foram realizadas reações de PCR com os *primers* indicados na tabela 4 e de acordo com as condições descritas na tabela 5. Foi usado um volume de produto amplificado por PCR correspondente a 1 µg para cada amostra, para digestão com as enzimas de restrição *BccI* (*New England BioLabs*) e *PpuMI* (*Fermentas*), respetivamente. A enzima de restrição *BccI* digere o produto amplificado por PCR se corresponder a um homocigota normal. Já a enzima de restrição

*PpuMI* digere o produto amplificado por PCR se corresponder a um homozigota mutante. Para cada restrição utilizou-se o tampão 10x respectivo, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante e incubou-se a mistura de restrição a 37°C durante 3 horas. Depois da incubação, os produtos de restrição foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% (Nzytech) em tampão SGTB 1× (Grisp). Foram aplicados 5 µL do produto amplificado por PCR e ainda o marcador de pesos moleculares Ladder IV (Thermo Scientific). A eletroforese correu 40 minutos, com uma voltagem de 110V. Depois da corrida, procedeu-se à aquisição da imagem utilizando o sistema BIO DOC-IT™ *Imaging System* (UVP).

### 2.6.3. ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS T1470A E C44T POR HRM

A técnica de *High Resolution Melting* (HRM) é uma técnica que permite em similaridade com o PCR-RFLP, detetar a presença ou ausência de polimorfismos, identificando o respetivo genótipo. Assim, foi usada como alternativa à técnica PCR-RFLP por ser uma ferramenta mais sensível, mais precisa e uma análise menos morosa, visto não se realizar o passo de digestão enzimática (RFLP). O HRM baseia-se na análise do genótipo, através da análise do perfil de *melting* do produto de PCR contendo a zona do polimorfismo de cada amostra de DNAg. Cada genótipo dá origem a uma curva de *melting*, que através da sua elevada especificidade e sensibilidade, permite a distinção entre genótipos. A técnica de HRM possibilita a deteção de *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs), alterações numa única base nucleotídica, permitindo a genotipagem das linhas celulares tumorais. Como a técnica de HRM é bastante sensível, exige que as amostras de DNAg se encontrem em boas condições de pureza e os produtos amplificados estejam entre os 50bp e os 100bp de peso molecular, para que haja uma saturação com o fluorocromo Eva Green.

Para a reação do HRM com um volume final de 20 µL adicionou-se 10 ng de DNAg, 0,5 µl de cada um dos respetivos *primers* (10 µM), 10 µL da *mix* (*Precision Melt Supermix* 2×, Bio-Rad) e água ultrapura para perfazer o volume final. Para cada polimorfismo em análise foram usados *primers* específicos obtidos através da StabVida, (Oeiras, Portugal), encontrando-se a sequência indicada na tabela 6.

**Tabela 6:** Sequência dos *primers* utilizados na amplificação de fragmentos de DNA genómico contendo o local de polimorfismo em estudo, por HRM. Abreviaturas: Fwd: *primer forward*; Rev: *primer reverse*; pb: pares de bases.

Gene	Polimorfismo	Sequência	Tamanho do produto amplificado
MCT1	T1470A	Fwd: 5' AGGAAGAGACCAGTATAGATG 3' Rev: 5' CATGGATTTCAGACTGGACTT 3'	123 bp
MCT4	C44T	Fwd: 5' TCTGAAGGGGACAGGTGAG 3' Rev: 5' CAGTGATGACGAAACAGCCGA 3'	138 bp

As reações ocorreram num termociclador (Bio-Rad C1000TM Thermal Cycler) e encontram-se descritas na tabela 7. No final da reação, os dados foram obtidos e, posteriormente analisados, utilizando o software "Precision Melt Analysis™ Software" version 1.1 (Bio-Rad).

**Tabela 7:** Condições de HRM utilizadas na amplificação de fragmentos de DNA genómico contendo o local de polimorfismo em estudo.

Condições de amplificação	Polimorfismos		Número de ciclos
	T1470A	C44T	
Desnaturação inicial	95°C, 2 min		1
Desnaturação	95°C, 10 seg		44
<i>Annealing</i> + ( <i>read plate</i> )	55 °C, 30 seg	59,5 °C, 30 seg	
Formação de heteroduplexes	95°C, 30 seg		1
	60°C, 1 min		
HRM + ( <i>read plate</i> )	<i>Melting Curve</i> de 65°C a 95.0°C: incrementos de 0,2°C por cada 10 seg		

## 2.7. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR ATRAVÉS DO ENSAIO SRB

O efeito citotóxico do 3-bromopiruvato (3-BP) foi avaliado através do ensaio da Sulforrodamina B (SRB). Este ensaio é um método colorimétrico que permite determinar o efeito do 3-BP na viabilidade celular através da quantificação das proteínas celulares. A SRB é um corante que tem a capacidade de se ligar eletrostaticamente aos resíduos de aminoácidos básicos das proteínas, em células previamente fixadas com

ácido tricloroacético (TCA). O complexo proteína-SRB formado pode ser solubilizado por bases fracas, tais como o tampão Tris e quantificado através da D.O., indicando o grau de citotoxicidade causado pelo 3-BP.

Depois da incubação da densidade celular apropriada com o 3-BP (concentrações até 500  $\mu\text{M}$ ) numa placa de 96 poços (100  $\mu\text{L}$ /poço) durante 16 horas, as células foram fixadas com TCA frio 50% (Merck) (25  $\mu\text{L}$ /poço) durante 1 hora a 4°C. A placa foi lavada com água destilada pelo menos 5 vezes, para remover todo o excesso de TCA e foi deixada a secar à temperatura ambiente durante toda a noite. Procedeu-se então à adição de SRB 0,4% (Sigma-Aldrich) (50  $\mu\text{L}$ /poço) e a placa foi incubada durante 30-60 minutos a 37°C. A placa foi lavada com ácido acético 1% pelo menos 5 vezes para remover o SRB que não se ligou às proteínas. A placa foi deixada a secar durante a noite à temperatura ambiente. O complexo proteína-SRB foi solubilizado com uma solução de Tris 10mM (100  $\mu\text{L}$ /poço) e leu-se a D.O. a 540 nm, num leitor de placas (Biotek Synergy 2).

### 2.7.1. DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE CELULAR

A densidade celular apropriada foi determinada para assegurar que as células se encontravam na fase exponencial de crescimento durante toda a realização do ensaio. As células foram plaqueadas numa placa de 96 poços com diferentes densidades de suspensão celular (0 a  $3 \times 10^5$  células viáveis/mL) e foram incubadas *overnight* para aderirem à placa. No dia seguinte, o meio foi removido e substituído por um novo meio de cultura. As células foram sujeitas a nova incubação por um tempo de exposição correspondente ao período em que decorreram os ensaios, nomeadamente 16 horas para o composto 3-BP. A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio de SRB.

### 2.7.2. DETERMINAÇÃO DO $\text{IC}_{50}$ PARA O 3-BROMOPIRUVATO NAS LINHAS CELULARES TUMORAIS

A determinação do efeito citotóxico do 3-BP foi realizada no painel de linhas celulares tumorais descritas na tabela 3. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços (100  $\mu\text{L}$ /poço) com a densidade apropriada para cada linha. Para todas as linhas tumorais foram plaqueadas  $1,5 \times 10^4$  células/poço, à exceção de HepG2, onde se plaqueou  $2 \times 10^4$  células/poço. Após incubação durante a noite para adesão das células, o meio foi

removido e substituído por meio de cultura novo, contendo diferentes concentrações de 3-BP. As células foram expostas ao composto por um período de 16 horas, e ao fim desse tempo, determinou-se a viabilidade celular pelo método SRB, anteriormente descrito. O 3-BP foi sempre preparado com PBS frio, e no momento do ensaio. A suspensão celular foi plaqueada em triplicado e os respectivos brancos em duplicado, contendo apenas meio de cultura com as mesmas concentrações de composto utilizadas nos ensaios com as células. Na situação controlo (sem adição de composto), o 3-BP foi substituído por PBS.

A viabilidade celular foi determinada através da comparação entre a D.O. (em triplicado) das células tratadas com o 3-BP e das células não tratadas (correspondendo a 100% de viabilidade celular), após subtração do controlo negativo correspondente (em duplicado), de acordo com a fórmula:

$$\frac{\text{Média do triplicado} - \text{Média dos brancos}}{\text{Média do triplicado controlo} - \text{Média dos brancos controlo}} \times 100$$

Pelo menos três experiências independentes em triplicado foram realizadas para cada ensaio. O efeito do 3-BP na viabilidade celular, proveniente do valor do IC<sub>50</sub> (concentração de 3-BP requerido para reduzir a viabilidade celular em 50%), foi calculado usando o *software* GraphPad Prism 4, aplicando uma regressão não linear do tipo dose-resposta sigmoideal (inclinação variável), após transformação logarítmica.

## 2.8. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS MCT1 E MCT4

### 2.8.1. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

As linhas celulares tumorais foram plaqueadas, em triplicado, em placa de 6 poços e quando atingiram a confluência, o meio de cultura foi removido. Em seguida, as células foram colocadas em gelo e procedeu-se à lavagem com PBS frio. As células foram

ressuspensas em 200  $\mu$ L de tampão de lise<sup>4</sup> e recolhidas por *scraping* e transferidas para um tubo *ependorf*. O lisado celular foi incubado em gelo durante 15 minutos, sendo vortexado ocasionalmente. A suspensão celular foi centrifugada a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante, correspondente ao extrato proteico, foi guardado a -80°C até à sua utilização. O ensaio da quantificação de proteínas foi realizado usando o kit *BCA™ Protein Assay Kit* (Thermo Scientific) de acordo com as instruções de fabricante. A curva de calibração (D.O.<sub>562nm</sub> versus concentração da proteína total) foi realizada para cada ensaio com os padrões de albumina do soro bovino (BSA). A concentração da proteína em cada amostra foi determinada por interpolação da curva de calibração, tendo em conta o fator de diluição da amostra (10 $\times$ ).

### 2.8.2. SEPARAÇÃO DE PROTEÍNAS POR SDS-PAGE

As proteínas extraídas foram separadas e analisadas por SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) num sistema vertical de eletroforese (Bio-rad). Para o ensaio de SDS-PAGE foram adicionados 4 $\mu$ L de tampão de aplicação 4 $\times$ <sup>5</sup> a 20  $\mu$ g de extrato de proteína total de cada amostra, previamente desnaturadas pelo calor. Efetuou-se a eletroforese em gel de poliacrilamida (gel resolvente<sup>6</sup> a 10% v/v e gel de empacotamento<sup>7</sup> a 6% de poliacrilamida). O marcador de proteínas (*Precision Plus Protein™*, Bio-rad) foi usado para confirmar o peso molecular das proteínas em análise. A eletroforese correu a uma voltagem de 200V durante aproximadamente 60 minutos.

### 2.8.3. WESTERN-BLOT

Depois do ensaio de SDS-PAGE, os papéis de *blotting* (Protan, Whatman), as membranas de nitrocelulose (Protan, Whatman) e o gel resolvente foram embebidos em tampão de transferência<sup>8</sup>. O esquema para a transferência do gel foi montado e correu a 110 mA durante 75 minutos, usando o sistema de transferência TE70 ECL Semi-dry,

---

<sup>4</sup> **Tampão de lise:** 150 mM NaCl; 0,1 mM EDTA; 1% Triton X-100; 1% NP40; 50 mM Tris-HCL pH 7,5 e 1/7 de *cocktail* de inibidor de proteases (Sigma).

<sup>5</sup> **Tampão de aplicação 4 $\times$ :** 0,25 M Tris/HCL pH 8,3; 8% SDS; 40% Glicerol; 20% 2-mercaptoetanol.

<sup>6</sup> **Gel resolvente 10%:** 2,5 mL Tris/HCL 1,5 M pH 8,8; 4,1 mL H<sub>2</sub>O destilada; 3,3 mL *Acrylamide/bis-acrylamide* 30%; 100  $\mu$ L PSA 10%; 100  $\mu$ L SDS; 10%; 10  $\mu$ L *Temed*.

<sup>7</sup> **Gel de empacotamento 6%:** 1,25 mL Tris/ HCL 0.5 M pH 6,8; 1,9 mL H<sub>2</sub>O destilada; 1 mL *Acrylamide/bis-acrylamide* 30%; 50  $\mu$ L PSA 10%; 100  $\mu$ L SDS 10%; 5  $\mu$ L *Temed*.

<sup>8</sup> **Tampão de transferência:** Glicerina 192 mM, Tris base 25 mM, metanol 20% (v/v) pH 8,3.

Transfer Unit (Amersham Biosciences). A eficiência do processo de transferência foi assegurada através da coloração da membrana com Ponceau S (Ponceau S 0,5% (p/v); TCA 5% (p/v)). Após a transferência, as membranas foram lavadas com uma solução de *Tris-Buffered Saline Tween-20 (TBST)*<sup>9</sup> por forma a remover todo o excesso de acrilamida.

As membranas foram bloqueadas em solução de bloqueio (leite em pó magro 5% (p/v) em TBST) para bloquear os locais não específicos, durante 60 minutos à temperatura ambiente ou então durante a noite a 4°C, com agitação suave. Depois desse tempo, as membranas foram lavadas 3 x 5 minutos com uma solução de leite em pó magro 1% (p/v) em TBST, e incubadas com o anticorpo primário específico (*mouse anti-MCT1* 1:200 (Santa Cruz Biotechnology); *rabbit anti-MCT4* 1:1500 (Santa Cruz Biotechnology) e *rabbit α-Tubulina*, 1:500 (Abcam)) durante 60 minutos à temperatura ambiente ou durante a noite a 4°C, ambos com agitação suave. As membranas foram lavadas 3 x 5 minutos (em leite em pó magro 1% (p/v) em TBST), e foram incubadas com o anticorpo secundário acoplado à *horseradish peroxidase (HRP)* (*anti-rabbit IgG*, 1:1000 (Sigma); *anti-mouse IgG*, 1:1500 (Vector)), específico contra as imunoglobulinas do anticorpo primário, à temperatura ambiente durante 1h ou durante a noite a 4°C, com agitação suave. Após a incubação, as membranas foram lavadas 2 x 5 minutos com TBST e 1 x 5 minutos com TBS.

Por último, as bandas imunoreativas foram visualizadas por quimioluminescência (*Enhanced Chemiluminescence (ECL)*). Partes iguais das soluções de ECL A (10 mL de Tris 100 mM; 0,198 mM de ácido coumárico (Sigma) e 1,25 mM luminol (Fluka)) e ECL B (10 mL de Tris 100 mM pH 8,5 e peróxido de hidrogénio 0,009% (v/v)) foram misturadas e cada membrana foi imersa nesta mistura durante 1 minuto. As membranas foram colocadas numa cassete de revelação (Hypercassette™, Amersham Biosciences) e expostas a filmes autorradiográficos (Kodak BioMax Light Film), numa câmara escura, durante diferentes tempos. Os filmes foram revelados manualmente, por imersão na solução de revelação (Carestream® Kodak® autoradiography GBX developer/replenisher, Sigma-Aldrich) seguida de água, solução de fixação (Carestream® Kodak® autoradiography GBX fixer/replenisher, Sigma-Aldrich) e novamente por água. Os filmes desenvolvidos foram secos à temperatura ambiente. O

---

<sup>9</sup> **Tris-Buffered Saline Tween-20 (TBST)**: NaCl 137 mM I; Tris base 20 mM; Tween-20®)0,1% (v/v).

teor de proteína foi estimado medindo a densidade de cada banda, normalizando com a  $\alpha$ -tubulina, com o *software* Image J.

Foram realizadas para cada ensaio de *Western-blot* pelo menos duas experiências independentes.

## 2.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística e a construção de gráficos foram realizadas recorrendo ao *software* GraphPad Prism 4. Os resultados obtidos ao longo do trabalho são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão normalizado, para  $n$  experiências independentes. O significado estatístico dos resultados foi avaliado recorrendo-se à probabilidade associada ao *t-Student*, considerando-se valores de  $p < 0,05$  como estatisticamente significativos para um grau de confiança de 95%.



## **CAPÍTULO III**

---

## **RESULTADOS**



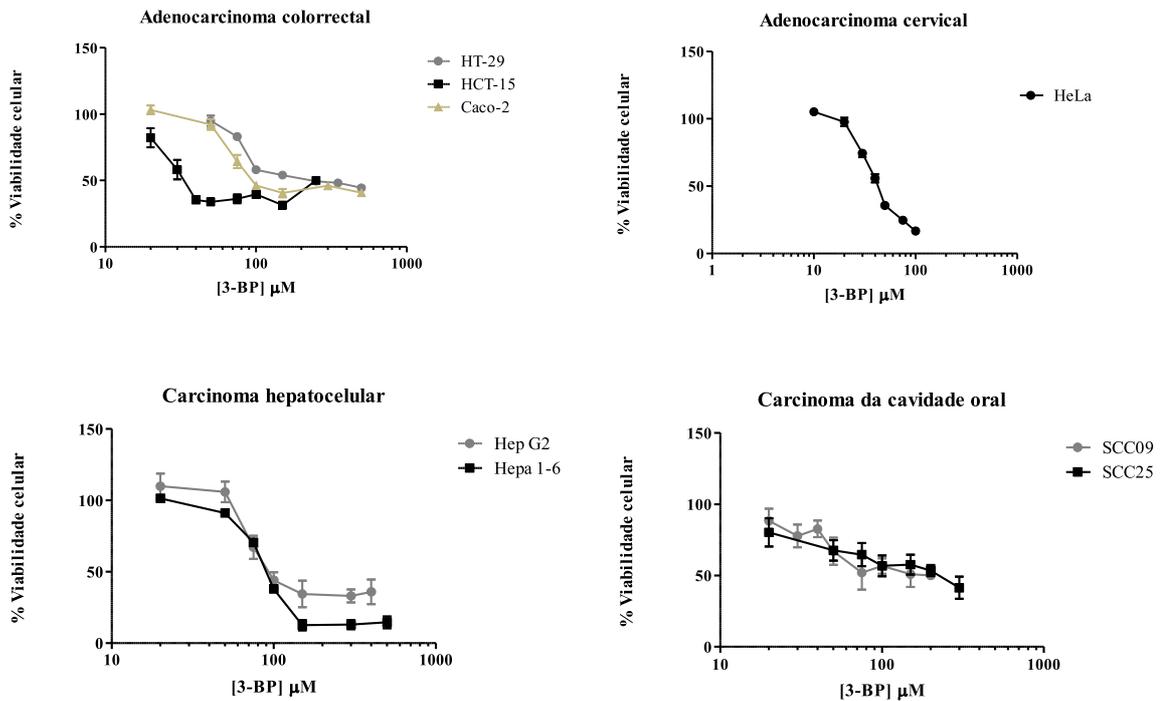
### 3.1 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO 3-BROMOPIRUVATO NUM PAINEL DE LINHAS CELULARES TUMORAIS

As células tumorais recorrem essencialmente à glicólise aeróbia, processo também denominado “Efeito de *Warburg*”, para obtenção de energia, desviando dessa forma o piruvato do processo oxidativo (8, 13). O piruvato é convertido assim a lactato, o qual é exportado para o exterior através dos transportadores de ácidos monocarboxílicos (MCTs), que são fundamentais para a sobrevivência e proliferação das células tumorais (13). O 3-bromopiruvato (3-BP) é um inibidor metabólico, também considerado como um promissor agente antitumoral, que inibe a produção de ATP celular, principalmente ao nível da glicólise mas atuando também ao nível da fosforilação oxidativa, afetando assim toda a maquinaria de produção de ATP celular (63, 70). Estudos anteriores revelaram o papel dos MCTs no mecanismo de ação deste composto, nomeadamente mediando a sua entrada para o interior da célula (57). Foi assim objetivo deste trabalho avaliar o efeito citotóxico do 3-BP num painel alargado de linhas celulares tumorais e tentar correlacionar esse efeito com a expressão e atividade dos MCTs.

Previamente à avaliação do efeito citotóxico do 3-BP nas células tumorais, foi determinada a densidade celular para cada linha a utilizar nos ensaios posteriores, de forma a assegurar que as células estavam em fase exponencial de crescimento durante todo o ensaio, de acordo com o procedimento descrito em 2.7.1 As linhas tumorais analisadas neste estudo foram HT-29, HCT-15 e Caco-2 de adenocarcinoma colorretal; HeLa de adenocarcinoma cervical; Hep G2 e Hepa 1-6 de carcinoma hepatocelular e SCC09 e SCC25 de carcinoma da cavidade oral. Na inoculação das restantes linhas celulares utilizadas neste trabalho, foram utilizados os valores determinados previamente pelo grupo de trabalho.

Os valores escolhidos para a densidade celular das linhas tumorais foram de  $1,5 \times 10^4$  células/poço, à exceção da linha celular Hep G2 onde a densidade inoculada foi de  $2,0 \times 10^4$  células/poço. Após escolhida a densidade celular para cada linha, as células tumorais foram inoculadas para se proceder ao ensaio de citotoxicidade do 3-BP. Cada linha tumoral foi exposta a diferentes concentrações de 3-BP (0 a 500  $\mu\text{M}$ ) durante um período de 16 horas. A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio Sulforrodamina

B (SRB), tal como descrito em 2.7. O 3-BP provocou morte celular em todas as linhas tumorais testadas, mas a concentração necessária para esse efeito diferiu nas diferentes linhas celulares, evidenciando que estas apresentaram diferente sensibilidade ao composto (Figura 10 e Tabela 8).



**Figura 10:** Efeito do 3-BP na viabilidade celular das linhas tumorais de cancro de adenocarcinoma colorrectal (HT-29, HCT-15 e Caco-2); adenocarcinoma cervical (HeLa); carcinoma hepatocelular (Hep G2 e Hepa 1-6) e carcinoma da cavidade oral (SCC09 e SCC25), após 16 horas de incubação, avaliado pelo ensaio SRB. Os resultados representam os valores médios  $\pm$  D.P. de triplicados de pelo menos três experiências independentes.

Na tabela 8 encontram-se os valores de  $IC_{50}$  das linhas anteriormente referidas, e adicionalmente os valores das linhas tumorais que foram também genotipadas no presente trabalho (resultados apresentados posteriormente no ponto 3.3 e 3.4.), e cujos valores de  $IC_{50}$  do 3-BP tinham sido anteriormente determinados pelo grupo de trabalho do laboratório.

**Tabela 8:** IC<sub>50</sub> do 3-BP determinado para o painel de linhas tumorais, após 16 horas de incubação na presença do composto, avaliado pelo ensaio de SRB.

<b>Tipo de cancro</b>	<b>Linha tumoral</b>	<b>IC<sub>50</sub> determinado (µM)</b>
Adenocarcinoma de mama	<b>MCF-7</b>	84,6 ± 15,4
	<b>MDA-MB-231</b>	148,6 ± 28,1
	<b>ZR-75-1</b>	55,7 ± 1,50
	<b>SK-BR-3</b>	458,1 ± 28,6
Carcinoma hepatocelular	<b>Hep G2</b>	82,99 ± 8,09
	<b>Hepa 1-6</b>	89,33 ± 3,86
Adenocarcinoma cervical	<b>HeLa</b>	41,88 ± 3,44
Glioblastoma	<b>U251MG</b>	95,72 ± 7,43
	<b>U373MG</b>	64,71 ± 7,01
	<b>U87MG</b>	65,92 ± 6,95
Adenocarcinoma colorretal	<b>HT-29</b>	126,47 ± 15,11
	<b>HCT-15</b>	30,69 ± 6,29
	<b>Caco-2</b>	93,33 ± 5,21
Carcinoma da cavidade oral	<b>SCC09</b>	> 150
	<b>SCC25</b>	> 300

No adenocarcinoma de mama, as linhas tumorais SK-BR-3 e MDA-MB-231 apresentaram os valores de IC<sub>50</sub> mais elevados (458,1 ± 28,6 µM e 148,6 ± 28,1 µM respetivamente), apresentando assim maior resistência ao 3-BP. Pelo contrário, a linha ZR-75-1 apresentou um IC<sub>50</sub> reduzido, considerando-se a linha de adenocarcinoma de mama mais sensível ao composto. A linha tumoral MCF-7 apresentou um IC<sub>50</sub> intermédio entre as restantes linhas do mesmo grupo (76). Em relação ao adenocarcinoma hepatocelular, representado pelas linhas tumorais Hep G2 e Hepa 1-6, observou-se que o seu comportamento é bastante semelhante entre si, apresentando valores de IC<sub>50</sub> bastante aproximados, na ordem dos 80 µM. A linha tumoral HeLa, de adenocarcinoma cervical, apresentou um valor bastante reduzido de IC<sub>50</sub> (41,88 ± 3,44 µM), evidenciando ser uma linha bastante sensível ao 3-BP. Em relação ao tipo de cancro glioblastoma, a linha tumoral U251MG apresentou o valor de IC<sub>50</sub> mais elevado (95,72 ± 7,43 µM), por sua vez as linhas U373MG e U87MG exibiram valores de IC<sub>50</sub> muito próximos entre si, na ordem dos 65 µM. Em relação ao adenocarcinoma colorretal, a linha tumoral HT-29 com um valor de IC<sub>50</sub> bastante elevado (126,47 ±

15,11  $\mu\text{M}$ ) apresentou-se como a linha mais resistente ao 3-BP dentro do mesmo tipo de cancro, ao passo que as HCT-15 ( $30,69 \pm 6,29 \mu\text{M}$ ) indicaram ser a linha mais sensível. Já as Caco-2 apresentaram um valor de  $\text{IC}_{50}$  intermédio. Por último, no carcinoma da cavidade oral, as linhas SCC09 com  $\text{IC}_{50} > 150 \mu\text{M}$  e SCC25 com  $\text{IC}_{50} > 300 \mu\text{M}$ , apresentaram-se entre as linhas tumorais em estudo com maior resistência ao 3-BP, sendo que em ambas foi impossível determinar o valor exato de  $\text{IC}_{50}$ .

A sensibilidade ao 3-BP diferiu entre os diferentes tipos de linha tumoral. As linhas HCT-15 ( $30,69 \pm 6,29 \mu\text{M}$ ) e HeLa ( $41,88 \pm 3,44 \mu\text{M}$ ) apresentaram-se como as mais sensíveis ao efeito citotóxico do 3-BP, por sua vez as linhas tumorais que apresentaram maior resistência ao composto foram as linhas de cancro oral SCC09 ( $> 150 \mu\text{M}$ ) e SCC25 ( $> 300 \mu\text{M}$ ) e as SK-BR-3, de adenocarcinoma de mama ( $458,1 \pm 28,6 \mu\text{M}$ ). Contudo, podemos ainda salientar que as linhas tumorais MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama e HT-29 de adenocarcinoma colorretal apresentaram valores de  $\text{IC}_{50}$  superior às restantes linhas tumorais, (considerando um  $\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$ ), o que demonstra maior resistência ao 3-BP comparativamente às diversas células tumorais em estudo. Em relação ao adenocarcinoma de mama e colorretal podemos afirmar que as linhas tumorais apresentaram valores de  $\text{IC}_{50}$  bastante díspares dentro do mesmo tipo de cancro. Este facto pode indicar que estas linhas apesar de pertencerem ao mesmo tipo de cancro, apresentam comportamento diferente entre si, indicando variabilidade celular. Porém, as linhas de adenocarcinoma hepatocelular apresentaram valores de  $\text{IC}_{50}$  muito próximos, podendo-se colocar a hipótese de que as linhas Hep G2 e Hepa 1-6 possam apresentar o mesmo tipo comportamento celular, nomeadamente no que diz respeito ao metabolismo celular e aos alvos do 3-BP. No entanto, para se poder concluir se isso era geral para linhas de cancro hepático, ter-se-ia que incluir um maior número de linhas no estudo, para ver se seria típico do tipo de cancro em si, ou se apenas se tratava de um fenómeno limitado a algumas dessas linhas.

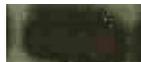
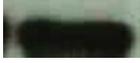
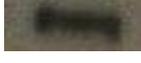
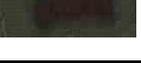
É de salientar que foi publicado na literatura um estudo com recurso às Hep G2, de adenocarcinoma hepatocelular, em que determinaram o efeito do 3-BP, sendo o valor de  $\text{IC}_{50}$  obtido nesse trabalho consideravelmente superior ao aqui apresentado. Nesse estudo foi utilizado no entanto um outro método para a avaliação do efeito citotóxico do composto, o ensaio de MTT. Este é um método colorimétrico indireto que avalia a atividade metabólica das células, medindo o produto formado por desidrogenases

mitocondriais de células metabolicamente ativas ou viáveis (77). O  $IC_{50}$  determinado nesse estudo foi de  $238,9 \pm 13,9 \mu\text{M}$  com um período de exposição de 48 horas (78). No nosso trabalho, as células foram expostas ao composto durante 16 horas, tendo-se obtido um valor de  $IC_{50}=82,99 \pm 8,09 \mu\text{M}$ . Esta discrepância de valores pode ser justificada pelo método utilizado e pela proveniência da linha celular. Na literatura está ainda descrito um outro estudo com uma linha celular utilizada no presente trabalho. Nesse estudo foi utilizada a linha tumoral HT-29 para ensaios de viabilidade com o 3-BP, recorrendo igualmente ao ensaio de MTT. O ensaio decorreu por 24 horas e o valor de  $IC_{50}$  ronda os  $160 \mu\text{M}$  (72). Os nossos resultados advieram do ensaio de SRB, e exibiram valores de  $IC_{50}$  de  $126,47 \pm 15,11 \mu\text{M}$ . Neste caso, o resultado deste trabalho é da mesma ordem de grandeza do valor publicado, podendo a pequena diferença encontrada justificar-se pelo diferente método utilizado na determinação da viabilidade celular ou pela diferente proveniência da linha celular. Relativamente às restantes linhas celulares, nomeadamente para o carcinoma oral, não há estudos publicados referentes à ação do 3-BP nessas linhas, sendo este estudo o primeiro a avaliar tal efeito. As linhas de adenocarcinoma de mama e de glioblastoma foram analisadas pelo grupo de trabalho do laboratório e são frequentemente seu objeto de estudo.

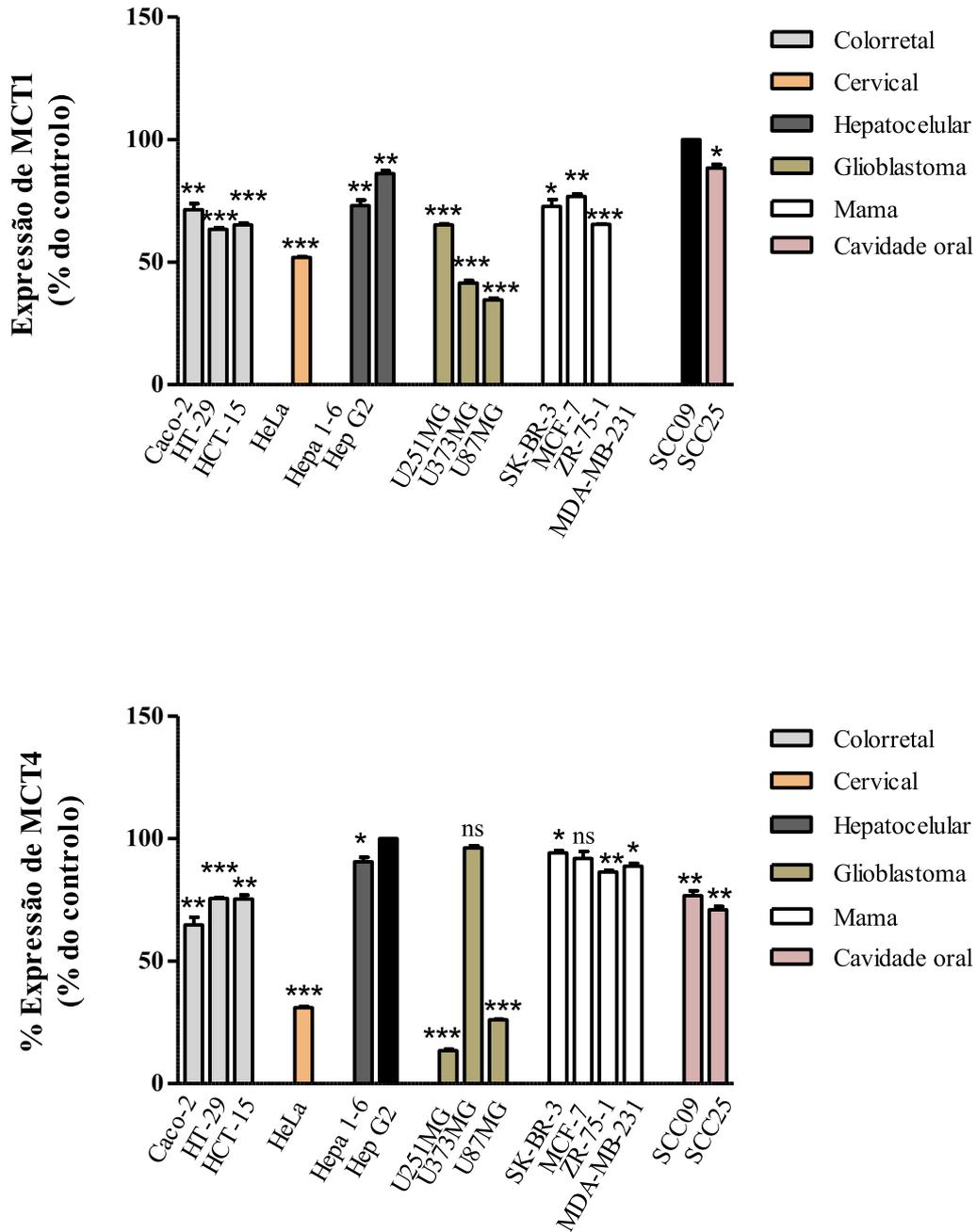
### 3.2. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS MCT1 E MCT4

Os MCTs são proteínas que desempenham um papel fundamental no fenótipo glicolítico das células tumorais, e no modelo de simbiose entre as células mais oxidativas e mais glicolíticas presentes no tumor. Adicionalmente, podem ter um papel chave na ação do 3-BP em células tumorais, sendo a sua porta de entrada. De modo a avaliar a expressão do MCT1 e MCT4 nas diferentes linhas celulares tumorais analisadas, procedeu-se à técnica de *Western-blot*. Foram utilizados extratos proteicos a partir de culturas sem qualquer tratamento, de forma a avaliar a expressão basal destes transportadores. A expressão dos MCTs foi avaliada nas linhas de adenocarcinoma de mama (MCF-7, MDA-MB-231, ZR-75-1 e SK-BR-3); carcinoma hepatocelular (Hep G2 e Hepa 1-6); adenocarcinoma cervical (HeLa); glioblastomas (U251MG, U373MG e U87MG); adenocarcinoma colorretal (HT-29, HCT-15 e Caco-2) e carcinoma da cavidade oral (SCC09 e SCC25) (Figura 11, Tabela 9). A tubulina foi utilizada como controlo de *loading*.

**A**

Linhas tumorais	Anticorpo			
	Tubulina	MCT1	MCT4	
Adenocarcinoma de mama	MCF-7			
	MDA-MB-231			
	ZR-75-1			
	SK-BR-3			
Carcinoma hepatocelular	HepG2			
	Hepa 1-6			
Adenocarcinoma cervical	HeLa			
Glioblastomas	U251MG			
	U373MG			
	U87MG			
Adenocarcinoma colorretal	HT-29			
	HCT-15			
	Caco-2			
Carcinoma da cavidade oral	SCC09			
	SCC25			

B



**Figura 11:** Expressão proteica do MCT1 e MCT4 avaliada por *Western-blot* em linhas celulares tumorais de adenocarcinoma de mama, carcinoma hepatocelular, adenocarcinoma cervical, glioblastoma, adenocarcinoma colorretal e carcinoma da cavidade oral. **A)** Resultados representativos da expressão proteica de MCT1 e MCT4, em condições basais. **B)** Níveis de expressão de MCT1 e MCT4, em condições basais, relativos às células controle (barras a preto - correspondente à linha que apresentou maior expressão de cada uma das proteínas). Os resultados representam os valores médios  $\pm$  D.P. de pelo menos duas experiências independentes. O significado estatístico foi estimado pelo teste *t-student*: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,005$ ; ns: sem significado estatístico - significativamente diferentes das células controle.

Todas as linhas tumorais utilizadas apresentaram expressão dos transportadores MCT1 e MCT4, à exceção da linha tumoral MDA-MB-231 que não apresentou expressão de MCT1, com a metodologia utilizada. A linha tumoral MDA-MB-231 não apresentou expressão da proteína, devido a uma metilação no promotor do gene MCT1, que bloqueou os níveis de expressão de MCT1 (79, 80). A tabela 9 apresenta igualmente os valores de IC<sub>50</sub> do 3-BP nas diferentes linhas celulares tumorais, de forma a analisar a correlação existente entre a expressão dos MCTs e a sensibilidade ao composto.

**Tabela 9:** Correlação entre os valores de IC<sub>50</sub> e a expressão proteica das linhas tumorais. Para efeitos de determinação de percentagem relativa de cada um dos transportadores nas diferentes linhas celulares, considerou-se como controlo (100% de expressão) a linha que apresentava maior expressão de cada transportador, respetivamente.

Linha tumoral	IC <sub>50</sub> (µM)	Expressão proteica (%)	
		MCT1	MCT4
<b>Caco-2</b>	93,33 ± 5,21	<b>73,90 ± 3,40</b>	<b>61,68 ± 4,34</b>
<b>HT-29</b>	126,47 ± 15,11	<b>64,11 ± 2,02</b>	<b>75,97 ± 1,13</b>
<b>HCT-15</b>	30,69 ± 6,29	<b>65,91 ± 2,01</b>	<b>74,03 ± 3,30</b>
<b>HeLa</b>	41,88 ± 3,44	<b>51,67 ± 0,93</b>	<b>30,41 ± 1,45</b>
<b>Hepa 1-6</b>	89,33 ± 3,86	<b>75,32 ± 3,70</b>	<b>88,56 ± 3,83</b>
<b>Hep G2</b>	82,99 ± 8,09	<b>87,28 ± 3,10</b>	<b>100,00</b>
<b>U251MG</b>	95,72 ± 7,43	<b>64,71 ± 0,66</b>	<b>12,97 ± 0,76</b>
<b>U373MG</b>	64,71 ± 7,01	<b>40,41 ± 1,57</b>	<b>97,22 ± 1,47</b>
<b>U87MG</b>	65,92 ± 6,95	<b>33,98 ± 0,96</b>	<b>25,81 ± 0,34</b>
<b>SK-BR-3</b>	458,1 ± 28,6	<b>75,59 ± 4,24</b>	<b>95,11 ± 2,94</b>
<b>MCF-7</b>	84,6 ± 15,40	<b>77,75 ± 2,86</b>	<b>89,01 ± 3,72</b>
<b>ZR-75-1</b>	55,7 ± 1,50	<b>65,40 ± 0,21</b>	<b>85,72 ± 1,98</b>
<b>MDA-MB-231</b>	148,6 ± 28,1	<b>0,00</b>	<b>87,65 ± 3,40</b>
<b>SCC09</b>	> 150	<b>100,00</b>	<b>74,57 ± 4,41</b>
<b>SCC25</b>	> 300	<b>89,92 ± 4,49</b>	<b>72,27 ± 4,15</b>

As proteínas MCT1 e o MCT4, quando presentes na membrana plasmática da célula, têm como função o efluxo de lactato, produto final da via glicolítica, por meio de um simporte com protões, sendo assim responsáveis pela acidificação do meio extracelular, característico do microambiente tumoral (17). A expressão destas proteínas ao nível da membrana plasmática pode ainda estar associada ao efeito tóxico do 3-BP em diferentes

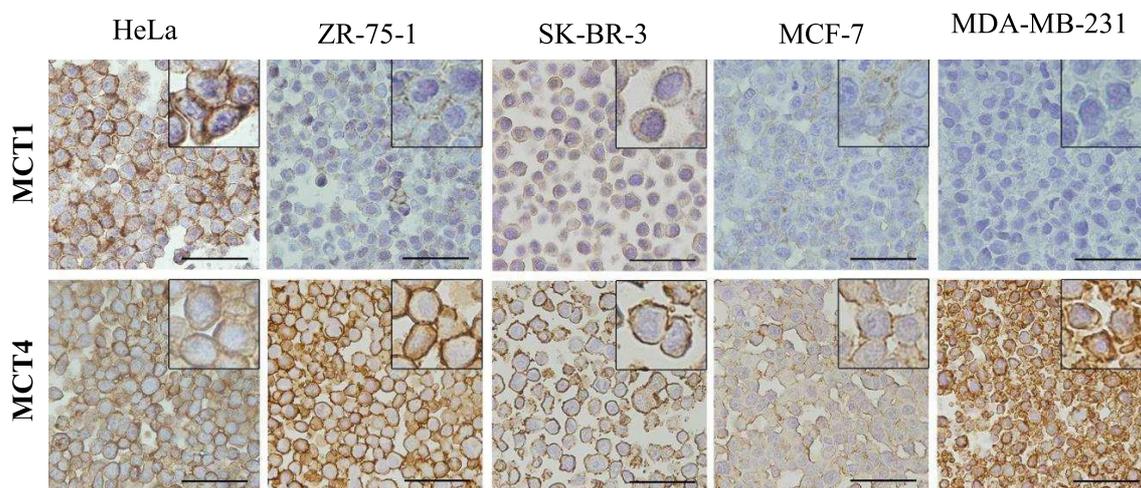
tipos de linhas tumorais, uma vez que diversos estudos apontam para que sejam estes transportadores o mecanismo de entrada do composto na célula. Todas as linhas tumorais utilizadas apresentaram expressão dos transportadores MCT1 e MCT4, à exceção da linha tumoral MDA-MB-231 que não apresentou expressão de MCT1, com a metodologia utilizada. A linha tumoral MDA-MB-231 não apresentou expressão da proteína, devido a uma metilação no promotor do gene MCT1, que bloqueou os níveis de expressão de MCT1 (79, 80). A tabela 9 apresenta igualmente os valores de  $IC_{50}$  do 3-BP nas diferentes linhas celulares tumorais, de forma a analisar a correlação existente entre a expressão global dos MCTs e a sensibilidade ao composto.

Os níveis de expressão de MCT1 revelaram ser significativos em todas as linhas tumorais, à exceção das MDA-MB-231, mas principalmente nas linhas de cancro oral e de fígado. A linha U87MG exibiu níveis de expressão mais reduzidos tanto para o MCT1, como para o MCT4. De acordo com a função descrita dos MCT1 e MCT4 no possível transporte de 3-BP (57), as linhas com maior resistência ao 3-BP deveriam apresentar baixa expressão destes transportadores. Contudo, as células tumorais que apresentaram maior valor de  $IC_{50}$  (SCC09 e SCC25 de carcinoma da cavidade oral, SK-BR-3 de cancro de mama e HT-29 de adenocarcinoma colorretal), logo maior resistência ao 3-BP, apresentaram valores significativos da expressão quer do MCT1, quer do MCT4. A exceção foi a linha MDA-MB-231, que apesar de ter um valor elevado de  $IC_{50}$ , não apresenta expressão do MCT1 devido à metilação no seu promotor, tal como foi referido. Já a linha tumoral Hep G2, de carcinoma hepatocelular, que representa uma linha com mais sensibilidade ao 3-BP que as anteriores, revelou ser a linha que expressa níveis de MCT4 mais elevados, apresentando também elevada expressão de MCT1. As linhas tumorais com os valores mais reduzidos de  $IC_{50}$ , apresentando assim maior sensibilidade ao 3-BP, foram as HCT-15 de adenocarcinoma colorretal e HeLa de adenocarcinoma cervical, as quais apresentaram expressão intermédia quer de MCT1 como de MCT4.

Os resultados obtidos após a avaliação dos níveis de expressão do MCT1 e MCT4 não foram assim de encontro ao que era esperado, não se tendo verificado uma associação direta dos níveis de expressão de MCTs com o efeito citotóxico do 3-BP. Porém, essa correlação só se deverá verificar se o MCT1 e o MCT4 estiverem ambos presentes na membrana plasmática da célula tumoral e com a sua atividade normal (17), pelo que

essa discrepância poderá ser justificada por uma diferente atividade das proteínas ou localização ao nível da membrana plasmática. No presente trabalho não foram realizados estudos de localização celular, onde poderíamos investigar a localização das proteínas MCT1 e MCT4 nas diferentes linhas. Estudos anteriores do nosso laboratório demonstraram que a linha tumoral SK-BR-3 de adenocarcinoma de mama, com bastante resistência ao 3-BP, apresentou elevada expressão de MCT1, mas essencialmente ao nível do citoplasma e não ao nível da membrana plasmática, apresentando assim a função de transportador comprometida (76). Assim, justifica-se o facto de apesar de esta linha apresentar uma expressão significativa de MCT1, mostrar também elevada resistência ao 3-BP, uma vez que possui menor número de moléculas MCT1 capazes de transportar o 3-BP através da membrana plasmática. Pelo contrário, a linha tumoral ZR-75-1, de adenocarcinoma de mama, mais sensível ao efeito citotóxico do 3-BP, com um valor reduzido de  $IC_{50}$ , apresentou maior expressão de MCT1 e MCT4 ao nível da membrana plasmática, conforme avaliado por imunocitoquímica, apesar de ao nível da expressão global isso não ser notório nos ensaios de *Western-blot*. Este facto pode justificar a elevada captação de moléculas de 3-BP, através dos MCTs expressos na membrana. A linha tumoral MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama, que apresentou elevada resistência ao 3-BP, indicou ausência de níveis de expressão de MCT1 (pela metilação no promotor no gene MCT1), porém observaram-se níveis de expressão significativos de MCT4. Esta elevada resistência ao 3-BP pode ser justificada não só pela ausência de MCT1, mas também pelo facto do transportador MCT4 localizar-se não só na membrana plasmática, mas também no citoplasma. Assim, é reduzido o número de moléculas de MCT4 capazes de captar o 3-BP para o interior da célula tumoral. Consequentemente, e apesar da elevada expressão de MCT4, a célula tumoral apresenta elevada resistência ao composto, tendo em conta que a ausência de MCT1 também contribui para essa resistência. Foram ainda realizados ensaios no nosso laboratório com a linha tumoral HeLa, de adenocarcinoma cervical, a qual se apresentou como uma das linhas com maior sensibilidade ao 3-BP e com uma expressão intermédia de MCT1 e MCT4. O grupo de trabalho demonstrou, por imunocitoquímica que a linha tumoral HeLa apresentou expressão significativa dos MCTs, principalmente do MCT1 ao nível da membrana plasmática. O aumento de sensibilidade ao 3-BP estaria relacionado com a elevada expressão de MCT1 e MCT4 na membrana plasmática, pelo que existiria um maior número de moléculas de MCTs responsáveis pelo influxo de 3-BP.

A figura 12 apresenta os resultados de imunocitoquímica realizados para as linhas de cancro de mama (ZR-75-1, SK-BR-3, MCF-7 e MDA-MB-231) e HeLa, no nosso laboratório. Assim a discrepância observada entre expressão dos MCTs e sensibilidade ao 3-BP pode ser justificado por uma diferente atividade das proteínas ou localização ao nível da membrana plasmática, visto que não foram realizados ensaios de localização celular para as proteínas, em todas as linhas em estudo.



**Figura 12:** Análise por Imunocitoquímica da expressão das proteínas MCT1 e MCT4, em diferentes linhas celulares.

A correta expressão e atividade do transportador MCT1 e MCT4 na membrana plasmática dependem da atividade de uma proteína auxiliar (chaperona), a CD147 (81). Assim, é necessária a completa funcionalidade da CD147 para a correta localização e atividade dos MCTs na membrana plasmática. Esta proteína auxiliar além de atuar como chaperona do MCT1 e MCT4, também induz a atividade de metaloproteinases, tendo como consequência a proliferação e invasão do tumor (35, 82). A expressão e atividade desta proteína não foram estudadas no presente trabalho, mas poderão estar relacionadas com as discrepâncias observadas entre a expressão global dos MCTs e a sensibilidade das diferentes linhas tumorais ao 3-BP.

### 3.3. GENOTIPAGEM DO POLIMORFISMO T1470A DO GENE MCT1

As células tumorais apresentam elevadas taxas glicolíticas, e os MCTs desempenham um papel fundamental no seu metabolismo (7). Conforme referido anteriormente, a presença de polimorfismos nestas proteínas pode levar a alterações na sua atividade. Assim pretendeu-se genotipar as linhas tumorais em estudo para os polimorfismos

T1470A (presente no gene MCT1) e C44T (presente no gene MCT4) e verificar se existe uma correlação entre o genótipo das linhas tumorais relativamente a estes polimorfismos, a expressão do respetivo MCT e o efeito citotóxico do 3-BP.

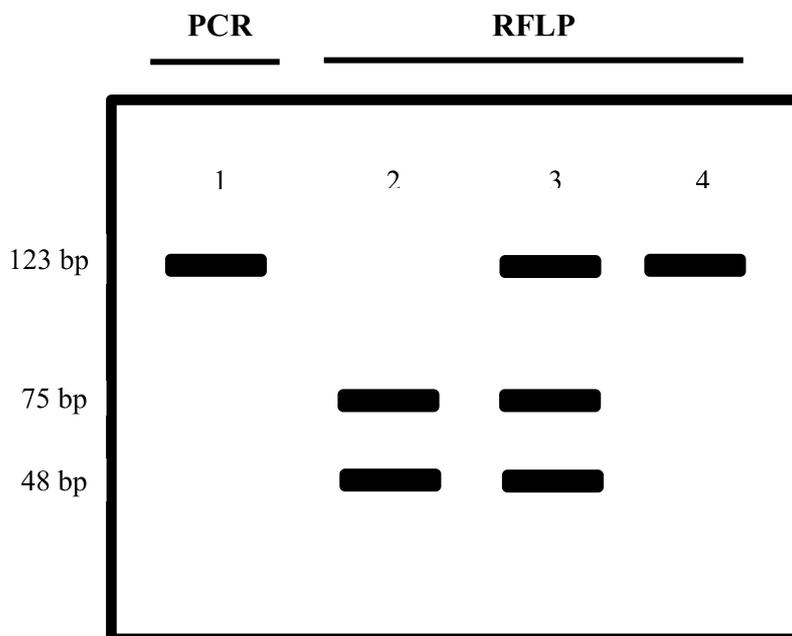
Relativamente ao gene MCT1, o polimorfismo que escolhemos para ser genotipado foi o T1470A (que provoca a troca de uma timina (T) por uma adenina (A) na posição 1470 do gene, levando à substituição do ácido aspártico, na posição 490, por ácido glutâmico (Asp490Glu)). Para a genotipagem deste polimorfismo utilizou-se DNA genómico (DNAg) das linhas celulares tumorais em estudo (adenocarcinoma de mama, carcinoma hepatocelular, adenocarcinoma cervical, glioblastomas, adenocarcinoma colorretal e carcinoma da cavidade oral), que foi analisado por *Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP) e *High Resolution Melt* (HRM).

### 3.3.1. ANÁLISE DO POLIMORFISMO T1470A POR PCR-RFLP

A genotipagem do polimorfismo T1470A através da técnica de PCR-RFLP, consistiu na amplificação de um fragmento de 123 bp contendo a zona do polimorfismo, submetendo, de seguida, o produto obtido a restrição enzimática com a enzima *BclI*. A amplificação deste fragmento foi também realizada num plasmídeo comercial contendo o DNA complementar (DNAc) do gene MCT1 normal (sem polimorfismo), que serviu de controlo na análise da digestão enzimática. Após a digestão, os fragmentos obtidos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2%. A presença do polimorfismo no gene leva à eliminação do local de reconhecimento da enzima de restrição *BclI*. Dessa forma, no caso de um genótipo homozigota mutante (AA), a enzima não digere o fragmento amplificado por PCR, sendo o fragmento obtido após RFLP igual ao produto de PCR, apresentando 123 bp. Para um genótipo homozigota normal (TT), após a digestão com a enzima, obtêm-se duas bandas, uma correspondente a 75 bp e a outra correspondente a 48 bp, resultantes da digestão do fragmento amplificado no local de restrição. Por sua vez, no caso de heterozigotia (TA) será esperado, após o RFLP, um fragmento de 123 pb correspondente ao alelo mutado e dois fragmentos de 75 pb e 48 pb, correspondentes ao alelo normal. A figura 13 mostra um esquema representativo dos

fragmentos, e respectivos pesos moleculares, após digestão enzimática, para cada genótipo.

De forma a comparar os resultados obtidos por PCR-RFLP, as linhas tumorais foram também genotipadas por HRM. Os resultados obtidos pelas duas técnicas coincidiram e estão indicados na secção seguinte (3.3.2.), na tabela 10.

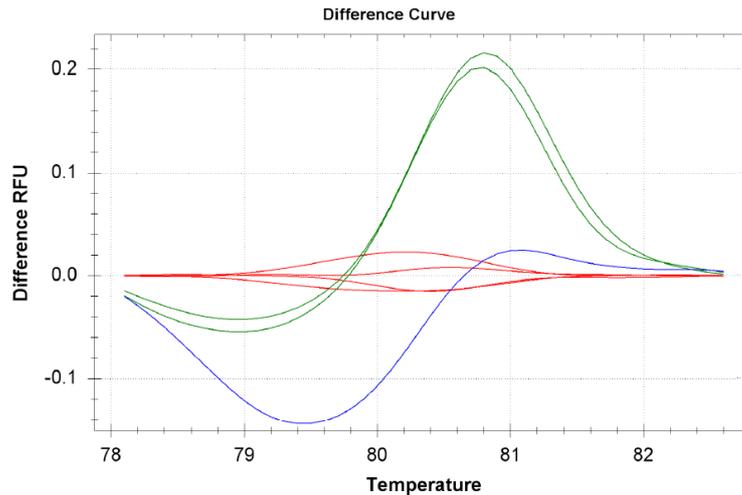


**Figura 13:** Representação esquemática da análise eletroforética dos produtos de PCR-RFLP com a enzima *BclI*, correspondentes aos diferentes genótipos para o polimorfismo T1470A presente no gene MCT1. A posição 1 corresponde ao produto de PCR; nas posições 2, 3 e 4 esquematizam-se os resultados do PCR-RFLP de linhas celulares com os genótipos TT, TA e AA, respetivamente.

### 3.3.2. ANÁLISE DO POLIMORFISMO T1470A POR HRM

A metodologia de HRM possibilita, tal como o PCR-RFLP, a genotipagem de polimorfismos, através da deteção da presença ou ausência de *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs). Esta técnica foi usada como alternativa complementar à metodologia anterior por ser uma ferramenta mais precisa e menos morosa, visto que não é realizado o passo de digestão enzimática (RFLP). Como o HRM permite obter resultados finais semelhantes aos conseguidos pela metodologia anterior, e de forma a confirmar os resultados obtidos por PCR-RFLP, foram válidos os dois métodos de genotipagem. A metodologia de HRM, baseia-se na análise do genótipo, através da análise do perfil de *melting* do produto de PCR contendo a zona do polimorfismo. O

HRM gera perfis de curvas de *melting* de cada amostra de DNAg, sendo possível a distinção entre cada genótipo, devido a cada um dar origem uma curva de *melting* diferente. Amostras homozigotas para a mutação, heterozigotas e o plasmídeo MCT1 (homozigota normal), previamente identificadas por PCR-RFLP, foram incluídas em cada ensaio de HRM, de forma a aumentar o grau de confiança e a poder atribuir o respetivo genótipo a cada grupo. Os resultados obtidos para uma análise de HRM deste polimorfismo encontram-se na figura 14.



**Figura 14:** Resultados da análise da curva de *melting* do DNAg, para a amplificação de uma região de 123 bp, contendo o polimorfismo T1470A presente no gene MCT1. A verde encontram-se os homozigotas mutantes, a vermelho os homozigotas normais e a azul os heterozigotas (genótipos atribuídos com um grau de confiança compreendido entre 95 e 100).

As curvas de *melting* são construídas com base na emissão de sinais de fluorescência, que ocorrem através da incorporação de um fluorocromo que se incorpora na cadeia dupla de DNAg. Neste tipo de análise, as amostras foram expostas a temperaturas de 95°C que conduziram à desnaturação do DNA. Quando as cadeias de DNAg iniciaram o processo de desnaturação, a fluorescência emitida começou a diminuir, permitindo que se conseguisse registar as diferenças entre as amostras, devido à substituição nucleotídica. Finalmente, efetuou-se a análise num *software* adequado (“*Precision Melt Analysis™ Software*”), que agrupou automaticamente as curvas semelhantes em grupos que representaram os diferentes genótipos. O polimorfismo T1470A (substituição nucleotídica de T por A), levou a um aumento da temperatura nos perfis homozigotas mutantes. Os nucleótidos C-G encontram-se ligados por três pontes de hidrogénio, contrariamente aos nucleótidos A-T, que estão ligados por apenas duas pontes. No polimorfismo em estudo, a troca de nucleótidos de T-A, não provoca alteração no

número de pontes de hidrogénio. Desta forma, o polimorfismo T1470A (que é de rara frequência) é considerado de difícil genotipagem. No entanto, as amostras previamente genotipadas através do PCR-RFLP, assim como o plasmídeo contendo o DNAC do MCT1 serviram como controlo para determinar a temperatura específica dos diferentes genótipos. Verificou-se que o produto amplificado do genótipo AA (homozigota para a mutação) apresentou uma temperatura de *melting* de 80,60°C (representado a verde na figura 14). O alelo TT (homozigota normal) apresentou uma temperatura de *melting* de 80,20°C (representado a vermelho na figura 14). Os heterozigotas contêm ambos os alelos, formando heteroduplexes, dando origem a uma curva diferente (representado a azul na figura 14) e a uma temperatura de *melting* intermédia. Os resultados obtidos para a genotipagem do polimorfismo T1470A encontram-se apresentados na tabela 10, juntamente com o valor de IC<sub>50</sub> de cada linha tumoral.

**Tabela 10:** Genotipagem do polimorfismo T1470A presente no gene MCT1, nas linhas celulares tumorais, determinada por PCR-RFLP e HRM, e o respetivo valor de IC<sub>50</sub> do 3-BP.

<b>Linha tumoral</b>	<b>IC<sub>50</sub> (µM)</b>	<b>Genótipo (Polimorfismo T1470A)</b>
<b>MCF-7</b>	84,6 ± 15,40	Heterozigota (TA)
<b>MDA-MB-231</b>	148,6 ± 28,10	Homozigota normal (TT)
<b>ZR-75-1</b>	55,7 ± 1,50	Heterozigota (TA)
<b>SK-BR-3</b>	458,1 ± 28,6	Homozigota mutante (AA)
<b>Hep G2</b>	82,99 ± 8,09	Heterozigota (TA)
<b>Hepa 1-6</b>	89,33 ± 3,86	Homozigota mutante (AA)
<b>HeLa</b>	41,88 ± 3,44	Heterozigota (TA)
<b>U251MG</b>	95,72 ± 7,43	Heterozigota (TA)
<b>U373MG</b>	64,71 ± 7,01	Heterozigota (TA)
<b>U87MG</b>	65,92 ± 6,95	Heterozigota (TA)
<b>HT-29</b>	126,47 ± 15,11	Homozigota normal (TT)
<b>HCT-15</b>	30,69 ± 6,29	Homozigota normal (TT)
<b>Caco-2</b>	93,33 ± 5,21	Heterozigota (TA)
<b>SCC09</b>	> 150	Homozigota normal (TT)
<b>SCC25</b>	> 300	Homozigota normal (TT)

Os genótipos obtidos por HRM para o polimorfismo T1470A foram concordantes com os genótipos obtidos através da técnica PCR-RFLP, realizada por digestão enzimática.

O polimorfismo T1470A leva a um decréscimo da atividade da proteína, diminuindo o transporte do lactato através do transportador MCT1 (50). O 3-BP entra na célula através de transportadores específicos, nomeadamente o MCT1. Se este possui o polimorfismo T1470A irá apresentar provavelmente uma menor atividade para o transporte dos seus substratos, nomeadamente para o 3-BP. Isso pode levar a um menor influxo de 3-BP na célula, e conseqüentemente a uma diminuição da sua ação anti-tumoral. Deste modo, para as células tumorais em que o MCT1 apresente o polimorfismo, poderá ser necessário uma maior concentração de 3-BP para atingir a mesma citotoxicidade apresentada por células tumorais que apresentem o MCT1 normal. Assim, podemos esperar que o valor de  $IC_{50}$  nas células portadoras do genótipo AA seja mais elevado do que nas células com genótipo AT e estas do que as que apresentem MCT1 com genótipo normal (TT).

Perante este estudo, observou-se que as linhas SK-BR-3 e Hepa 1-6 apresentaram genótipo homozigota mutante para o polimorfismo T1470A, o que poderia levar a uma diminuição do efluxo do lactato através do MCT1. A linha tumoral SK-BR-3 apresenta-se como uma das linhas tumorais com maior resistência ao 3-BP ( $458,1 \pm 28,6 \mu M$ ), considerando o seu genótipo concordante com o seu valor de  $IC_{50}$ . No entanto, a linha tumoral Hepa 1-6, que também expressa um genótipo de homozigota mutante, apresenta um valor de  $IC_{50}$  relativamente baixo comparativamente às restantes linhas celulares e semelhante à outra linha celular de cancro hepático. Este resultado pode indicar que existem outras moléculas responsáveis pela captação do 3-BP para o interior da célula tumoral, nomeadamente os transportadores de ácidos monocarboxílicos com transporte de sódio acoplado (SMCTs) ou o MCT4 (83). As linhas tumorais MCF-7, ZR-75-1, Hep G2, HeLa, U251MG, U373MG, U87MG e Caco-2, apresentaram genótipo heterozigota (TA), concordante com valores de  $IC_{50}$  intermédio dentro do grupo de linhas em estudo. As linhas tumorais HT-29 e HCT-15 de adenocarcinoma colorretal, exibiram genótipo homozigota normal, o que sugeria que as células deveriam apresentar maior atividade de MCT1. No entanto, através do ensaio de *Western-blot* realizado neste estudo, foi observado que ambas as linhas de adenocarcinoma colorretal apresentaram níveis relativamente baixos de expressão de MCTs. Este facto pode sugerir que existe outro fator que possa ser responsável pela regulação da expressão dos MCTs, ou que o polimorfismo possa afetar não a expressão do transportador, mas sim a sua atividade. No caso da linha celular HCT-15 o genótipo está correlacionado com uma maior

sensibilidade ao 3-BP, como esperado, mas o mesmo não se passa com a linha HT-29, o que nos mostra novamente a pluralidade de fatores que poderão estar envolvidos neste processo.

As linhas tumorais SCC09 e SCC25 de adenocarcinoma da cavidade oral apresentam genótipo homozigota normal, apesar de representarem as linhas tumorais mais resistentes ao efeito do 3-BP, com valores de  $IC_{50} > 150 \mu M$  e  $IC_{50} > 300 \mu M$ , respetivamente. Apesar da elevada resistência ao composto, observou-se que apresentaram elevada expressão de MCTs e o genótipo que à partida levaria a uma maior atividade do transportador. Este resultado pode ser justificado por alguma disfunção na chaperona CD147, que se possuir algum defeito na sua funcionalidade, pode afetar a captação de 3-BP pelos MCTs. A discrepância pode ainda ser explicada pelo facto de nestas linhas as proteínas alvo do 3-BP poderem apresentar expressão alterada (como por exemplo a hexocinase II (HK II)).

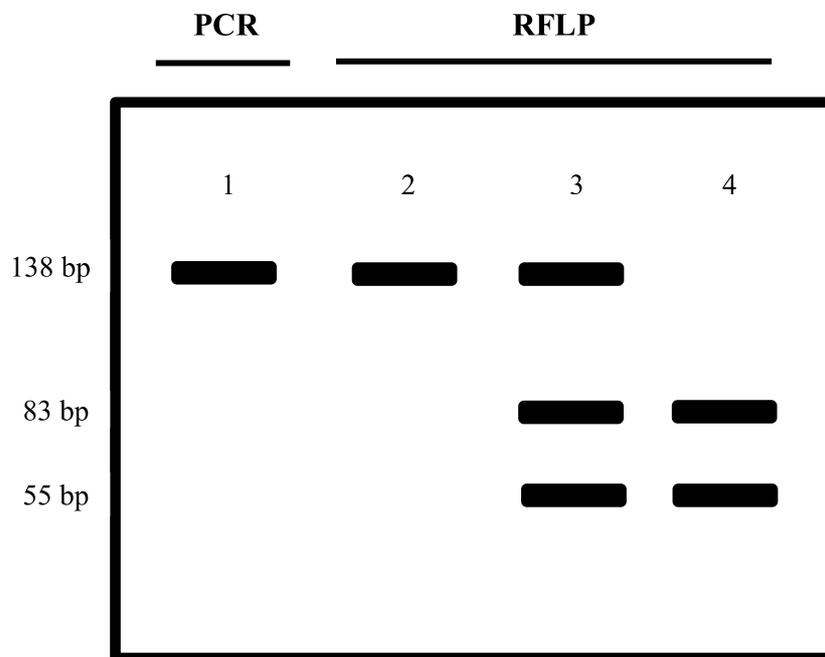
O polimorfismo T1470A não tem qualquer influência no transporte de lactato para a linha tumoral MDA-MB-231. Nem este polimorfismo, nem qualquer outro que esteja localizado no gene MCT1, devido ao facto desta linha não apresentar expressão da proteína MCT1. A linha tumoral MDA-MB-231 sofreu uma metilação numa região do seu gene, que bloqueou os níveis de expressão da proteína MCT1 (79, 80).

### 3.4. GENOTIPAGEM DO POLIMORFISMO C44T DO GENE MCT4

O polimorfismo C44T presente no gene MCT4 (responsável pela troca de uma citosina (C) por uma timina (T) na posição 44 do gene) leva à substituição de alanina, na posição 44 por valina (Ala15Val), e localiza-se na parte N-terminal da proteína (37). Para a genotipagem do polimorfismo C44T utilizou-se DNAg de linhas celulares tumorais em estudo (adenocarcinoma de mama, carcinoma hepatocelular, adenocarcinoma cervical, glioblastomas, adenocarcinoma colorretal e carcinoma da cavidade oral), que foi analisado por PCR-RFLP e HRM.

### 3.4.1. ANÁLISE DO POLIMORFISMO C44T POR PCR-RFLP

A genotipagem do polimorfismo C44T através da técnica de PCR-RFLP, consistiu na amplificação de um fragmento de 138 bp, contendo a zona do polimorfismo, submetendo, de seguida, o produto obtido a restrição enzimática com a enzima *PpuMI*. A amplificação deste fragmento foi também realizada num plasmídeo comercial contendo o DNAC do gene MCT4 normal, que serviu de controlo na análise da digestão enzimática. Após a digestão, os fragmentos obtidos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2%. Na presença do polimorfismo no gene, é introduzido um local de restrição para esta enzima, pelo que no caso de um genótipo de homozigota mutante (TT) obtêm-se duas bandas, resultantes da digestão do fragmento amplificado por PCR, uma banda correspondente a 83 bp e a outra a 55 bp. A presença de um genótipo normal (CC), leva à abolição do local de reconhecimento da enzima de restrição *PpuMI*. Deste modo a enzima não digere o fragmento amplificado por PCR e o fragmento obtido após RFLP será igual ao produto de PCR, apresentando 138 bp. Por sua vez, no caso de heterozigotia (CT) será esperado após o RFLP um fragmento de 138 pb correspondente ao alelo normal e dois fragmentos de 83 pb e 55 pb, correspondentes ao alelo mutado. A figura 15 mostra um esquema representativo dos fragmentos e respetivos pesos moleculares, após digestão enzimática para cada genótipo.



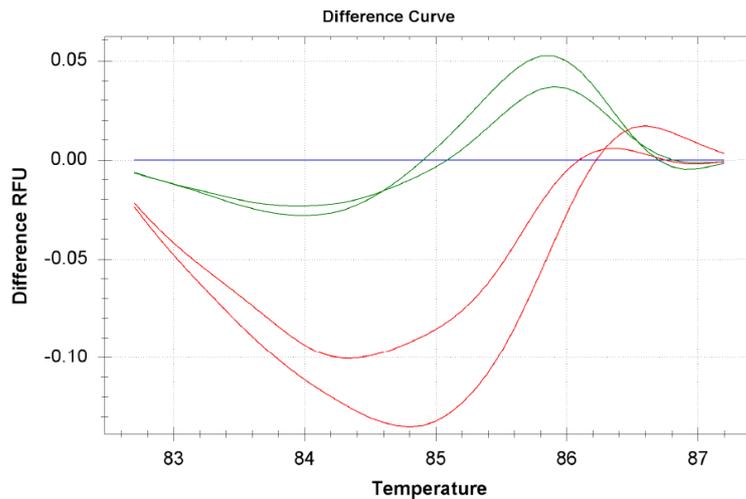
**Figura 15:** Representação esquemática da análise eletroforética dos produtos de PCR-RFLP com a enzima *PpuMI*, correspondentes aos diferentes genótipos para o polimorfismo C44T presente no gene MCT4. A posição 1

corresponde ao produto de PCR; nas posições 2, 3 e 4 esquematizam-se os resultados do PCR-RFLP de linhas celulares com os genótipos CC, CT e TT, respetivamente.

De forma a comparar os resultados obtidos por PCR-RFLP, as linhas tumorais foram também genotipadas por HRM. Os resultados obtidos pelas duas técnicas coincidiram e estão indicados na secção seguinte (3.4.2.) na tabela 11.

### 3.4.2. ANÁLISE DO POLIMORFISMO C44T POR HRM

Amostras homozigotas para a mutação, heterozigotas e o plasmídeo MCT4 (homozigota normal), previamente identificadas por PCR-RFLP, foram incluídas em cada ensaio de HRM de forma a aumentar o grau de confiança e a poder atribuir o respetivo genótipo a cada grupo. Os resultados obtidos para uma análise de HRM deste polimorfismo encontram-se na figura 16.



**Figura 16:** Resultados da análise da curva de *melting* do DNAg, para a amplificação de uma região de 138 bp, contendo o polimorfismo C44T presente no gene MCT4. A verde encontram-se os heterozigotas, a vermelho os homozigotas mutantes e a azul o homozigota normal (genótipos atribuídos com um grau de confiança compreendido entre 95 e 100).

O alelo T produz uma curva de *melting* diferente devido à substituição nucleotídica. Uma vez que os nucleótidos C-G encontram-se ligados por três pontes de hidrogénio, enquanto os nucleótidos A-T estão ligados por apenas duas pontes, o polimorfismo C44T é responsável pela diminuição de pontes de hidrogénio, que será observável pela diminuição da temperatura de *melting*. Assim, o polimorfismo responsável pelo alelo T leva à diminuição da temperatura nos perfis homozigotas mutantes, quando comparados

com os restantes genótipos. Neste sentido, o produto amplificado de um genótipo TT (homozigota para a mutação) apresenta uma temperatura de melting de 85,20°C (representado a vermelho na figura 16). O alelo CC apresenta uma temperatura de *melting* de 85,40°C (representado a azul na figura 16). Os heterozigotas contêm ambos os alelos, formando heteroduplexes, dando origem a uma curva diferente (representado a verde na figura 16) com uma temperatura de *melting* intermédia. Os resultados obtidos para a genotipagem do polimorfismo C44T encontram-se apresentados na tabela 11, juntamente com o valor de IC<sub>50</sub> de cada linha tumoral.

**Tabela 11:** Genotipagem do polimorfismo C44T presente no gene MCT4 nas linhas celulares tumorais determinada por PCR-RFLP e HRM, e o respetivo valor de IC<sub>50</sub> do 3-BP.

Linha tumoral	IC <sub>50</sub> (μM)	Genótipo (Polimorfismo C44T)
MCF-7	84,6 ± 15,40	Homozigota normal (CC)
MDA-MB-231	148,6 ± 28,10	Homozigota mutante (TT)
ZR-75-1	55,7 ± 1,50	Homozigota mutante (TT)
SK-BR-3	458,1 ± 28,6	Homozigota mutante (TT)
Hep G2	82,99 ± 8,09	Homozigota normal (CC)
Hepa 1-6	89,33 ± 3,86	Heterozigota (CT)
HeLa	41,88 ± 3,44	Homozigota mutante (TT)
U251MG	95,72 ± 7,43	Heterozigota (CT)
U373MG	64,71 ± 7,01	Homozigota mutante (TT)
U87MG	65,92 ± 6,95	Homozigota mutante (TT)
HT-29	126,47 ± 15,11	Homozigota normal (CC)
HCT-15	30,69 ± 6,29	Homozigota normal (CC)
Caco-2	93,33 ± 5,21	Homozigota mutante (TT)
SCC09	> 150	Homozigota mutante (TT)
SCC25	> 300	Homozigota normal (CC)

Os genótipos obtidos por HRM para o polimorfismo C44T foram concordantes com os genótipos obtidos através da técnica PCR-RFLP, realizada por digestão enzimática.

O polimorfismo C44T leva a uma potencial diminuição da atividade da proteína, diminuindo o transporte do lactato através do MCT4 (37). O 3-BP entra na célula através de transportadores específicos, nomeadamente o MCT4. Se este apresentar o polimorfismo C44T, poderá apresentar diminuição da atividade para o transporte dos

seus substratos, nomeadamente o 3-BP. Este pode ter assim menor ação anti-tumoral em células em que o MCT4 possua este tipo de polimorfismo. Para as células em que o MCT4 seja portador do polimorfismo, poderá ser então necessário uma maior concentração de 3-BP para atingir o mesmo grau de citotoxicidade comparativamente a células tumorais que apresentem o MCT4 normal. Assim, o valor de  $IC_{50}$  nas células portadoras do genótipo TT deverá ser mais elevado do que nas células que apresentem genótipo CT e este mais elevado que nas células contendo MCT4 com genótipo normal (CC).

Perante esta genotipagem, observou-se que as linhas tumorais MDA-MB-231, ZR-75-1, SK-BR-3, HeLa, U373MG, U87MG, Caco-2 e SCC09 apresentaram genótipo homozigota mutante (TT) para o polimorfismo C44T. As linhas tumorais SCC09 ( $IC_{50} > 150 \mu\text{M}$ ), SK-BR-3 ( $IC_{50} = 458,1 \pm 28,6 \mu\text{M}$ ) e MDA-MB-231 ( $IC_{50} = 148,6 \pm 28,1 \mu\text{M}$ ) apresentaram resistência ao 3-BP. Este facto justifica-se pela presença do polimorfismo C44T no transportador MCT4, que pode levar a menor atividade no transporte de moléculas de 3-BP para a célula, impedindo a sua ação anti-tumoral. Porém, existem linhas tumorais que são portadoras do polimorfismo, mas não apresentam tanta resistência ao 3-BP, como por exemplo, as Caco-2, HeLa, U373MG, U87MG e ZR-75-1, que exibiram um valor de  $IC_{50}$  inferior a  $100 \mu\text{M}$ . Apesar de apresentarem o polimorfismo, que diminui a atividade do MCT4 e conseqüentemente a captação do 3-BP para o interior da célula tumoral, estas linhas estão sensíveis à citotoxicidade do composto, que poderá ter sido transportado por outras permeases, nomeadamente pelo MCT1. As linhas tumorais Hepa 1-6 e U251MG apresentaram genótipo heterozigota (CT), concordante com valores de  $IC_{50}$  intermédio dentro do grupo de linhas em estudo. As linhas tumorais MCF-7, Hep G2, HT-29, HCT-15 e SCC25 apresentaram genótipo homozigota normal (CC). As linhas tumorais SCC25 ( $IC_{50} > 300 \mu\text{M}$ ) e HT-29 ( $IC_{50} = 126,47 \pm 15,11 \mu\text{M}$ ) apresentaram elevada expressão de MCT4, mas contrariamente ao previsto, apresentaram simultaneamente elevada resistência ao 3-BP. Isso talvez poderá ser justificado por outros fatores, nomeadamente disfunção ao nível da chaperona CD147 ou alterações bioquímicas intracelulares ao nível dos alvos do 3-BP.

Após a genotipagem dos polimorfismos T1470A e C44T presentes nos genes MCT1 e MCT4 respetivamente, os dados obtidos através de PCR-RFLP e HRM, poderiam ser

confirmados por sequenciação. Esta técnica permite igualmente confirmar a genotipagem, através do DNAg das linhas celulares tumorais do presente estudo. Tal não foi no entanto realizado, devido à concordância de resultados entre os dois métodos utilizados no presente trabalho.

### 3.5. AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE LACTATO EXTRACELULAR

As células tumorais recorrem ao “Efeito de Warburg”, desviando o piruvato do processo oxidativo (8, 13). O piruvato é convertido posteriormente a lactato, sendo exportado para o exterior através dos MCTs, que são fundamentais para a sobrevivência das células tumorais (13). Tomando como base os genótipos para os polimorfismos T1470A e C44T de adenocarcinoma de mama e glioblastoma estudou-se a correlação entre a concentração extracelular de lactato (relacionado com a atividade dos MCTs) e a presença dos polimorfismos em estudo (Tabela 12). Dados obtidos do grupo de trabalho.

**Tabela 12:** Concentração extracelular de ácido láctico em culturas de células de adenocarcinoma de mama (MCF-7, MDA-MB-231, ZR-75-1 e SK-BR-3) e glioblastomas (U251MG, U373MG e U87MG), incubadas sem qualquer tratamento. Os resultados foram normalizados para a biomassa total, dividindo a quantidade de ácido láctico total pela densidade ótica a 540 nm.

<b>Linha tumoral</b>	<b>IC<sub>50</sub> (µM)</b>	<b>Genótipo T1470A</b>	<b>Concentração de lactato</b>	<b>Genótipo C44T</b>
<b>MCF-7</b>	84,6 ± 15,4	TA	<b>33,37 ± 6,16</b>	CC
<b>MDA-MB-231</b>	148,6 ± 28,1	TT	<b>57,0 ± 1,63</b>	TT
<b>ZR-75-1</b>	55,7 ± 1,50	TA	<b>30,0 ± 4,00</b>	TT
<b>SK-BR-3</b>	458,1 ± 28,6	AA	<b>19,2 ± 0,90</b>	TT
<b>U251MG</b>	95,72 ± 7,43	TA	<b>32,13 ± 5,09</b>	CT
<b>U373MG</b>	64,71 ± 7,01	TA	<b>21,13 ± 2,78</b>	TT
<b>U87MG</b>	65,92 ± 6,95	TA	<b>30,35 ± 3,45</b>	TT

As linhas tumorais que apresentaram um perfil de homozigota normal para os polimorfismos T1470A e C44T possuem moléculas de MCT1 e MCT4, respetivamente, com atividade normal. O efluxo de lactato é realizado normalmente através destes

MCTs, de forma a não comprometer a sobrevivência das células tumorais. Porém, as linhas que apresentaram um perfil de homozigota mutante para os polimorfismos anteriormente referidos, possuem moléculas de MCT1 e MCT4 com atividade diminuída (37, 50). Assim, o efluxo de lactato poderá estar comprometido, sendo esperado nesses casos uma menor concentração de lactato extracelular.

Para o polimorfismo T1470A presente no gene MCT1, verifica-se que a linha SK-BR-3, homozigota mutante, exibe a concentração mais reduzida de lactato extracelular. Esta linha apresenta também o polimorfismo C44T no gene MCT4, o que está de acordo com uma menor atividade destes transportadores, o que se traduz numa maior resistência ao 3-BP, tal como foi observado. No entanto, a linha MDA-MB-231, sem expressão de MCT1 e com genótipo mutante de MCT4 apresenta um maior efluxo de lactato, o que não seria esperado. Isso pode ser explicado no entanto, pelo metabolismo altamente glicolítico desta linha, que conduz a uma elevada produção de ácido láctico e consequentemente a uma maior exportação (84). Por sua vez, as células MCF-7 (heterozigota para o polimorfismo T1470A do gene MCT1 e com genótipo homozigota normal para o polimorfismo C44T do gene MCT4) e ZR-75-1 (heterozigota para o polimorfismo C1470T do gene MCT1 e com genótipo homozigota mutante para o polimorfismo C44T do gene MCT4), apresentaram valores intermédios de lactato extracelular.

No que diz respeito aos glioblastomas, verificou-se que as três linhas apresentaram o mesmo genótipo para o polimorfismo T1470A do gene MCT1. A linha U373MG, de genótipo homozigota mutante para o polimorfismo C44T do gene MCT4, apresentou níveis mais reduzidos de ácido láctico extracelular, na ordem dos 20  $\mu$ g, o que seria esperado de acordo com esse genótipo, mas o mesmo não se observou com a linha U87MG com o mesmo genótipo. A linha U251MG, com genótipo heterozigota, apresentou valores idênticos aos da linha tumoral U87MG. No entanto, é de considerar que existem outras moléculas capazes de realizar o efluxo do lactato para além do MCT4, nomeadamente o MCT1. Este transportador, com uma expressão ubíqua nos tecidos (29), pode ser o responsável pelos níveis elevados de lactato extracelular, quando o MCT4 é portador de um polimorfismo que diminui a sua atividade de efluxo de lactato. Podemos no entanto verificar que a linha tumoral que apresenta polimorfismos diminuidores de atividade em ambos os genes (linha tumoral SK-BR-3) foi a que teve um menor efluxo de lactato, que pode de facto ser devido à menor

atividade destes transportadores. Nos outros casos, ainda que um dos genes apresente o polimorfismo poderá ser compensado pela atividade do outro (com genótipo normal). Podemos concluir que de forma geral, não se observou correlação entre a expressão global dos MCTs, a presença de polimorfismos nos genes destes transportadores e o efeito antiglicolítico do 3-BP nas células tumorais. Apesar da importância da função dos MCTs na captação de moléculas de 3-BP para o interior da célula, os transportadores podem não ser apenas os únicos na captação do composto, além de que a variabilidade metabólica e celular encontrada nos diferentes tipos de cancro podem contribuir para estas discrepâncias. De facto, podem existir outras moléculas responsáveis pelo mecanismo de toxicidade do 3-BP, sendo necessários mais estudos, conforme será indicado posteriormente na secção das perspetivas futuras (secção V).

## **CAPÍTULO IV**

---

### **DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES**



As células tumorais recorrem à glicólise aeróbia, processo também denominado “Efeito de *Warburg*”, para obtenção de energia. Este tipo de metabolismo é menos rentável energeticamente para a célula tumoral, porém apresenta vantagens para a proliferação e sobrevivência do tumor (6). As células tumorais apresentam elevada taxa glicolítica, com consequente aumento da produção de lactato, que tem de ser exportado para o exterior da célula, de modo a evitar a acidose metabólica. Os transportadores de ácidos monocarboxílicos (MCTs) são responsáveis pelo efluxo do lactato para o meio extracelular e por manter o gradiente de pH entre o meio intracelular e o meio extracelular (13, 29). Embora os transportadores de ácidos monocarboxílicos 1 (MCT1) e 4 (MCT4) estejam presentes nas membranas das células normais, existe indicação na literatura do aumento da sua expressão nas células tumorais, devido à maior produção de lactato e do seu consequente efluxo pela célula, estando o aumento da sua expressão relacionado com uma maior agressividade do tumor (39, 40). No entanto, estes transportadores podem apresentar-se também como o "calcanhar de Aquiles" das células tumorais, pois alguns estudos indicam que poderão estar envolvidos no transporte de compostos antitumorais para o interior das células, como é o caso do 3-bromopiruvato (3-BP) (57). Este é um composto que inibe a proliferação das células tumorais, impedindo a produção de ATP celular, tanto ao nível da glicólise, como também da fosforilação oxidativa (56). Assim, o nível de expressão e atividade dos MCTs, será determinante na ação e toxicidade do 3-BP. Ao longo do tempo foram observadas algumas condições que levam a alterações na atividade destes transportadores, nomeadamente a presença dos polimorfismos T1470A (presente no gene MCT1) e C44T (presente no gene MCT4). O polimorfismo T1470A leva a uma diminuição da atividade do MCT1 e o polimorfismo C44T leva a uma potencial diminuição da atividade do MCT4 (32, 37). Neste trabalho pretendeu-se avaliar o efeito citotóxico do 3-BP num painel alargado de linhas celulares tumorais e tentar correlacionar esse efeito com a expressão e atividade dos MCTs, assim como com a presença dos polimorfismos anteriormente referidos.

Vários trabalhos têm descrito o efeito do 3-BP, centrando-se porém na sua maioria, num tipo específico de cancro. Neste trabalho foi analisado o efeito citotóxico do 3-BP num painel alargado de linhas tumorais, representativo de vários tipos de cancro, incluindo

de cancro oral, sobre o qual não havia ainda estudos relativos ao 3-BP. A análise efetuada permitiu verificar uma diferente sensibilidade ao composto nas diversas linhas estudadas. As linhas tumorais que revelaram maior sensibilidade ao composto foram as HCT-15 de adenocarcinoma colorretal e HeLa de adenocarcinoma cervical. Pelo contrário, as linhas tumorais mais resistentes ao 3-BP foram as SCC09 e SCC25 de carcinoma da cavidade oral, sendo que em ambas foi impossível determinar o valor exato de  $IC_{50}$ , devendo este ser superior à concentração máxima testada. Para além destas, também as linhas tumorais SK-BR-3 e MDA-MB-231 ambas de adenocarcinoma de mama e HT-29 de adenocarcinoma colorretal apresentaram valores de  $IC_{50}$  superior às restantes linhas em estudo, demonstrando também maior resistência ao 3-BP. Os resultados de viabilidade celular sugerem que as linhas de carcinoma hepatocelular (HepG2 e Hepa1-6), apresentam o mesmo tipo de comportamento celular, quer ao nível do seu metabolismo celular, assim como dos alvos do 3-BP, visto exibirem valores de  $IC_{50}$  muito próximos entre si. Pelo contrário, as linhas tumorais de adenocarcinoma de mama e colorretal apresentaram valores de  $IC_{50}$  muito díspares dentro do mesmo tipo de cancro, podendo apresentar um comportamento distinto dentro do mesmo tipo de adenocarcinoma. Os resultados apontam que, embora seja possível verificar uma resposta ao 3-BP semelhante em algumas linhas isoladas do mesmo tipo de cancro (caso das linhas de cancro hepático ou oral), provavelmente indicando alguns aspetos comuns no metabolismo dessas linhas, esse fenómeno não é generalizado, podendo existir tipos de cancro com resposta muito diferente nas linhas isoladas desse tipo de tumor (caso das linhas de cancro de mama ou colorretal).

Encontra-se descrito que os MCTs estão envolvidos no mecanismo de ação do 3-BP, sendo responsáveis pela captação do composto para o interior das células tumorais (57). Todas as linhas em análise apresentaram expressão dos transportadores MCT1 e MCT4, à exceção da linha tumoral MDA-MB-231 que não exibiu expressão de MCT1 (devido a uma metilação no promotor do gene MCT1). Os níveis de expressão da proteína MCT1 mostraram ser significativos em todas as linhas tumorais, principalmente nas linhas de carcinoma da cavidade oral e de carcinoma hepatocelular. A linha U87MG de glioblastoma revelou níveis de expressão mais reduzidos tanto ao nível do MCT1, como do MCT4. A expressão de MCT1 e MCT4 ao nível da membrana plasmática pode estar associada ao efeito citotóxico do 3-BP em diferentes tipos de linhas tumorais (33, 76, 85). Porém, as linhas tumorais SCC09 e SCC25, SK-BR-3 e HT-29 que apresentaram

elevada resistência ao 3-BP, revelaram níveis de expressão significativos de MCT1 e MCT4, uma vez que as linhas tumorais que demonstraram ser as mais sensíveis ao efeito do 3-BP, nomeadamente HCT-15 e HeLa, revelaram níveis de expressão mais baixos ao nível do MCT1 e do MCT4. Deste modo, perante a análise dos níveis de expressão dos MCTs, não podemos afirmar que existe uma associação direta entre os níveis de expressão das proteínas e o efeito citotóxico do 3-BP. No entanto, é de salientar que esta correlação apenas se pode verificar se o MCT1 e MCT4 estiverem localizados na membrana plasmática da célula tumoral e com atividade normal (17). A discrepância observada nos níveis de expressão de MCTs pode ser justificada por uma diferente atividade e/ou expressão das proteínas ao nível da membrana, visto no nosso trabalho não terem sido realizados estudos de localização celular. No entanto, estudos anteriores do nosso grupo de trabalho indicaram que as linhas tumorais SK-BR-3 e MDA-MB-231, que apresentaram maior resistência ao 3-BP, apesar de revelarem níveis de expressão significativos de MCT1 (SK-BR-3) e MCT4 (SK-BR-3 e MDA-MB-231), essa expressão era essencialmente ao nível do citoplasma e não da membrana plasmática, o que pode comprometer a sua atividade de transporte do 3-BP (76). Pelo contrário, a linha tumoral HeLa, de adenocarcinoma cervical que apresentou elevada sensibilidade ao 3-BP e níveis de expressão de MCT1 e MCT4 mais baixos, comparativamente a outras linhas em estudo, apresentava maior expressão destas proteínas ao nível da membrana plasmática. Assim, podemos concluir que a sensibilidade das linhas tumorais ao 3-BP, é dependente da expressão e ainda da localização dos MCTs. A discrepância dos níveis de expressão de MCT1 e MCT4 em relação ao efeito citotóxico do 3-BP, pode assim ser justificada pela localização e atividade dos MCTs na membrana plasmática, sendo que estas dependem da atividade da chaperona CD147 (81). No entanto, neste trabalho não foi avaliada a expressão nem a atividade da CD147 para analisar esse efeito.

Estando o MCT1 e o MCT4, altamente expressos em células tumorais, o estudo dos polimorfismos anteriormente referidos poderá eventualmente ajudar a prever a resposta a tratamentos quimioterápicos, embora após validação em estudos futuros (43, 50). O polimorfismo T1470A, presente no gene MCT1, leva a um decréscimo da atividade da proteína, e, conseqüentemente, à diminuição do transporte do lactato (32, 50). O polimorfismo C44T, presente no gene MCT4, leva a uma potencial diminuição da atividade da proteína, podendo também conduzir a um decréscimo do transporte de

lactato para o microambiente (37). Visto que os MCTs são responsáveis por mediar a entrada do 3-BP nas células tumorais (57), os polimorfismos poderão levar a uma menor atividade do MCT1 e MCT4 para o transporte do composto, conduzindo a uma diminuição da sua ação antitumoral. A linha tumoral SK-BR-3 é homozigota mutante para ambos os polimorfismos, levando a uma diminuição do efluxo de lactato pelos MCT1 e MCT4. Esta linha é uma das linhas tumorais com maior resistência ao 3-BP, que é explicada pela diminuição de atividade dos MCTs, considera-se o seu genótipo concordante com o valor de  $IC_{50}$ . Ao invés, as linhas tumorais HT-29, HCT-15 e SCC25 apresentam genótipo de homozigotia normal para ambos os polimorfismos. As linhas HT-29 e SCC25 apresentaram elevada resistência ao 3-BP, no entanto, dados obtidos através de *Western-blot* revelaram elevada expressão de MCTs, estando de acordo com o genótipo de homozigotia normal. A elevada resistência ao 3-BP pode ser explicada pela disfunção da chaperona CD147, visto comprometer a localização e consequente efluxo de 3-BP pelos MCTs. O genótipo da linha HCT-15 está relacionado com uma maior sensibilidade ao 3-BP, visto as proteínas MCT1 e MCT4 mostrarem atividade normal. As restantes linhas tumorais apresentam genótipos que divergem de acordo com o polimorfismo em causa. A linha tumoral Hepa 1-6 apresenta genótipo homozigota mutante para o polimorfismo T1470A, já a linha SCC09 apresenta homozigotia normal, ambos não concordantes com o seu valor de  $IC_{50}$ . As linhas tumorais MDA-MB-231, ZR-75-1, SK-BR-3, HeLa, U373MG, U87MG, Caco-2 e SCC09 apresentaram genótipo homozigota mutante para o polimorfismo C44T, porém as linhas MCF-7 e HepG2 revelaram homozigotia normal, concordante com os valores de  $IC_{50}$ . A genotipagem dos polimorfismos T1470A e C44T não permitiu correlacionar de forma conclusiva o efeito dos polimorfismos, a expressão dos MCT1 e MCT4 e o efeito citotóxico do 3-BP nas células tumorais. A ausência de correlação pode ser justificada pelo facto dos polimorfismos não afetarem a expressão do transportador, mas apenas a atividade das proteínas. Pode ainda ocorrer a expressão alterada das proteínas alvo do 3-BP, nomeadamente da hexocinase II (HK II), bem como a existência de outros transportadores que também são responsáveis pela captação do 3-BP. Da mesma forma, a variabilidade genética pode ser um entrave ao estudo dos polimorfismos, e por forma a estudar a sua influência isoladamente, seria aconselhável realizar uma análise funcional dos polimorfismos.

As células tumorais produzem lactato em concentrações elevadas, sendo os MCTs responsáveis pelo seu transporte para o microambiente tumoral, permitindo a sobrevivência das células (13). Os polimorfismos T1470A e C44T conduzem a uma diminuição do transporte de lactato, sendo a concentração deste ácido monocarboxílico mais reduzida no meio extracelular, comparativamente com células que possuem MCTs normais. A linha tumoral SK-BR-3 apresentou a concentração de lactato extracelular reduzida, facto justificado pela homozigotia mutante para ambos os polimorfismos, que resulta na menor atividade dos transportadores MCT1 e MCT4. Porém, a linha MDA-MB-231 demonstrou maior efluxo de lactato, embora não exiba expressão de MCT1 e indique genótipo mutante para o polimorfismo C44T (MCT4). Isto pode ser explicado pelo seu metabolismo altamente glicolítico, conduzindo a uma elevada produção de lactato e conseqüente exportação do mesmo (84). A linha tumoral U373MG, apresentou níveis reduzidos de lactato extracelular, resultados explicados pela heterozigotia para o polimorfismo T1470A e homozigotia mutante para C44T. As linhas tumorais MCF-7, ZR-75-1, U87MG e U251MG revelaram valores intermédios de lactato extracelular, justificados pela atividade alterada do MCT1 e MCT4. Não foi possível correlacionar a presença dos polimorfismos e a atividade da proteína, determinada neste caso através do efluxo de lactato. A existência de outras moléculas responsáveis pelo efluxo de lactato para além do transportador MCT4, nomeadamente o MCT1, pode justificar os elevados níveis de lactato extracelular, visto que o MCT1 possui uma expressão ubíqua nos tecidos (29). É de salientar que o tipo de metabolismo que a célula apresenta, glicolítico ou oxidativo, pode contribuir para o aumento ou diminuição da quantidade de lactato extracelular.

Perante os objetivos do presente trabalho, podemos concluir que não se observou correlação entre a expressão global dos MCTs, a presença de polimorfismos nos genes destes transportadores e o efeito citotóxico do 3-BP nas células tumorais. No entanto, apesar da ausência de correlação, este trabalho serviu para estudar o efeito citotóxico do 3-BP num painel alargado de linhas celulares tumorais de diversos tipos de cancro. As linhas tumorais SCC09 e SCC25 de carcinoma da cavidade oral revelaram-se como as mais resistentes ao efeito citotóxico do 3-BP. Curiosamente, apresentaram elevada expressão quer do MCT1, quer do MCT4. Pode-se então colocar a questão se estes

transportadores mantêm ou não a sua atividade, ou se as proteínas alvo do 3-BP (por exemplo, a HK II) são expressas de igual forma nestas células. Este trabalho poderá resultar num importante passo a nível terapêutico, sugerindo a utilização do 3-BP em vários tipos de carcinoma, nomeadamente em casos de difícil tratamento, como os glioblastomas, que apresentaram elevada sensibilidade ao fármaco em estudo.

## **CAPÍTULO V**

---

### **PERSPETIVAS FUTURAS**



Neste trabalho, avaliou-se a toxicidade do 3-bromopiruvato (3-BP) em diferentes linhas tumorais e procurou-se correlacionar tal toxicidade com a expressão proteica das isoformas 1 e 4 dos transportadores de ácidos monocarboxílicos (MCT1 e MCT4), uma vez que são estas proteínas o principal mecanismo de entrada do composto nas células. Foi também efetuada a genotipagem dos polimorfismos T1470A e C44T nos genes codificantes do MCT1 e MCT4 respetivamente, nas linhas celulares tumorais estudadas. Procurou-se correlacionar o genótipo obtido com a expressão do respetivo MCT, e ainda com o efeito antiglicolítico do 3-BP nas linhas celulares de diferentes tipos de cancro. Os resultados obtidos no trabalho fizeram surgir algumas questões, que poderão originar novas linhas de trabalho a desenvolver no futuro, de forma a complementar o trabalho efetuado.

Linhas de pesquisas futuras:

- i. Como foi referido na secção anterior, não foi possível estabelecer uma relação direta entre a toxicidade do 3-BP e a expressão dos MCTs. No entanto, tal correlação só se deverá verificar se estas proteínas estiverem localizadas na membrana plasmática da célula tumoral (17). Como neste trabalho não foram realizados estudos de localização celular ao nível dos MCT1 e MCT4, será imprescindível realizá-los no futuro, para averiguar se os MCTs estão localizados na membrana plasmática e/ou num outro local da célula, nas linhas tumorais. A localização celular destas proteínas poderá ser realizada através da técnica de imunocitoquímica ou imunofluorescência, utilizando anticorpos específicos para estas proteínas.
- ii. A correta expressão e atividade do transportador MCT1 e MCT4 na membrana plasmática dependem da atividade da chaperona CD147 (81). Como neste trabalho não foi avaliada a expressão nem a atividade da chaperona, as discrepâncias entre a expressão global de MCTs e o efeito citotóxico do 3-BP nas linhas tumorais pode ser justificada pela disfunção da CD147. Deste modo, seria importante avaliar a expressão, localização e atividade da mesma. Para a avaliação da expressão e localização poderão realizar-se a técnica de *Western-*

- blot* e imunocitoquímica, respetivamente. Verificando a expressão da CD147 nas linhas celulares tumorais em estudo, a utilização de técnicas de silenciamento como RNA de interferência (RNAi) permitiria esclarecer a importância da atividade desta proteína na relocalização dos MCTs na membrana plasmática. Alguns estudos mostram que o silenciamento desta proteína provoca uma acumulação de lactato intracelular e expressão do MCT1 e do MCT4 a nível perinuclear e citoplasmático e não na membrana plasmática, mostrando a relevância da função da CD147 na atividade dos MCTs (81, 86).
- iii. Uma das causas da diferente ação do 3-BP pode ser alterações na expressão da hexocinase II (HK II), uma vez que se trata da principal proteína alvo do 3-BP (67). Seria interessante avaliar a expressão/atividade da HK II (através de ensaios de *Western-blot* e determinação de atividade enzimática, utilizando extratos proteicos das linhas celulares tumorais em estudo), de modo a perceber se a sua função alterada pode levar à diminuição do efeito antitumoral do 3-BP. Se a HK II tiver uma função alterada pode ser essa a causa da discrepância observada entre a expressão dos MCTs e a toxicidade do 3-BP em algumas linhas celulares tumorais (por exemplo, nas linhas de cancro oral).
- iv. As diferentes linhas celulares tumorais estudadas apresentam variabilidade genética, celular e metabólica, podendo dessa forma existir diversos fatores que podem influenciar quer a expressão dos MCTs, quer a sensibilidade ao 3-BP. Assim, no estudo funcional com linhas celulares tumorais torna-se difícil estabelecer uma relação direta entre o genótipo dos MCTs, a sua expressão e a citotoxicidade do 3-BP, devido à possível existência de múltiplos fatores que possam influenciar tal expressão e toxicidade. Por exemplo, além dos polimorfismos em estudo, podem existir outros polimorfismos nos genes em análise, que podem também afetar a expressão/atividade dos MCTs. A toxicidade do 3-BP nas células em questão pode também depender da expressão de outras proteínas transportadoras responsáveis pela sua entrada na célula, como pode ser o caso dos transportadores de sódio acoplado a ácidos monocarboxílicos (SMCTs) ou do MCT2. Por outro lado, a atividade da chaperona CD147, pode influenciar a expressão e atividade quer do MCT1, quer do MCT4 e assim alterar o influxo do 3-BP pelos MCTs. Deste modo, para

eliminar quaisquer dúvidas na influência externa no estudo dos polimorfismos específicos, seria preferível construir um sistema de expressão heteróloga, como por exemplo a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A análise funcional dos polimorfismos T1470A e C44T presentes nos genes MCT1 e MCT4 respetivamente, por expressão heteróloga em *Saccharomyces cerevisiae*, poderia representar uma forma de estudar os polimorfismos isoladamente. Para a análise funcional seria necessário realizar a expressão heteróloga do DNA complementar (DNAc) dos MCT1 e MCT4 na presença e na ausência dos polimorfismos T1470A e C44T respetivamente, numa estirpe de *Saccharomyces cerevisiae* com deficiência no transporte de lactato endógeno (mutada no gene codificante do transportador de lactato Jen1) (87, 88). No entanto, tendo em conta que estas proteínas poderiam eventualmente não ser funcionais neste tipo de organismo, também seria vantajoso a utilização de linhas tumorais, para a análise funcional dos polimorfismos T1470A e C44T. Para essa análise seria necessário uma linha tumoral sem expressão da proteína MCT1, para avaliação de polimorfismos no gene MCT1 por exemplo a linha MDA-MB-231 (apresenta uma metilação no promotor do gene MCT1, bloqueando os seus níveis de expressão (79, 80)) e uma linha tumoral que não apresentasse expressão da proteína MCT4, para avaliação de polimorfismos no gene MCT4.

- v. A realização de um estudo populacional com amostras de cancro *versus* amostras saudáveis seria interessante para averiguar se a frequência dos génotipos para os polimorfismos presentes nos genes MCTs se encontra alterada. Para a realização deste estudo, poderia ser necessário aumentar o número de linhas tumorais para o grupo de amostras de cancro, ou então, caso fosse possível, utilizar amostras clínicas (tecidos). No caso de ser possível trabalhar com amostras histológicas de doentes oncológicos, teria de se proceder à sua genotipagem, e posteriormente comparar com uma população controlo saudável. Poder-se-ia ainda realizar um estudo estatístico no caso dos pacientes para se analisar a influência do polimorfismo na agressividade do tumor e na resposta ao tratamento.
- vi. A genotipagem de outros polimorfismos presentes nos genes MCT1 e MCT4 que possam levar à alteração da expressão/atividade da respetiva proteína, seria igualmente sugestiva, de forma a verificar se poderiam estar relacionadas com o

não estabelecimento direto entre os genótipos referentes aos polimorfismos estudados neste trabalho e a expressão dos MCT1/4. Está descrito que as variantes -363-100C>G e -363-855T>C podem afetar a regulação da transcrição de MCT1, sendo importante completar esta informação com um ensaio funcional (32). Na literatura, foram identificadas variações genéticas presentes no gene MCT4, de entre as quais G55A (Gly19Ser), G574A (Val192Met) e G916A (Gly306Ser) colocaram dúvidas aos autores em relação ao seu potencial efeito negativo, sendo importante clarificar o efeito destes polimorfismos através de ensaios *in vitro* (37). Adicionalmente, podia-se estudar polimorfismos em genes que codificam para outros MCTs, nomeadamente o gene que codifica para o MCT2 (50). Está descrito que a variante rs995343/intrão apresentou associações negativas com a sobrevivência global (OS) e o intervalo livre de recidiva (RFS) em doentes com cancro colorretal e do pulmão (43, 50).

- vii. Devido às linhas de carcinoma de cavidade oral apresentarem elevada resistência ao 3-BP (apesar dos níveis de expressão de MCTs serem bastante significativos), podemos colocar a hipótese que este composto não apresenta muita atividade neste tipo de cancro. Assim, sugere-se o estudo com outros agentes antitumorais, de modo a verificar se estas linhas se comportam da mesma forma perante outros compostos, nomeadamente outros agentes antiglicolíticos, como por exemplo o iodoacetato (IAA) ou a 2-deoxiglucose (2-DG). O IAA inibe seletivamente a enzima glicolítica desidrogenase do gliceraldeído-3-fosfato, comprometendo o seu papel no metabolismo glicolítico e a regulação da transcrição. Adicionalmente, impede a ativação das proteínas anti apoptóticas, levando à morte celular (65). A 2-DG compete com a glucose no primeiro passo da glicólise, sendo também fosforilada pela hexocinase II, que converte glucose a glicose-6-fosfato. Assim, a 2-DG é convertida a desoxiglucose-6-fosfato, uma molécula que não pode ser posteriormente metabolizada, bloqueando a glicólise e a via das pentoses fosfato. Esta inibição é responsável pela depleção do ATP celular e consequentemente pela morte das células, nomeadamente das células tumorais em hipóxia (89). O estudo destes compostos permitirá avaliar a sua atividade e toxicidade nas linhas tumorais em estudo, principalmente naquelas em que o 3-BP mostrou um reduzido efeito citotóxico, e nomeadamente no carcinoma da cavidade oral. Como alguns

estudos efetuados pelo nosso grupo de trabalho sugerem que o IAA utiliza os mesmos transportadores que o 3-BP (sendo ambos os compostos halo-derivados de substratos naturais dos MCTs), será particularmente interessante realizar os estudos de toxicidade com este composto.



## **CAPÍTULO VI**

---

## **BIBLIOGRAFIA**



1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2010;127(12):2893-917.
2. Oncológicas PNpaD, Miranda N, Portugal C. PORTUGAL - Doenças Oncológicas em números – 20142014.
3. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
4. Seyfried TN, Shelton LM. Cancer as a metabolic disease. *Nutrition & metabolism*. 2010;7:7.
5. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
6. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009;324(5930):1029-33.
7. Cardaci S, Desideri E, Ciriolo MR. Targeting aerobic glycolysis: 3-bromopyruvate as a promising anticancer drug. *Journal of bioenergetics and biomembranes*. 2012;44(1):17-29.
8. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science*. 1956;123(3191):309-14.
9. Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nature reviews Cancer*. 2004;4(11):891-9.
10. Sciacovelli M, Gaude E, Hilvo M, Frezza C. The metabolic alterations of cancer cells. *Methods in enzymology*. 2014;542:1-23.
11. Neri D, Supuran CT. Interfering with pH regulation in tumours as a therapeutic strategy. *Nature reviews Drug discovery*. 2011;10(10):767-77.
12. Pedersen PL. Warburg, me and Hexokinase 2: Multiple discoveries of key molecular events underlying one of cancers' most common phenotypes, the "Warburg Effect", i.e., elevated glycolysis in the presence of oxygen. *Journal of bioenergetics and biomembranes*. 2007;39(3):211-22.
13. Ngo H, Tortorella SM, Ververis K, Karagiannis TC. The Warburg effect: molecular aspects and therapeutic possibilities. *Molecular biology reports*. 2015;42(4):825-34.
14. Amoedo ND, Valencia JP, Rodrigues MF, Galina A, Rumjanek FD. How does the metabolism of tumour cells differ from that of normal cells. *Bioscience reports*. 2013;33(6).
15. Curthoys NP, Watford M. Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism. *Annual review of nutrition*. 1995;15:133-59.
16. Mathupala SP, Ko YH, Pedersen PL. The pivotal roles of mitochondria in cancer: Warburg and beyond and encouraging prospects for effective therapies. *Biochimica et biophysica acta*. 2010;1797(6-7):1225-30.
17. Spugnini EP, Sonveaux P, Stock C, Perez-Sayans M, De Milito A, Avnet S, et al. Proton channels and exchangers in cancer. *Biochimica et biophysica acta*. 2015;1848(10 Pt B):2715-26.
18. Han T, Kang D, Ji D, Wang X, Zhan W, Fu M, et al. How does cancer cell metabolism affect tumor migration and invasion? *Cell adhesion & migration*. 2013;7(5):395-403.
19. Izumi H, Torigoe T, Ishiguchi H, Uramoto H, Yoshida Y, Tanabe M, et al. Cellular pH regulators: potentially promising molecular targets for cancer chemotherapy. *Cancer treatment reviews*. 2003;29(6):541-9.
20. Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer cell*. 2008;13(6):472-82.

21. Jang M, Kim SS, Lee J. Cancer cell metabolism: implications for therapeutic targets. *Experimental & molecular medicine*. 2013;45:e45.
22. Porporato PE, Dhup S, Dadhich RK, Copetti T, Sonveaux P. Anticancer targets in the glycolytic metabolism of tumors: a comprehensive review. *Frontiers in pharmacology*. 2011;2:49.
23. Macheda ML, Rogers S, Best JD. Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *Journal of cellular physiology*. 2005;202(3):654-62.
24. Boado RJ, Black KL, Pardridge WM. Gene expression of GLUT3 and GLUT1 glucose transporters in human brain tumors. *Brain research Molecular brain research*. 1994;27(1):51-7.
25. Starska K, Forma E, Jozwiak P, Brys M, Lewy-Trenda I, Brzezinska-Blaszczyk E, et al. Gene and protein expression of glucose transporter 1 and glucose transporter 3 in human laryngeal cancer-the relationship with regulatory hypoxia-inducible factor-1alpha expression, tumor invasiveness, and patient prognosis. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2015;36(4):2309-21.
26. Sonveaux P, Vegran F, Schroeder T, Wergin MC, Verrax J, Rabbani ZN, et al. Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(12):3930-42.
27. Webb BA, Chimenti M, Jacobson MP, Barber DL. Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression. *Nature reviews Cancer*. 2011;11(9):671-7.
28. Halestrap AP, Price NT. The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *The Biochemical journal*. 1999;343 Pt 2:281-99.
29. Morris ME, Felmler MA. Overview of the proton-coupled MCT (SLC16A) family of transporters: characterization, function and role in the transport of the drug of abuse gamma-hydroxybutyric acid. *The AAPS journal*. 2008;10(2):311-21.
30. Halestrap AP. The monocarboxylate transporter family--Structure and functional characterization. *IUBMB life*. 2012;64(1):1-9.
31. Halestrap AP. The SLC16 gene family - structure, role and regulation in health and disease. *Molecular aspects of medicine*. 2013;34(2-3):337-49.
32. Lean CB, Lee EJ. Genetic variations in the MCT1 (SLC16A1) gene in the Chinese population of Singapore. *Drug metabolism and pharmacokinetics*. 2009;24(5):469-74.
33. Baltazar F, Pinheiro C, Morais-Santos F, Azevedo-Silva J, Queiros O, Preto A, et al. Monocarboxylate transporters as targets and mediators in cancer therapy response. *Histology and histopathology*. 2014;29(12):1511-24.
34. Enerson BE, Drewes LR. Molecular features, regulation, and function of monocarboxylate transporters: implications for drug delivery. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2003;92(8):1531-44.
35. Halestrap AP, Wilson MC. The monocarboxylate transporter family--role and regulation. *IUBMB life*. 2012;64(2):109-19.
36. Vijay N, Morris ME. Role of monocarboxylate transporters in drug delivery to the brain. *Current pharmaceutical design*. 2014;20(10):1487-98.
37. Lean CB, Lee EJ. Genetic variations of the MCT4 (SLC16A3) gene in the Chinese and Indian populations of Singapore. *Drug metabolism and pharmacokinetics*. 2012;27(4):456-64.
38. Dimmer KS, Friedrich B, Lang F, Deitmer JW, Broer S. The low-affinity monocarboxylate transporter MCT4 is adapted to the export of lactate in highly glycolytic cells. *The Biochemical journal*. 2000;350 Pt 1:219-27.

39. Ladanyi M, Antonescu CR, Drobnjak M, Baren A, Lui MY, Golde DW, et al. The precrystalline cytoplasmic granules of alveolar soft part sarcoma contain monocarboxylate transporter 1 and CD147. *The American journal of pathology*. 2002;160(4):1215-21.
40. Pinheiro C, Longatto-Filho A, Ferreira L, Pereira SM, Etlinger D, Moreira MA, et al. Increasing expression of monocarboxylate transporters 1 and 4 along progression to invasive cervical carcinoma. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists*. 2008;27(4):568-74.
41. Semenza GL. Tumor metabolism: cancer cells give and take lactate. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(12):3835-7.
42. Slomiany MG, Grass GD, Robertson AD, Yang XY, Maria BL, Beeson C, et al. Hyaluronan, CD44, and emmprin regulate lactate efflux and membrane localization of monocarboxylate transporters in human breast carcinoma cells. *Cancer research*. 2009;69(4):1293-301.
43. Fei F, Guo X, Chen Y, Liu X, Tu J, Xing J, et al. Polymorphisms of monocarboxylate transporter genes are associated with clinical outcomes in patients with colorectal cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2015;141(6):1095-102.
44. Merezhinskaya N, Fishbein WN, Davis JI, Foellmer JW. Mutations in MCT1 cDNA in patients with symptomatic deficiency in lactate transport. *Muscle & nerve*. 2000;23(1):90-7.
45. Pertega-Gomes N, Vizcaino JR, Miranda-Goncalves V, Pinheiro C, Silva J, Pereira H, et al. Monocarboxylate transporter 4 (MCT4) and CD147 overexpression is associated with poor prognosis in prostate cancer. *BMC cancer*. 2011;11:312.
46. Cupeiro R, Benito PJ, Maffulli N, Calderon FJ, Gonzalez-Lamuno D. MCT1 genetic polymorphism influence in high intensity circuit training: a pilot study. *Journal of science and medicine in sport / Sports Medicine Australia*. 2010;13(5):526-30.
47. Fedotovskaya ON, Mustafina LJ, Popov DV, Vinogradova OL, Ahmetov, II. A common polymorphism of the MCT1 gene and athletic performance. *International journal of sports physiology and performance*. 2014;9(1):173-80.
48. Massidda M, Eynon N, Bachis V, Corrias L, Culigioni C, Piras F, et al. Influence of the MCT1 rs1049434 on Indirect Muscle Disorders/Injuries in Elite Football Players. *Sports medicine - open*. 2015;1(1):33.
49. Prieto RP. Aclaramiento del lactato durante la recuperación activa y passiva. Papel del transportador de lactato MCT1 Universidad de Cantabria 2014.
50. Guo X, Chen C, Liu B, Wu Y, Chen Y, Zhou X, et al. Genetic variations in monocarboxylate transporter genes as predictors of clinical outcomes in non-small cell lung cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2015;36(5):3931-9.
51. Chen L, Cui H. Targeting Glutamine Induces Apoptosis: A Cancer Therapy Approach. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(9):22830-55.
52. Dhup S, Dadhich RK, Porporato PE, Sonveaux P. Multiple biological activities of lactic acid in cancer: influences on tumor growth, angiogenesis and metastasis. *Current pharmaceutical design*. 2012;18(10):1319-30.
53. Galluzzi L, Kepp O, Vander Heiden MG, Kroemer G. Metabolic targets for cancer therapy. *Nature reviews Drug discovery*. 2013;12(11):829-46.
54. Moestue SA, Engebraaten O, Gribbestad IS. Metabolic effects of signal transduction inhibition in cancer assessed by magnetic resonance spectroscopy. *Molecular oncology*. 2011;5(3):224-41.

55. Pertega-Gomes N, Baltazar F. Lactate transporters in the context of prostate cancer metabolism: what do we know? *International journal of molecular sciences*. 2014;15(10):18333-48.
56. Xian SL, Cao W, Zhang XD, Lu YF. 3-Bromopyruvate inhibits human gastric cancer tumor growth in nude mice via the inhibition of glycolysis. *Oncology letters*. 2015;9(2):739-44.
57. Ganapathy-Kanniappan S, Kunjithapatham R, Geschwind JF. Anticancer efficacy of the metabolic blocker 3-bromopyruvate: specific molecular targeting. *Anticancer research*. 2013;33(1):13-20.
58. Wang Q, Morris ME. Flavonoids modulate monocarboxylate transporter-1-mediated transport of gamma-hydroxybutyrate in vitro and in vivo. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2007;35(2):201-8.
59. Floridi A, Paggi MG, Marcante ML, Silvestrini B, Caputo A, De Martino C. Lonidamine, a selective inhibitor of aerobic glycolysis of murine tumor cells. *Journal of the National Cancer Institute*. 1981;66(3):497-9.
60. Ko YH, Pedersen PL, Geschwind JF. Glucose catabolism in the rabbit VX2 tumor model for liver cancer: characterization and targeting hexokinase. *Cancer letters*. 2001;173(1):83-91.
61. Ko YH, Coelho RF, Chauhan S, Sivaraman A, Schatloff O, Cheon J, et al. Factors affecting return of continence 3 months after robot-assisted radical prostatectomy: analysis from a large, prospective data by a single surgeon. *The Journal of urology*. 2012;187(1):190-4.
62. Tang Z, Yuan S, Hu Y, Zhang H, Wu W, Zeng Z, et al. Over-expression of GAPDH in human colorectal carcinoma as a preferred target of 3-bromopyruvate propyl ester. *Journal of bioenergetics and biomembranes*. 2012;44(1):117-25.
63. Ko YH, Verhoeven HA, Lee MJ, Corbin DJ, Vogl TJ, Pedersen PL. A translational study "case report" on the small molecule "energy blocker" 3-bromopyruvate (3BP) as a potent anticancer agent: from bench side to bedside. *Journal of bioenergetics and biomembranes*. 2012;44(1):163-70.
64. Davidescu M, Sciacaluga M, Macchioni L, Angelini R, Lopalco P, Rambotti MG, et al. Bromopyruvate mediates autophagy and cardiolipin degradation to monolyso-cardiolipin in GL15 glioblastoma cells. *Journal of bioenergetics and biomembranes*. 2012;44(1):51-60.
65. Bhardwaj V, Rizvi N, Lai MB, Lai JC, Bhushan A. Glycolytic enzyme inhibitors affect pancreatic cancer survival by modulating its signaling and energetics. *Anticancer research*. 2010;30(3):743-9.
66. El Sayed SM, El-Magd RM, Shishido Y, Chung SP, Diem TH, Sakai T, et al. 3-Bromopyruvate antagonizes effects of lactate and pyruvate, synergizes with citrate and exerts novel anti-glioma effects. *Journal of bioenergetics and biomembranes*. 2012;44(1):61-79.
67. Shoshan MC. 3-Bromopyruvate: targets and outcomes. *Journal of bioenergetics and biomembranes*. 2012;44(1):7-15.
68. Geschwind JF, Georgiades CS, Ko YH, Pedersen PL. Recently elucidated energy catabolism pathways provide opportunities for novel treatments in hepatocellular carcinoma. *Expert review of anticancer therapy*. 2004;4(3):449-57.
69. Ganapathy-Kanniappan S, Geschwind JF, Kunjithapatham R, Buijs M, Vossen JA, Tchernyshyov I, et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is pyruvylated during 3-bromopyruvate mediated cancer cell death. *Anticancer research*. 2009;29(12):4909-18.

70. Geschwind JF, Ko YH, Torbenson MS, Magee C, Pedersen PL. Novel therapy for liver cancer: direct intraarterial injection of a potent inhibitor of ATP production. *Cancer research*. 2002;62(14):3909-13.
71. Chen Z, Zhang H, Lu W, Huang P. Role of mitochondria-associated hexokinase II in cancer cell death induced by 3-bromopyruvate. *Biochimica et biophysica acta*. 2009;1787(5):553-60.
72. Sun Y, Liu Z, Zou X, Lan Y, Sun X, Wang X, et al. Mechanisms underlying 3-bromopyruvate-induced cell death in colon cancer. *Journal of bioenergetics and biomembranes*. 2015;47(4):319-29.
73. Xu RH, Pelicano H, Zhou Y, Carew JS, Feng L, Bhalla KN, et al. Inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia. *Cancer research*. 2005;65(2):613-21.
74. Vander Heiden MG. Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. *Nature reviews Drug discovery*. 2011;10(9):671-84.
75. Gan L, Xiu R, Ren P, Yue M, Su H, Guo G, et al. Metabolic targeting of oncogene MYC by selective activation of the proton-coupled monocarboxylate family of transporters. *Oncogene*. 2015.
76. Queiros O, Preto A, Pacheco A, Pinheiro C, Azevedo-Silva J, Moreira R, et al. Butyrate activates the monocarboxylate transporter MCT4 expression in breast cancer cells and enhances the antitumor activity of 3-bromopyruvate. *Journal of bioenergetics and biomembranes*. 2012;44(1):141-53.
77. Wang H, Cheng H, Wang F, Wei D, Wang X. An improved 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) reduction assay for evaluating the viability of *Escherichia coli* cells. *Journal of microbiological methods*. 2010;82(3):330-3.
78. Zhao S, Zhang Y, Wu C, Li H, Jiang C, Jiang Z, et al. [3-bromopyruvate enhances cisplatin sensitivity of hepatocellular carcinoma cells in vitro]. *Nan fang yi ke da xue xue bao = Journal of Southern Medical University*. 2014;34(1):25-30.
79. Asada K, Miyamoto K, Fukutomi T, Tsuda H, Yagi Y, Wakazono K, et al. Reduced expression of GNA11 and silencing of MCT1 in human breast cancers. *Oncology*. 2003;64(4):380-8.
80. Liu Z, Sun Y, Hong H, Zhao S, Zou X, Ma R, et al. 3-bromopyruvate enhanced daunorubicin-induced cytotoxicity involved in monocarboxylate transporter 1 in breast cancer cells. *American journal of cancer research*. 2015;5(9):2673-85.
81. Kirk P, Wilson MC, Heddle C, Brown MH, Barclay AN, Halestrap AP. CD147 is tightly associated with lactate transporters MCT1 and MCT4 and facilitates their cell surface expression. *The EMBO journal*. 2000;19(15):3896-904.
82. Xu T, Zhou M, Peng L, Kong S, Miao R, Shi Y, et al. Upregulation of CD147 promotes cell invasion, epithelial-to-mesenchymal transition and activates MAPK/ERK signaling pathway in colorectal cancer. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2014;7(11):7432-41.
83. Thangaraju M, Karunakaran SK, Itagaki S, Gopal E, Elangovan S, Prasad PD, et al. Transport by SLC5A8 with subsequent inhibition of histone deacetylase 1 (HDAC1) and HDAC3 underlies the antitumor activity of 3-bromopyruvate. *Cancer*. 2009;115(20):4655-66.
84. Gallagher SM, Castorino JJ, Wang D, Philp NJ. Monocarboxylate transporter 4 regulates maturation and trafficking of CD147 to the plasma membrane in the metastatic breast cancer cell line MDA-MB-231. *Cancer research*. 2007;67(9):4182-9.
85. Pinheiro C, Penna V, Morais-Santos F, Abrahao-Machado LF, Ribeiro G, Curcelli EC, et al. Characterization of monocarboxylate transporters (MCTs) expression

- in soft tissue sarcomas: distinct prognostic impact of MCT1 sub-cellular localization. *Journal of translational medicine*. 2014;12:118.
86. Schneiderhan W, Scheler M, Holzmann KH, Marx M, Gschwend JE, Bucholz M, et al. CD147 silencing inhibits lactate transport and reduces malignant potential of pancreatic cancer cells in in vivo and in vitro models. *Gut*. 2009;58(10):1391-8.
87. Makuc J, Cappellaro C, Boles E. Co-expression of a mammalian accessory trafficking protein enables functional expression of the rat MCT1 monocarboxylate transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast research*. 2004;4(8):795-801.
88. Pereira NMV. *The Transport of Carboxylic Acids in Yeasts: from physiology towards structural-functional characterization of permeases*. Universidade do Minho; 2010.
89. Cheng G, Zielonka J, Dranka BP, McAllister D, Mackinnon AC, Jr., Joseph J, et al. Mitochondria-targeted drugs synergize with 2-deoxyglucose to trigger breast cancer cell death. *Cancer research*. 2012;72(10):2634-44.