

António Augusto Vieira Pacheco

**Avaliação da atividade antitumoral do 3-  
bromopiruvato. Papel dos transportadores  
de monocarboxilatos (MCTs) no seu  
mecanismo de ação**

Dissertação apresentada no Instituto Superior de  
Ciências da Saúde – Norte para a obtenção do  
Grau de Mestre em Terapias Moleculares

**Orientação:**

Professora Doutora Odília Marques de Queirós  
Instituto Superior de Ciências da Saúde – Norte  
Departamento de Ciências/ Centro de Investigação em  
Ciências da Saúde

Professora Doutora Margarida Casal  
Universidade do Minho  
Departamento Biologia/ Centro de Biologia Molecular e  
Ambiental

Abril de 2012



---

## Agradecimientos



## Agradecimentos

Ao longo deste percurso, tive o prazer de contar com o apoio de inúmeras pessoas, que me ajudaram a ultrapassar as dificuldades e a viver as alegrias. Gostaria de manifestar o meu sincero agradecimento a todos aqueles que de uma forma direta ou indireta, me ajudaram a alcançar mais um dos meus objetivos de vida.

Em primeiro lugar, quero agradecer à Professora Doutora Odília Queirós, pela infinita paciência e disponibilidade para orientar este trabalho. Pelo incentivo, pela confiança e pela amizade que sempre esteve presente não só na realização deste projeto, mas também durante todo o curso. Quero agradecer ainda a forma cuidada e crítica na correção desta dissertação. O meu mais sincero obrigado por tudo.

À Professora Doutora Margarida Casal, agradeço pela coordenação científica do projeto, pela constante disponibilidade e dedicação ao longo de todo o trabalho. Muito obrigado.

À Professora Doutora Roxana Moreira, pela excelente coordenação deste Mestrado e por todos cuidados revelados e apoio dado ao longo de todo o Mestrado.

À Professora Doutora Fátima Baltazar e à Doutora Céline Pinheiro, pela constante disponibilidade mostrada sempre que precisei de me deslocar a Braga para fazer investigação complementar a esta dissertação. Obrigado.

À Professora Doutora Madalena Pedro, pela dedicação e pela disponibilidade em todos os momentos do trabalho, pela leitura e crítica desta dissertação. Obrigado.

À Dra. Maria José, pelo carinho e pelo conforto, pelas boas palavras que é sempre bom ouvir em todos os momentos. Obrigado.

A todos os Professores, investigadores e funcionários do Departamento de Ciências, um muito obrigado em especial à Paula e à D. Margarida e ao Sr. João pela pronta

disponibilidade em qualquer situação. Agradeço também à Diana Valente pela ajuda na realização de trabalho laboratorial, quando eu estava ausente. Obrigado.

A todos os elementos do CICS, em particular à Rita e à Patrícia a toda a disponibilidade ao longo deste trabalho. Obrigado.

À Marina, pela amizade, pelo companheirismo e pela força que sempre me deu nos melhores e piores momentos deste percurso. Obrigado por tudo.

Por último, mas nem por isso menos importante, agradeço a minha Família, especialmente pais e irmãos, pelo amor e apoio que sempre demonstraram para que pudesse alcançar mais este objetivo da minha vida. A eles dedico este trabalho. Muito Obrigado por tudo.

---

## **Resumo/ Abstract**



## Resumo

Os tumores malignos são caracterizados por, muitas das vezes, apresentarem o “efeito de Warburg”, que consiste na elevada atividade glicolítica com produção de lactato, mesmo na presença de oxigênio. Os transportadores de monocarboxilatos (MCTs), são responsáveis por mediar o efluxo de lactato, produzido em grande quantidade pelas células tumorais, através da membrana plasmática. O 3-bromopiruvato (3-BP), um halo-derivado do piruvato e análogo do lactato, é um agente alquilante inibidor do metabolismo energético, que tem vindo a demonstrar elevada eficácia antitumoral em estudos quer *in vitro* quer *in vivo* [1, 2]. No presente trabalho de tese, teve-se como objetivo determinar o efeito do 3-BP em três linhas celulares de cancro de mama (ZR-75-1 RE<sup>+</sup>, MCF-7 RE<sup>+</sup> e SK-BR-3 RE<sup>-</sup>) e avaliar o papel dos MCTs no seu efeito citotóxico. As três linhas celulares em estudo apresentaram diferentes sensibilidades para o 3-BP: ZR-75-1 > MCF-7 > SK-BR-3. Nestas linhas celulares, o 3-BP reduziu a produção de lactato, induziu alterações na morfologia da célula e aumentou a apoptose. O efeito do 3-BP parece ser citotóxico e não citostático e irreversível, uma vez que ocorreu uma diminuição da viabilidade celular, mesmo após a remoção de 3-BP e incubação em novo meio. Foi avaliada a expressão de diversas proteínas, possivelmente envolvidas na ação do 3-BP, nomeadamente hexocinase II – HK II (enzima alvo do 3-BP), MCT1, MCT2, MCT4 (possíveis mecanismos de entrada do 3-BP), CD147 (proteína chaperona do MCT1 e MCT4) e glicoproteína P - Pgp (envolvida na resistência a múltiplos fármacos). Relativamente à Pgp e HK II, não foi observada correlação entre a sua expressão e a sensibilidade das linhas ao 3-BP. No entanto, a linha ZR-75-1, mais sensível ao 3-BP, apresentou uma maior expressão das proteínas CD147 e MCT4, ao passo que a linha mais resistente SK-BR-3 apresentou uma menor expressão de MCT1 na membrana plasmática. Quanto ao MCT2, não foi detetada a sua expressão em nenhuma das linhas em estudo. O tratamento das células com 3-BP não levou a alterações significativas da expressão das proteínas em estudo.

Sendo o 3-BP um derivado de ácidos carboxílicos, foi também estudada a ação de ácidos carboxílicos substratos dos MCTs, na sua citotoxicidade. Verificou-se que a pré-incubação com butirato, mas não com lactato, piruvato ou acetato, aumentou significativamente a citotoxicidade provocada pelo 3-BP, especialmente na linha

celular mais resistente, SK-BR-3. Adicionalmente, verificou-se nesta linha celular que o pré-tratamento com butirato induziu o direcionamento do MCT1 para a membrana plasmática e levou a um aumento da expressão global do MCT4 e da sua proteína chaperona CD147. Por outro lado, o tratamento com lactato não levou a qualquer tipo de alteração na expressão destas proteínas nas condições estudadas. Paralelamente, foi efetuado um ensaio em que se procedeu à incubação das linhas celulares com 3-BP e ácidos carboxílicos (butirato ou lactato), mas em simultâneo. Assim, enquanto este tratamento com butirato e 3-BP levou a uma diminuição da citotoxicidade deste último, o lactato não conduziu a qualquer tipo de alteração. A expressão de MCT 1 e 4, e particularmente de CD147, diminuiu em células tratadas com butirato e 3-BP relativamente às células tratadas apenas com butirato, atingindo níveis semelhantes ou ligeiramente inferiores aos da expressão basal. Nas células tratadas com lactato e 3-BP não foi observada esta alteração.

Assim, na sua globalidade os resultados indicam que os MCTs deverão estar envolvidos na ação do 3-BP, possivelmente mediando a sua entrada para célula. O pré-tratamento com butirato, mas não o tratamento em simultâneo, potencia o efeito do 3-BP, provavelmente aumentando as taxas de transporte do 3-BP através de MCT1 / 4. Este estudo aponta para o potencial uso do butirato como coadjuvante do 3-BP, quando o tratamento é realizado previamente, nomeadamente em células de cancro de mama resistentes à ação do 3-BP e particularmente em células também resistentes à hormonoterapia, ou seja, RE<sup>r</sup>.

Relativamente ao efeito do 3-BP em células não tumorais, verificou-se que a linha de fibroblastos CCD-1090Sk apresentava uma elevada resistência ao composto, ao contrário do que aconteceu com a linha de mioblastos L6 de rato. Estes estudos precisam de ser aprofundados a fim de verificar a influência que os MCTs apresentam no efeito do 3-BP, não só em células tumorais, como também em células saudáveis.

**Palavras chave:** Cancro, efeito de Warburg, 3-bromopiruvato, monocarboxilatos, transportadores de monocarboxilatos.

## Abstract

Most malignant tumors exhibit the “Warburg effect”, consisting in increased glycolysis rates and lactate production, even in the presence of oxygen. Monocarboxylate transporters (MCTs) are responsible for mediating lactate efflux, which is produced in large quantities by tumor cells, through the plasma membrane. 3-bromopyruvate (3-BP), an halo-pyruvate derived and lactate analogue, is an alkylating agent inhibitor of energetic metabolism, which has been shown to have a high anti-tumor efficiency, both *in vitro* and *in vivo* [1, 2]. In the present study, we aimed at determining the effect of 3-BP in three breast cancer cell lines (ZR-75-1 ER<sup>+</sup>, MCF-7 ER<sup>+</sup> and SK-BR-3 ER<sup>-</sup>) and evaluated the putative role of MCTs on its cytotoxic effect. The three cell lines showed different sensitivities for 3-BP: ZR-75-1 > MCF-7 > SK-BR-3. In these cell lines, the 3-BP reduced the lactate production, induced cell morphological alterations and increased apoptosis. The effect of 3-BP appears to be cytotoxic rather than cytostatic, and irreversible, since there was a decrease in cell viability even after removal of 3-BP and incubation in drug-free fresh medium. We evaluated the expression of several proteins, possibly involved in 3-BP mechanism of action, such as hexokinase II - HK II (3-BP target), MCT1, MCT2 and MCT4 (possible gateways for 3-BP), CD147 (MCT1 and MCT4 chaperone protein) and glycoprotein-P – Pgp (involved in the multidrug resistance phenotype). For Pgp and HK II, no correlation was observed between their expression and 3-BP sensitivity of the cells. However, the cell line ZR-75-1, the most sensitive to 3-BP, presented an increased expression of CD147 and MCT4, while the most resistant cell line SK-BR-3 showed a lower plasma membrane expression of MCT1. Concerning MCT2, no significant expression was detected in any of the cell lines under investigation. 3-BP treatment did not induce significant changes in the expression of these proteins.

Being 3-BP a carboxylate derived, we also aimed at study the effect of carboxylates (MCTs substrates) on its cytotoxicity. Pre-incubation of the cells with butyrate, but not with lactate, pyruvate or acetate, significantly increased 3-BP cytotoxicity, especially in the most resistant cell line, SK-BR-3. Additionally, it was observed in this cell line that butyrate pre-treatment induced localization of MCT1 in the plasma membrane and led to an increased expression of MCT4 and its chaperone CD147.

The lactate pre-treatment did not lead to any change in these proteins expression, under the same conditions. It was further performed an assay, where the cells were also incubated with carboxylates (butyrate and lactate) but in simultaneous with 3-BP. While the cells incubated simultaneously with butyrate and 3-BP showed a decreased sensitivity to 3-BP, in opposition to what happened with the butyrate pre-treatment, lactate and 3-BP simultaneous incubation did not lead to any change. The expression of MCT1, MCT4 and, particularly, CD147 in butyrate and 3-BP treated cells is significantly lower comparing to cells treated only with butyrate, reaching levels similar or slightly decreased comparing to the non-treated cells. In cells treated with lactate and 3-BP, this change was not observed.

Thus, the overall results suggest that MCTs are involved in 3-BP mechanism of action, possibly mediating its uptake into the cell. Pre-treatment with butyrate, but not in simultaneous with 3-BP, enhanced 3-BP effect, most probably increasing the rates of 3-BP transport through MCT1/ MCT4. This study supports the potential use of butyrate pre-treatment as adjuvant of 3-BP, namely in breast cancer cells resistant to 3-BP and particularly in cells ER<sup>-</sup> that are also resistant to hormonotherapy.

Concerning 3-BP effect in non-tumoral cells, it was observed that fibroblasts CCD-1090Sk cell line, in opposition to the mouse myoblasts L6 cell line, presented a high resistance to the compound. These studies must be further developed in the future in order to analyze the influence of MCTs in 3-BP effect, not only in tumor cells, but also in the healthy ones.

**Keywords:** Cancer, Warburg effect, 3-bromopyruvate, monocarboxylates, monocarboxylate transporters.

---

# Índice



# Índice

Agradecimentos.....	V
Resumo .....	IX
Abstract .....	XI
Índice .....	XV
Índice de tabelas .....	XXI
Índice de figuras .....	XXV
Abreviaturas .....	XXXI
Publicações .....	XXXVII
Capítulo I.....	XXXIX
1. Introdução .....	3
1.1. Cancro .....	3
1.1.1. Cancro da mama: caracterização e tratamento .....	3
1.2. Metabolismo energético em células tumorais. O efeito de Warburg .....	5
1.3. A família dos transportadores de monocarboxilatos (MCTs).....	11
1.3.1. Função e regulação dos MCTs .....	13
1.3.2. Relevância da atividade dos MCT1-4 no cancro .....	16
1.4. Terapias antitumorais com alvos metabólicos.....	18
1.4.1. Mecanismo de ação e atividade antitumoral do 3-Bromopiruvato.....	21
Capítulo II.....	3
2. Objetivos.....	27
Capítulo III .....	29
3. Materiais e métodos.....	31
3.1. Linhas celulares .....	31
3.2. Reagentes .....	32
3.3. Condições de cultura .....	32
3.4. Tripsinização e subcultura das linhas celulares.....	33
3.5. Congelamento e descongelamento de células .....	34
3.6. Preparação das soluções de ácidos carboxílicos .....	34
3.7. Avaliação da viabilidade celular.....	35
3.7.1. Ensaio MTT.....	35
3.7.2. Ensaio SRB .....	36
3.8. Determinação da densidade celular adequada .....	36

3.9. Avaliação do efeito citotóxico do 3-BP .....	37
3.10. Avaliação do efeito do 3-bromopiruvato na morfologia celular .....	37
3.11. Avaliação da apoptose pelo ensaio de <i>TUNEL</i> .....	38
3.12. Doseamento de ácido láctico no meio de cultura .....	39
3.13. Avaliação da reversibilidade do efeito do 3-bromopiruvato.....	39
3.14. Efeito da adição de ácidos carboxílicos na sensibilidade ao 3-bromopiruvato .....	40
3.14.1. Avaliação da viabilidade celular em células pré-incubadas em meio de cultura com ácidos carboxílicos seguido de incubação em meio com 3-BP.....	40
3.14.2. Avaliação da viabilidade celular em células incubadas em meio de cultura com ácidos carboxílicos e 3-BP em simultâneo.....	40
3.15. Avaliação da expressão proteica .....	41
3.15.1. Preparação de cytoblocks em parafina.....	41
3.15.2. Imunocitoquímica.....	41
3.15.3. Preparação de extratos proteicos .....	43
3.15.4. Quantificação de proteínas .....	43
3.15.5. Análise de proteínas por SDS-PAGE .....	44
3.15.6. Western-Blot .....	45
3.16. Tratamento estatístico .....	46
Capítulo IV.....	47
4. Resultados .....	49
4.1. Efeito do 3-BP em linhas celulares de cancro de mama .....	49
4.1.1. Determinação da densidade celular adequada para inoculação.....	49
4.1.2. Efeito citotóxico do 3-BP em células de cancro de mama.....	50
4.1.3. Influência do 3-BP na indução da apoptose.....	52
4.1.4. Alterações morfológicas induzidas pelo 3-BP .....	54
4.1.5. Ação do 3-BP no metabolismo celular .....	55
4.1.6. Expressão basal e na presença de 3-BP de MCT1, MCT2, MCT4, CD147, HKII e Pgp, em linhas celulares de cancro de mama.....	56
4.2. Influência de ácidos carboxílicos metabólicos na ação do 3-BP em linhas celulares de cancro de mama .....	58
4.2.1. Citotoxicidade do 3-BP em células pré-incubadas com ácidos carboxílicos .....	58
4.2.2. Expressão de MCT1, MCT4 e CD147 em células SK-BR-3 incubadas na presença de diferentes ácidos monocarboxílicos.....	61

4.2.3. Viabilidade celular de células incubadas com ácidos carboxílicos e 3-BP em simultâneo.....	64
4.3. Efeito do 3-BP em linhas celulares não tumorais .....	68
Capítulo V .....	71
5. Discussão geral e conclusões .....	73
Capítulo VI .....	81
6. Perspetivas futuras.....	83
Capítulo VII .....	85
7. Bibliografia.....	87
Anexos .....	95



---

## Índice de tabelas



## Índice de tabelas

Tabela 1: Efeitos de alguns oncogenes e genes supressores tumorais no metabolismo celular.. .....	9
Tabela 2: Família de transportadores de monocarboxilatos MCTs.. .....	12
Tabela 3: Alvos metabólicos para o tratamento do cancro, envolvidos no efeito de Warburg.. .....	19
Tabela 4: Procedimento imunocitoquímico para avaliar a expressão das diferentes proteínas (MCT1, MCT2, MCT4, CD147, HK II e Pgp). .....	42
Tabela 5: Concentração extracelular de ácido láctico em linhas celulares de cancro de mama (ZR-75-1, MCF-7 e SK-BR-3) incubadas durante 16 horas na ausência ou presença do IC <sub>50</sub> de 3-BP.....	56



---

## Índice de figuras



## Índice de figuras

Figura 1: Representação do metabolismo da glicose por fosforilação oxidativa ou glicólise anaeróbica em tecidos diferenciados e por glicólise aeróbica em tumores.....	6
Figura 2: Ativação do HIF-1 por hipoxia.....	7
Figura 3: Tomografia por emissão de positrões com tomografia computadorizada (PET-CT) de um paciente com sarcoma, antes e após terapia com um inibidor de tirosina cinases (sunitinib)..	10
Figura 4: Metabolismo da glicose e da glutamina em células tumorais.....	11
Figura 5: Regulação da expressão dos transportadores de monocarboxilatos 1 e 4..	14
Figura 6: Simbiose metabólica entre células tumorais expostas a diferentes pressões de oxigênio..	17
Figura 7: Vias metabólicas envolvidas entre células tumorais e efeito da inibição do MCT1 na sobrevivência das células tumorais.....	18
Figura 8: Metabolismo de células tumorais e respectivos alvos terapêuticos..	20
Figura 9: Estrutura química do agente alquilante 3-bromopiruvato (3-BP)..	21
Figura 10: Possíveis mecanismos de ação do 3-BP.....	22
Figura 11: Correlação entre a densidade celular inicial das linhas celulares em estudo (ZR-75-1, MCF-7 e SK-BR-3) e a absorvância final a 570 nm, avaliada pelo ensaio de MTT..	49
Figura 12: Efeito do 3-BP na viabilidade celular das linhas celulares de cancro de mama ZR-75-1, MCF-7 e SK-BR-3, após 16 horas de incubação na presença do composto, avaliado pelo ensaio de MTT..	50
Figura 13: Capacidade das células de cancro de mama recuperarem após tratamento com 3-BP, avaliada pelo ensaio de MTT..	51

Figura 14: Apoptose induzida pelo 3-BP nas linhas celulares ZR-75-1, MCF-7 e SK-BR-3.....	54
Figura 15: Alterações morfológicas induzidas pelo 3-BP nas linhas celulares ZR-75-1, MCF-7 e SK-BR-3 não tratadas e tratadas com 3-BP (IC <sub>50</sub> e 2 x IC <sub>50</sub> ). .....	55
Figura 16: Avaliação por imunocitoquímica da expressão das proteínas MCT1, MCT2, MCT4, CD147, HK II e Pgp nas linhas celulares ZR-75-1, MCF-7 e SK-BR-3... ..	57
Figura 17: Viabilidade celular, avaliada pelo ensaio de MTT, de células das diferentes linhas (ZR-75-1, MCF-7 e SK-BR-3) incubadas 24 horas em meio contendo acetato, butirato, lactato ou piruvato numa gama de concentrações até 10000 µM, seguido de 16 horas de incubação em meio com ou sem 3-BP na concentração correspondente ao IC <sub>50</sub> de cada linha celular.....	60
Figura 18: Efeito do 3-BP na viabilidade celular na linha SK-BR-3 avaliado pelo ensaio de MTT. As células foram incubadas 24 horas em meio com ou sem butirato 500 µM, seguido de incubação com diferentes concentrações de 3-BP durante 16 horas. ....	61
Figura 19: Expressão imunocitoquímica das proteínas MCT1, MCT4 e CD147 na linha celular SK-BR-3 tratada com diferentes concentrações de butirato ou lactato durante 24 horas.....	63
Figura 20: Expressão do MCT1 e MCT4, avaliada por Western-blot em células SK-BR-3 tratadas com diferentes concentrações de butirato.. ..	64
Figura 21: Viabilidade celular, avaliada pelo ensaio de MTT, de células das diferentes linhas (ZR-75-1, MCF-7 e SK-BR-3) incubadas 16 horas em meio contendo butirato ou lactato numa gama de concentrações até 10000 µM com ou sem adição de 3-BP em simultâneo, na concentração correspondente ao IC <sub>50</sub> de cada linha celular,.. ..	65
Figura 22: Expressão imunocitoquímica das proteínas MCT1, MCT4 e CD147 na linha celular SK-BR-3, tratada com: (i) IC <sub>50</sub> de 3-BP durante 16 horas, (ii) 10000 µM	

de butirato ou lactato durante 24 horas e (iii) IC <sub>50</sub> de 3-BP em simultâneo com 10000 µM de butirato ou lactato durante 16 horas..	67
Figura 23: Correlação entre a densidade celular inicial das linhas celulares em estudo (Fibroblastos CCD-1090Sk e Mioblastos L6) e a absorvância final a 570 nm, avaliada pelo ensaio de MTT..	69
Figura 24: Efeito do 3-BP na viabilidade celular das linhas celulares Fibroblastos CCD-1090Sk e Mioblastos L6, após 16 horas de incubação na presença do composto, avaliado pelo ensaio de MTT..	69
Figura 25: Possível mecanismo de ação do butirato na potenciação do efeito do 3-BP..	80



---

## Abreviaturas



## Abreviaturas

**µg** – micrograma

**µL** – microlitro

**µm** – Micrómetro

**µM** – Micromolar

**3-BP** – 3-Bromopiruvato

**ADN** – Ácido Desoxirribonucleico

**AIF** – Fator indutor de apoptose

**ATCC** – *American Type Culture Collection*

**ATP** – Adenosina Trifosfato

**BSA** – Albumina Bovina Sérica

**cm** – Centímetros

**CPE** – Epitélio do Plexo Coróide

**D.O.xxx** – Densidade Ótica ao Comprimento de Onda xxx nm

**D.P.** – Desvio Padrão

**DAB** - 3,3-diamino-benzidina

**DAPI** – 4'-6-Diamidino-2-fenilindole

**DMEM** - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

**DMSO** – Dimetilsulfóxido

**ECL** – *Enhanced Chemo-Luminescence*

**EDTA** – Ácido Etilenodiamina Tetra-Acético

**ERO** – Espécies Reativas de Oxigénio

**FDG** – 2-(<sup>18</sup>F)-fluoro-2-desoxi-D-glicose

**FH** – Fumarato Hidratase

**GAPDH** – Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase

**GLUT** – Transportador de Glicose

**HDAC** – Desacetilases de Histonas

**HER** – Fator de Crescimento Epidérmico Humano

**HIF** – Fator Induzido por Hipoxia

**HK** – Hexocinase

**HRE** – Elemento de Resposta à Hipoxia

**IC<sub>50</sub>** – Concentração de composto que causa 50% de inibição celular

**IP** – Iodeto de Propídeo

**$K_m$**  - Constante de Michaelis-Menten  
**LDH** – Lactato Desidrogenase  
**mA** – Miliampéres  
**MCTs** – Transportadores de monocarboxilatos  
**Min** – Minuto  
**mL** – Mililitro  
**mM** – Milimolar  
**mTOR** – *Mammalian Target of Rapamycin*  
**MTT** - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio  
**NADPH** – Dinucleotídeo de Adenina Nicotinamida Fosfato Reduzido  
**NF- $\kappa$ B** – Fator Nuclear  $\kappa$ B  
**nm** – Nanómetros  
**°C** – Graus Celsius  
***p*** – Probabilidade  
***p.a.*** – Para Análise  
**PAGE** – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida  
**PBS** – Tampão Fosfato Salino  
**PDK** – Piruvato Desidrogenase Cinase  
**PET** – Tomografia de Emissão de Positrões  
**Pgp** – Glicoproteína P  
**PHDs** – Prolil Hidroxilases  
**PI3K** – Fosfatidilinositol-3-Cinase  
**PIP3** – Fosfatidilinositol Trifosfato  
**PK** – Piruvato Cinase  
**PKM2** – Isoforma M2 da Piruvato Cinase  
**RE** – Recetores de Estrogénio  
**RP** – Recetores de Progesterona  
**RPE** – Epitélio Pigmentar da Retina  
**rpm** – Rotações por Minuto  
**RPMI** - *Roswell Park Memorial Institute*  
**SBF** – Soro Bovino Fetal  
**SCO** – Citocromo Oxidase  
**SDH** – Succinato Desidrogenase  
**SDS** – Dodecil Sulfato de Sódio  
**SMCTs** – Transportadores Monocarboxilatos com Transporte de Sódio Acoplado

**SRB** – Sulforodamina B

**TBST** - *Tris-Buffered Saline Tween-20*

**TC** – Tomografia Computacional

**TCA** – Ácido Tricloroacético

**TEMED** – N,N,N',N' – Tetrametilenodiamina

**TIGAR** – *TP53-Induced Glycolysis and Apoptosis Regulator*

**Tris** - 2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol

**TUNEL** – *TdT-mediated dUTP Nick end Labelling*

**UV** – Ultra Violeta

**v/v** – Volume por Volume

**V-ATPase** – ATPase Vacuolar

**VDAC** – Canal Aniónico Dependente de Voltagem

**V<sub>max</sub>** – Velocidade Inicial Máxima



---

## Publicações



## Publicações

Foram utilizados na elaboração desta dissertação resultados apresentados em congressos e em artigos científicos indexados que a seguir se discriminam:

### Artigos científicos:

Queirós, Odília; Preto, Ana; Pacheco, António; Pinheiro, Céline; Azevedo-Silva, João; Moreira, Roxana; Pedro, Madalena; Ko, Young H.; Pedersen, Peter; Baltazar, Fátima; Casa, Margarida. *Butyrate activates the monocarboxylate transporter MCT4 expression in breast cancer cells and enhances the antitumor activity of 3-bromopyruvate*. Publicado a 12 de Fevereiro de 2012 na revista *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* (anexo I).

### Congressos:

António Pacheco, Odília Queirós, Ana Preto, Céline Pinheiro, João Azevedo-Silva, Roxana Moreira, Madalena Pedro, Fátima Baltazar and Margarida Casal. *Butyric acid increases monocarboxylate transporters (MCT) expression and enhances the cytotoxicity of the anti-tumoral agent 3-bromopyruvate (3-BP) in breast cancer cells*. XXI Porto Cancer Meeting: Metabolism and cancer, from etipathogenesis to therapy. Abril de 2012. Porto. Comunicação em forma de painel.



# Capítulo I

---

Introdução



## 1. Introdução

### 1.1. Cancro

O cancro é um dos problemas de saúde que mais preocupa a população nos dias de hoje, sendo a principal causa de morte nos países economicamente desenvolvidos e a segunda nos países em desenvolvimento [3]. A incidência do cancro tem vindo a aumentar mundialmente, como resultado do envelhecimento e crescimento da população, assim como do estilo de vida como o tabagismo, sedentarismo e a dieta [3]. Existem vários fatores que são importantes e que condicionam o desenvolvimento da doença, nomeadamente, a predisposição genética, os fatores ambientais e os fatores hereditários. Estes fatores podem estar na base de mutações genéticas e danos no ADN, que quando não são reparados poderão dar origem ao processo neoplásico. Apesar de os danos genéticos serem aleatórios, existem genes que estão frequentemente associados ao processo neoplásico, é o caso do gene *P53*, que na sua forma não mutada é um gene supressor de tumores [4].

Tendo como base um estudo de 2008, estima-se que existem em todo o mundo cerca de 12,7 milhões de casos de cancro anuais e 7,6 milhões de morte devido à doença, com 56% dos casos e 64% das mortes a ocorrerem em países economicamente desenvolvidos. O cancro da mama na mulher e do pulmão no homem, são os tipos de cancro mais frequentemente diagnosticados a nível mundial, sendo também os que levam a uma maior número de mortes, apesar de nos países desenvolvidos o cancro da próstata ser o mais frequente nos homens [3].

#### 1.1.1. Cancro da mama: caracterização e tratamento

O cancro da mama é a neoplasia mais vezes diagnosticada em mulheres (23%) sendo também a principal causa de morte por cancro nas mulheres (14%) em todo o mundo (dados referentes a 2008) [3]. Existem fatores que contribuem para a taxa de incidência do cancro de mama, como fatores associados à vida reprodutiva, hormonais, genéticos e ambientais [5]. Os fatores associados à vida reprodutiva que aumentam o risco de contrair o cancro de mama são: longa história menstrual, nuliparidade, uso precoce de terapias hormonais pós-menopausa, contraceptivos orais

e idade tardia do nascimento do primeiro filho [6]. O consumo de álcool, a obesidade e história familiar são também fatores que contribuem para o risco de cancro de mama [7, 8].

No final dos anos 80 e 90 foi observado um aumento do cancro de mama nos países ocidentais, resultado de um aumento do uso de terapias hormonais pós-menopausa [9]. Em contrapartida, a morte causada pelo cancro de mama, tem vindo a diminuir nos últimos 25 anos, devido à sua deteção através de mamografia numa fase precoce e posterior tratamento [5, 9, 10]. Estratégias para reduzir a morbidade e mortalidade desta doença, incidem em identificar os fatores de risco, o diagnóstico precoce e o tratamento [11].

O cancro de mama pode ser classificado a nível molecular, de acordo com os perfis de expressão genética, nomeadamente no que diz respeito à expressão de recetores de estrogénio (RE), progesterona (RP) e fator de crescimento epidérmico humano (HER): (i) luminal A (RE<sup>+</sup> e/ ou RP<sup>+</sup>, Her2<sup>-</sup>), (ii) luminal B (RE<sup>+</sup> e/ ou RP<sup>+</sup>, Her2<sup>+</sup>), (iii) HER2<sup>+</sup> (RE<sup>-</sup>, RP<sup>-</sup>, Her2<sup>+</sup>), (iv) basal (RE<sup>-</sup>, RP<sup>-</sup>, Her2<sup>-</sup>), (v) normal *breast-like* [12, 13]. Cada subtipo de cancro de mama apresenta prognósticos diferentes, em que o mais agressivo é o HER2<sup>+</sup> [12-14].

O tratamento do cancro de mama consiste em terapias locais ou sistémicas. A cirurgia e a radioterapia são tratamentos locais e são frequentemente utilizados no controlo da doença. Por outro lado, temos a quimioterapia e a hormonoterapia que são utilizados no controlo sistémico da doença. Os tratamentos apesar de poderem variar devido às características histopatológicas do tumor e condições clínicas do paciente, têm dado melhores resultados, quando estes métodos são utilizados em conjunto [15].

Para se tentar promover um melhor nível de vida a longo prazo em pacientes com cancro de mama recém-diagnosticados e com a doença numa fase inicial, pode-se recorrer a terapias sistémicas. Vários estudos clínicos têm demonstrado melhorias significativas no nível de vida de pacientes tratados com quimioterapia [16]. Sabe-se que mesmo em cancros de mama precoces podem surgir metástases ocultas pelo que, mesmo após tratamento eficaz, muitos pacientes voltam a desenvolver cancro

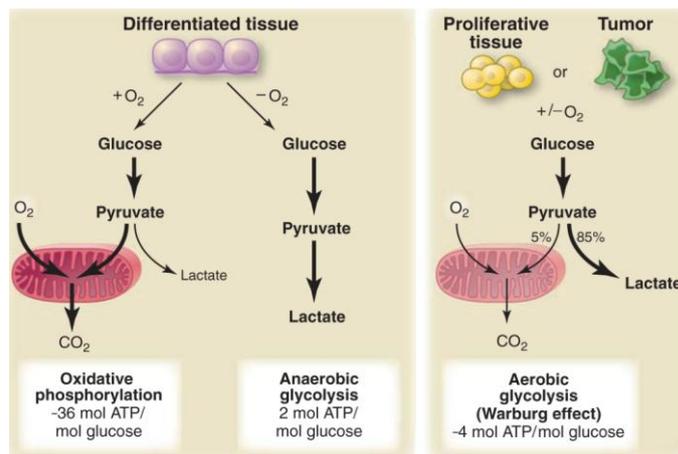
provocado por metástases ao longo do tempo [15]. A quimioterapia pode ser dada aos pacientes antes (neoadjuvante) ou depois (adjuvante) da cirurgia.

No tratamento do cancro da mama, um método muito utilizado é a hormonoterapia, praticado adicionalmente à quimioterapia. Cerca de 70% dos cancros de mama são conhecidos por expressar RE [17, 18]. No tratamento hormonal, o fármaco mais conhecido é o tamoxifeno, devido à sua eficácia em doenças avançadas e baixa toxicidade [16]. É importante realçar que o tamoxifeno só atua em células de cancro RE<sup>+</sup> (receptores estrogénio positivos), verificando-se poucos benefícios no tratamento de cancro RE<sup>-</sup> (receptores estrogénio negativos) [18]. Desta forma, é necessário procurar novas terapias para o tratamento desta doença que abrange uma parte significativa da população.

## 1.2. Metabolismo energético em células tumorais. O efeito de Warburg

A alteração do metabolismo energético é um dos marcos característicos das células tumorais. As células normais produzem lactato em condições de hipoxia ou na ausência de sistemas mitocondriais que permitam o metabolismo oxidativo. No entanto, nestas células, com metabolismo mitocondrial operacional, a presença de oxigénio inibe a fermentação láctica (“efeito Pasteur”), ocorrendo a fosforilação oxidativa, mais rentável energeticamente. As células tumorais estão muitas vezes sujeitas a condições de hipoxia, devido ao crescimento do tumor, mas mesmo nas células tumorais em normoxia, aumenta a produção de lactato pela glicólise e diminui a fosforilação oxidativa, característica dos tecidos normais, através do chamado “efeito de Warburg” ou “glicólise aeróbica” (Figura 1) [19]. Otto Warburg, cientista alemão e laureado com o prémio Nobel, verificou que as células tumorais apresentavam taxas glicolíticas muito superiores comparativamente às células saudáveis e postulou que defeitos no metabolismo energético mitocondrial poderiam estar na base do cancro [19]. Alguns estudos recentes atribuíram esse fenótipo não só a danos mitocondriais (muitas das células tumorais com o efeito de Warburg mantêm a funcionalidade mitocondrial), mas também a alterações genéticas em oncogenes e genes supressores tumorais e a uma desregulação da glicólise [20]. No entanto, os princípios postulados por Otto Warburg estão ainda hoje na base de muita

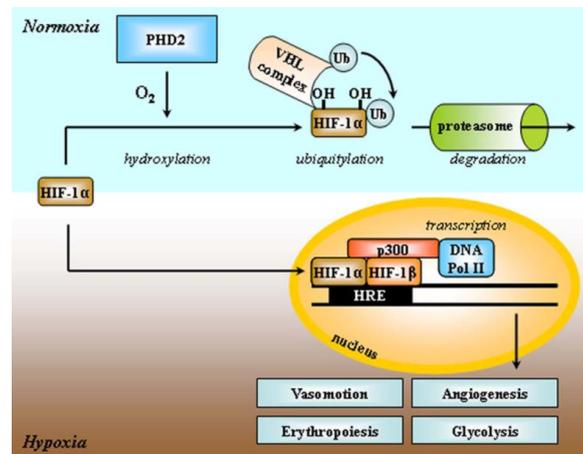
investigação relacionada com o metabolismo do cancro. Apesar da forte incidência dos estudos em cancro terem como base a proliferação descontrolada das células e a desregulação no controlo do ciclo celular, não há um padrão de mutações genéticas ou alterações cromossómicas que seja característico em todos os cancros. Pelo contrário, a glicólise aeróbica e o aumento de expressão de genes envolvidos nesta via é uma propriedade comum à maior parte dos tecidos tumorais (revisto em [21]).



**Figura 1:** Representação do metabolismo da glicose por fosforilação oxidativa ou glicólise anaeróbica em tecidos diferenciados (painel da esquerda) e por glicólise aeróbica em tumores (painel da direita). Nos tecidos diferenciados, a glicose em condições aeróbicas é em grande parte oxidada na mitocôndria via fosforilação oxidativa, processo dependente de oxigénio. Em condições anaeróbicas, o piruvato formado na glicólise é convertido em lactato, ocorrendo regeneração do  $\text{NAD}^+$ , o que permite a continuidade da glicólise, processo com menor rentabilidade energética. Em células tumorais, ocorre o efeito de Warburg, ocorrendo igualmente a produção de lactato a partir da glicose, mesmo na presença de oxigénio (glicólise aeróbica). Uma pequena parte da glicose é oxidada na mitocôndria, que permanece funcional. Figura retirada de [22].

As células tumorais tiram partido desta modificação metabólica, nomeadamente o (i) acesso a precursores biossintéticos, (ii) a disponibilidade de defesas antioxidantes e (iii) uma maior capacidade para resistir ao sistema imune, para invadir células vizinhas e iv) a sobrevivência quando o oxigénio se encontra em baixos níveis [23, 24]. O efluxo de lactato e prótons, resultante do fenótipo glicolítico, impede a apoptose induzida pela acumulação do ácido e cria um ambiente extracelular ácido que conduz a uma inibição do sistema imune, favorecendo a invasão do tumor através da ativação de metaloproteinases [23-27]. Assim sendo, não é de surpreender que exista uma correlação entre a produção de lactato em células tumorais e a agressividade do tumor e o seu grau de malignidade [28-31]. Além disso, o aumento

da atividade glicolítica pode igualmente fornecer substratos precursores para a síntese de macromoléculas (ácidos nucleicos, glicogênio, lípidos e proteínas), necessárias à proliferação celular. A glucose-6-fosfato proveniente da primeira reação da glicólise pode ser desviada para a via das pentose-fosfato, produzindo NADPH que assegura a síntese de lípidos e constituintes celulares, assim como de defesas antioxidantes que protegem a célula contra o stresse oxidativo encontrado em tumores [24, 32-35]. Esta alteração de fenótipo constitui assim uma vantagem para a sobrevivência e proliferação da célula tumoral. É de realçar que, apesar da glicólise ser uma via metabólica com menor rendimento energético, comparativamente à fosforilação oxidativa, as células tumorais obtêm o ATP suficiente para proliferarem, mesmo com uma baixa disponibilidade de oxigénio, através da ativação da entrada de nutrientes e do fluxo glicolítico [36]. A regulação positiva da subunidade  $\alpha$  do fator induzido por hipoxia (HIF-1), um fator de transcrição composto por duas subunidades HIF-1 $\alpha$  e HIF-1 $\beta$ , e a estabilização do heterodímero, contribuem para esta ativação (Figura 2) [37].



**Figura 2:** Ativação do HIF-1 por hipoxia. Em normoxia o HIF-1 $\alpha$  é hidroxilado pela prolin hidroxilase PHD2, enzima dependente de oxigénio, ubiquitilada e direcionada para o proteossoma para degradação. Em condições de hipoxia, ocorre expressão do HIF-1 $\alpha$  que migra para o núcleo, ligando-se ao HIF-1 $\beta$ , ao adaptador p300, à DNA Pol II e ao elemento de resposta à hipoxia (HRE), existente na região promotora dos genes alvo, ativando a expressão destes genes envolvidos na glicólise, angiogénese, eritropoiese e vasomoção. Figura retirada de [22].

São vários os genes alvo da regulação pelo HIF-1, incluindo genes codificantes do transportador de glucose GLUT1, do transportador de lactato MCT4 e de uma variedade de enzimas envolvidas no metabolismo, nomeadamente a lactato

desidrogenase A (LDHA), que converte piruvato em lactato, a piruvato desidrogenase cinase 1 (PDK1), que fosforila e inativa a piruvato desidrogenase (e consequentemente a produção de acetil-CoA a partir de piruvato) e a hexocinase I e II, que catalisam a fosforilação da glicose a glicose-6-fosfato, entre outras [38-41]. Além da ativação de enzimas glicolíticas, a ativação da PDK1 pelo HIF-1, e subsequente inibição da enzima piruvato desidrogenase, compromete a fosforilação oxidativa, contribuindo para o fenótipo glicolítico apresentado pela célula tumoral. Um marcador das células tumorais é a forma embrionária M2 da piruvato cinase (PK) que é também ativada pela HIF-1. Esta enzima está envolvida na conversão de fosfoenolpiruvato em piruvato, com formação acoplada de ATP, e a isoforma M2 é encontrada exclusivamente em células tumorais [42]. A supressão desta forma reverte o “efeito de Warburg” e promove a respiração aeróbica [43].

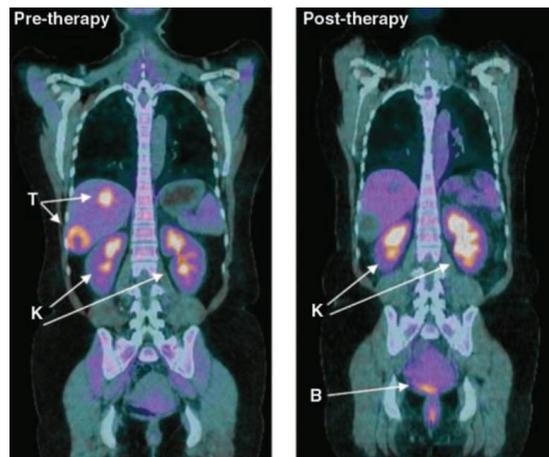
O HIF-1 inibe também a biogénese mitocondrial, razão pela qual as células tumorais apresentam mitocôndrias mais pequenas e consequentemente com menor atividade [44]. O HIF-1 é, como o nome indica, ativado por hipoxia, mas outros fatores como sinais oncogénicos, inflamação ou stresse oxidativo, conduzem também à sua ativação [24, 45-47]. Por exemplo, mutações perda de função das enzimas succinato desidrogenase (SDH) ou fumarato hidratase (FH), descritas como sendo potenciais supressores tumorais, levam à acumulação dos intermediários do ciclo de Krebs succinato e fumarato e à estabilização do heterodímero HIF-1. Estes intermediários inibem competitivamente a enzima  $\alpha$ -cetoglutarato prolil-hidroxilase, que direciona o HIF-1 para degradação [48].

Há diversos oncogenes e genes supressores tumorais, como a SDH ou FH atrás referidas, envolvidos na regulação do HIF-1, e consequentemente na ativação do metabolismo glicolítico da célula tumoral e na angiogénese [24]. No entanto, estes têm outros papéis, independentes do HIF-1, na reprogramação metabólica e na alteração fenotípica no cancro [24]. É o caso dos oncogenes Akt, c-Myc, Ras ou do supressor tumoral p53, entre outros (Tabela 1). Assim, por exemplo, a expressão ectópica do fator de transcrição e oncogene c-Myc (super-expresso em vários tumores) induz, em conjunto com o HIF-1, o transportador GLUT1 assim como as enzimas HK II, PDK1 e LDH5 [37], enquanto o supressor tumoral p53 induz o gene *TIGAR*, o que leva à inibição da fosfofrutocinase e da glicólise e à diminuição das espécies reativas de oxigénio (ERO) [49].

**Tabela 1:** Efeitos de alguns oncogenes e genes supressores tumorais no metabolismo celular. Tabela adaptada de [24].

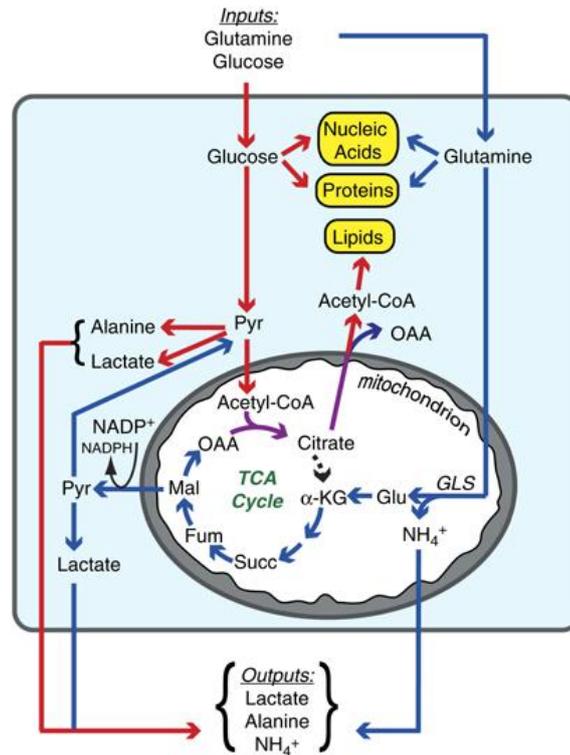
Gene	Efeito	Cancro
<b>Oncogenes</b>		
PI3K	Ativação da Akt via PIP3; redução (via Akt) da $\beta$ -oxidação de ácidos gordos	Ovário e gastrointestinal
Akt	Ativação da síntese de ácidos gordos; ativação do complexo 1 do mTOR	Mama e ovário
Her2	Aumento, através da ativação do PI3K, Akt e mTOR, da expressão de enzimas envolvidas na síntese de ácidos gordos	Mama
Tirosina cinases	Diminuição da atividade da isoforma PKM2 da piruvato cinase	Vários
<b>Supressores Tumores</b>		
p53	Requerida para a expressão da citocromo oxidase 2 (SCO2) envolvida na fosforilação oxidativa; aumento da expressão do inibidor glicolítico <i>TIGAR</i> , redução da expressão da enzima glicolítica fosfogliceromutase	Vários
Succinato desidrogenase	O succinato acumulado inibe competitivamente a prolil hidroxilase (PHDs) da HIF 1 $\alpha$	Paraganglioma
Fumarato hidratase (fumarase)	O fumarato acumulado inibe competitivamente a prolil hidroxilase (PHDs) da HIF 1 $\alpha$	Papilar e renal

A elevada absorção de glucose em células tumorais, está na base no diagnóstico imagiológico por tomografia por emissão de positrões utilizando o análogo não metabolizável da glicose  $^{18}F$ -fluordesoxiglicose (FDG-PET) (Figura 3). O FDG-PET associado à tomografia computadorizada (FDG-PET-TC) constitui um sistema comum de deteção não-invasivo no diagnóstico de cancro, com elevada sensibilidade e especificidade na deteção de metástases da maioria dos cancros, nomeadamente colorretal, mama, pulmão (células não-pequenas), cabeça e pescoço, melanoma e linfoma [49-51].



**Figura 3:** Tomografia por emissão de positrões com tomografia computadorizada (PET-CT) de um paciente com sarcoma, antes (imagem da esquerda) e após (imagem da direita) terapia com um inibidor de tirosina cinases (sunitinib). A inibição do metabolismo da glicose é visualizada por PET, utilizando o análogo da glicose FDG. O tumor (T) é visualizado por FDG-PET-CT antes da terapia. Após 4 semanas de tratamento não é detetada a entrada de FDG, o qual foi excretado na urina aparecendo assim marcação nos rins (K) e bexiga (B). Figura retirada de [22].

Apesar da importância que a glicose tem para a proliferação das células tumorais, esta não é o único substrato envolvido na reprogramação metabólica, que ocorre em grande parte dos cânceres. De facto, a glutamina, tal como a glicose, é metabolizada em quantidades apreciáveis por células tumorais e os dois substratos em conjunto fornecem a maior parte do carbono, azoto, equivalentes redutores e energia que a célula tumoral necessita para produção de biomassa e proliferação celular [22]. A glutamina é convertida em glutamato pela ação da enzima glutaminase, sendo o glutamato um importante intermediário na produção de metabolitos importantes no crescimento celular. As células tumorais apresentam uma elevada atividade da glutaminase, estando esta relacionada com o consumo de glutamina, assim como com a taxa de crescimento das células [52]. Este aminoácido, tal como a glicose, pode ser degradado a lactato, em vez de ser completamente oxidado [52]. A glutamina é a principal fonte para a produção do NADPH em células tumorais, gerando poder redutor para reações biossintéticas e gerando também por uma reação anaplerótica  $\alpha$ -cetoglutarato, o que permite a continuidade do ciclo de Krebs (Figura 4). Assim, não é de surpreender que as células tumorais apresentem uma elevada atividade da glutaminase e um rápido consumo de glutamina, uma vez que o seu metabolismo fornece grande parte dos intermediários necessários na proliferação celular [53].



**Figura 4:** Metabolismo da glicose e da glutamina em células tumorais. Os principais nutrientes consumidos por tumores são a glutamina e a glicose, os quais fornecem precursores para a biossíntese de ácidos nucleicos, proteínas e lipídios. O metabolismo da glutamina (setas azuis) e da glicose (setas vermelhas), convergem ambas para a produção de citrato. O metabolismo da glutamina origina oxaloacetato e poder redutor (NADPH), requeridos em reações biossintéticas. A glutamina, em conjunto com a glicose, contribui ainda para a produção de lactato a partir de piruvato. Como resultado do metabolismo da glicose e da glutamina, a célula tumoral secreta lactato, alanina e  $\text{NH}_4^+$ . Abreviaturas: GLS – glutaminase, Glu – glutamato,  $\alpha$ -KG –  $\alpha$ -cetoglutarato, Succ – succinato, Fum – fumarato, Mal – malato, OAA – oxaloacetato, Pyr – piruvato, TCA – ácidos tricarbóxicos. Figura retirada de [54].

A exploração do metabolismo diferencial de células tumorais pode ser uma abordagem valiosa e promissora para o desenvolvimento de fármacos antitumorais seletivos, com baixa toxicidade para as células normais, para tratar o cancro.

### 1.3. A família dos transportadores de monocarboxilatos (MCTs)

A produção de lactato, mesmo na presença de oxigénio, ou seja o “efeito de Warburg”, é uma das características da maior parte das células tumorais, de acordo com as alterações no perfil metabólico atrás referenciadas. No entanto, a acumulação de lactato na célula conduziria à acidificação intracelular e subsequente apoptose. A célula tumoral protege-se desse efeito aumentando o efluxo de lactato e de protões,

pelo que o estudo das proteínas envolvidas nesse efluxo é de relevante interesse na área da oncobiologia.

Uma família de transportadores de monocarboxilatos do tipo simporte com protões (MCTs) foi descrita como estando envolvida no transporte de ácidos monocarboxílicos [55, 56]. Recentemente, outra família de transportadores de monocarboxilatos, com transporte do sódio acoplado (SMCTs) tem sido associada à mesma função [57, 58]. A família MCT compreende 14 membros (Tabela 2), mas apenas os primeiros 4 (MCT1-4) foram funcionalmente caracterizados como mediadores do transporte de ácidos monocarboxílicos através da membrana plasmática (nomeadamente lactato, butirato, piruvato e acetato) [38, 56].

**Tabela 2:** Família de transportadores de monocarboxilatos MCTs. Adaptado de [59].

Proteína	Gene	Substratos	Expressão em tecidos	Nº acesso NCBI
MCT1	SLC16A1	Lactato, piruvato, corpos cetónicos	Ubíqua	NP_001159968.1
MCT2	SLC16A7	Lactato, piruvato, corpos cetónicos	Rim, Cérebro	NP_004722.2
MCT3	SLC16A8	Lactato	Epitélio do pigmento retinal (RPE), epitélio do plexo coroíde (CPE)	NP_037488.2
MCT4	SLC16A3	Lactato, piruvato, corpos cetónicos	Músculo-esquelético, condrócitos, leucócitos, testículos, pulmão, placenta, coração	NP_001035887.1
MCT5	SLC16A4	?	Cérebro, rim, músculo pulmão, ovário, placenta, coração	NP_004687.1
MCT6	SLC16A5	?	Rim, músculo, cérebro, coração, pâncreas, próstata, pulmão, placenta	NP_004686.1
MCT7	SLC16A6	?	Cérebro, pâncreas, músculo	NP_001167637.1
MCT8	SLC16A2	T3, T4	Fígado, coração, cérebro, timo, intestino, ovários, próstata, pâncreas, placenta	NP_006508.1
MCT9	SLC16A9	?	Endométrio, testículos, ovários, mama, cérebro, rim, adrenal, RPE	NP_919274.1
MCT10 (TAT1)	SLC16A10	Aminoácidos aromáticos	Rim, intestino, músculo, placenta, coração	NP_061063.2

Proteína	Gene	Substratos	Expressão em tecidos	Nº acesso NCBI
MCT11	SLC16A11	?	Pele, pulmão, ovários, mama, pâncreas, RPE, CPE	NP_699188.1
MCT12	SLC16A12	?	Rim	NP_998771.3
MCT13	SLC16A13	?	Mama, células medula óssea	NP_963860.1
MCT14	SLC16A14	?	Cérebro, coração, ovários, mama, pulmão, pâncreas, RPE, CPE	NP_689740.2

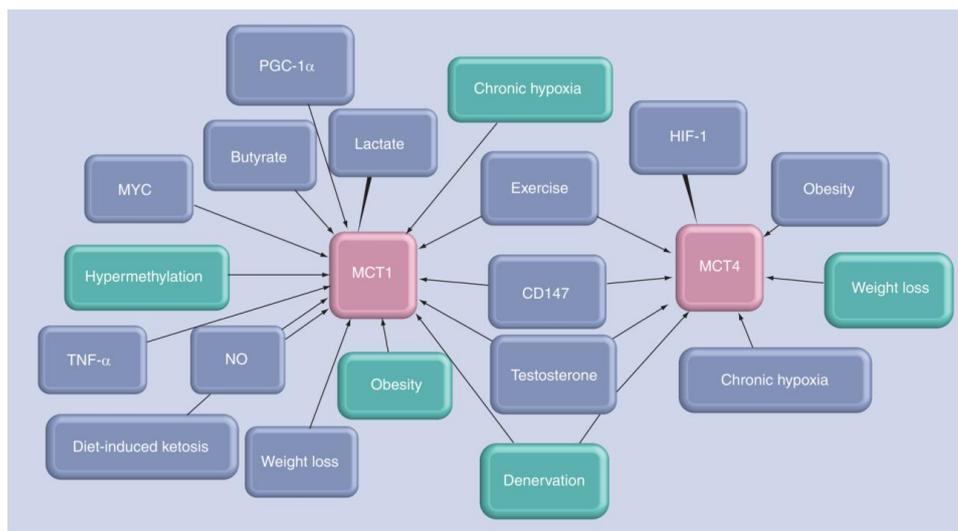
### 1.3.1. Função e regulação dos MCTs

Como referido, embora a família dos MCTs seja constituída por 14 membros, foi verificado que apenas 4 (MCT1-4) participavam no transporte de ácidos monocarboxílicos [38, 56]. Os restantes, ou não têm ainda função atribuída, ou participam no transporte de outro tipo de substratos como aminoácidos aromáticos ou as hormonas da tiroide T3 e T4 [59]. Dada a relevância no âmbito do presente trabalho, irá ser apresentado nesta revisão informação referente apenas à caracterização dos MCT1-4.

#### *MCT1*

O MCT1 é o membro da família dos MCTs mais estudado, estando este presente na maior parte dos tecidos [60]. Trata-se de uma proteína com 12 domínios transmembranares com o N- e C-terminal intracelulares e com 494 aminoácidos [60, 61]. Este transportador aceita uma ampla gama de ácidos monocarboxílicos como substrato (Tabela 2). Alguns cetoácidos derivados da transaminação de aminoácidos como fenilpiruvato,  $\alpha$ -cetoisocaproato,  $\alpha$ -cetoisovalerato,  $\alpha$ -ceto- $\beta$ -metilvalerato podem também ser transportados pelo MCT1, mas o seu transporte ocorre muito lentamente, atuando antes como fortes inibidores competitivos do transporte de outros monocarboxilatos [62]. O principal papel fisiológico do MCT1 é o transporte de lactato através da membrana plasmática, podendo mediar esse transporte para o interior ou exterior da célula, dependendo do gradiente de concentração de lactato e do pH [56, 59]. A correta expressão membranar e atividade do MCT1 depende da atividade de uma proteína auxiliar (chaperona), a CD147, também designado por basigina ou EMMPRIN [63].

Os MCTs, e nomeadamente o MCT1, podem ser regulados por diferentes estímulos, incluindo hormonas (testosterona), exercício e também por ácidos carboxílicos [38] (Figura 5). Em células de músculo de rato, a expressão do MCT1 foi ativada após exposição a 10 e 20 mM de lactato, o produto final da glicólise. A acumulação de lactato estimulou a síntese de espécies reativas de oxigénio (ERO), desencadeando uma cascata de sinalização que induziu a expressão de vários genes, incluindo o MCT1 [64]. De um modo semelhante, um outro substrato dos MCTs, o butirato, induziu a expressão do MCT1 em colonócitos humanos (numa linha tumoral (Caco-2) assim como numa não tumoral (AA/C1)) [65, 66]. O butirato é sintetizado por fermentação microbiana no cólon, sendo metabolizado pelos colonócitos onde modula a expressão génica através da inibição das desacetilases de histonas e, consequentemente, através da hiperacetilação de histonas [67-69]. Tanto o lactato como o butirato estimulam o MCT1 através do fator de transcrição NF- $\kappa$ B [64, 65].



**Figura 5:** Regulação da expressão dos transportadores de monocarboxilatos 1 e 4. As caixas azuis representam os estímulos que provocam um aumento da sua expressão, enquanto as caixas verdes representam os estímulos que levam à sua repressão. Figura retirada de [38].

## *MCT2*

O MCT2 apresenta uma maior afinidade para os ácidos monocarboxílicos piruvato e lactato do que o MCT1, mas sua localização é mais restrita, tendo sido encontrada expressão desta isoforma no baço, coração, rim, pâncreas, músculo-esquelético, cérebro, leucócitos e fígado [56, 70]. Dado tratar-se de um transportador de elevada

afinidade ( $K_m = 0,7$  mM para lactato,  $K_m = 0,08$  mM para piruvato) [71], está principalmente adaptado para a entrada de monocarboxilatos na célula, sendo encontrado principalmente em tecidos que utilizam o lactato como substrato, como por exemplo os neurónios, ou em órgãos que efetuam gliconeogénese (fígado e rim) [56]. O MCT2 apresenta cerca de 50% de homologia com o MCT1, contém 478 aminoácidos organizados em 12 domínios transmembranares [70]. A atividade do MCT2 depende também de uma proteína chaperona, neste caso a EMBIGIN ou gp70 [72].

### *MCT3*

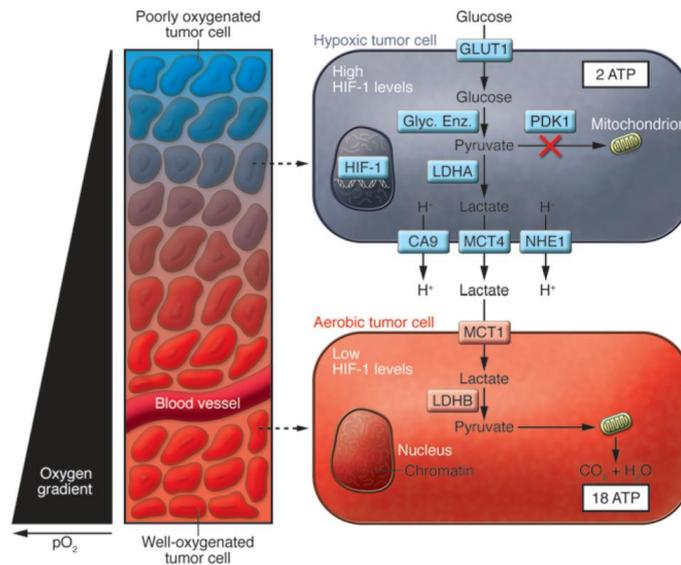
Este transportador da família dos MCTs, apresenta uma localização confinada ao epitélio do pigmento retinal (RPE) e epitélio do plexo coróide (CPE), onde se encontra envolvido no transporte de ácido láctico [56, 60]. A sua expressão heteróloga em levedura confirmou o seu papel no transporte de ácido láctico, com um valor de  $K_m$  de 6 mM, não apresentando no entanto sensibilidade à ação de alguns inibidores conhecidos dos MCTs [73]. Alguns estudos indicam que a proteína chaperona CD147 poderá também ser necessária para a expressão membranar deste transportador [74]. O seu papel principal parece estar envolvido no efluxo de lactato, formado glicoliticamente na retina [75].

### *MCT4*

O MCT4 é particularmente expresso em tecidos com elevada atividade glicolítica como o músculo ou astrócitos, por exemplo [59, 75]. Trata-se de um transportador de baixa afinidade para o piruvato e lactato ( $K_m$  de 150 e 28 mM, respetivamente) pelo que a sua função está essencialmente relacionada com o efluxo de lactato pela célula [75]. Tal como o MCT1, também o MCT4 necessita da atividade da CD147 para a sua funcionalidade [76]. O MCT4 é especialmente induzido, via HIF-1 em condições de hipoxia, situação em que a célula recorre à atividade glicolítica para a obtenção de energia, acumulando lactato. Este aumento de expressão correlaciona-se com o papel deste transportador no efluxo de lactato. Ao contrário dos MCT1 e MCT2, a expressão do MCT4 é induzida em condições de hipoxia (figura 6), devido à presença no seu promotor de quatro potenciais elementos de resposta à hipoxia (HRE) [56, 77].

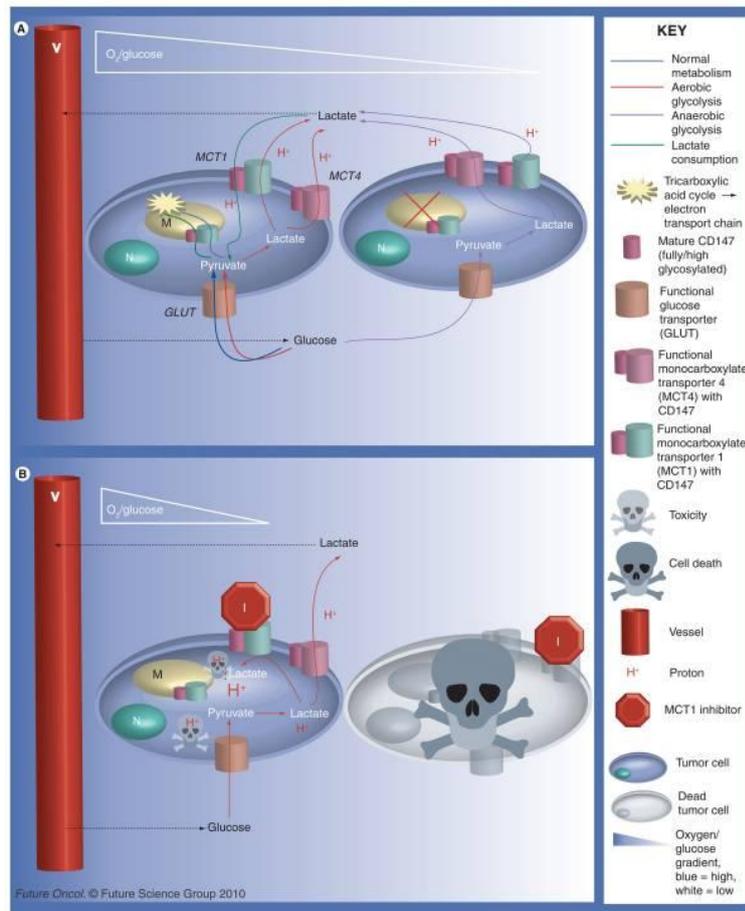
### 1.3.2. Relevância da atividade dos MCT1-4 no cancro

Os MCT1 e MCT4 são encontrados em células tumorais onde estão intimamente associados com a CD147 [56, 78]. Embora estes transportadores estejam presentes na membrana plasmática de células normais, existem evidências do aumento da sua expressão em células tumorais, dada a produção de ácido láctico e aumento do seu efluxo pela célula [79-81]. As células tumorais podem captar ou exportar lactato, de acordo com a disponibilidade de oxigénio, concentração de lactato e expressão dos diferentes subtipos de MCTs na superfície da célula [82, 83]. O efluxo de lactato é mediado principalmente pela isoforma MCT4, enquanto as células tumorais aeróbicas podem captar lactato pelo MCT1 [83, 84] (Figura 6). Os MCT1 e MCT4 são expressos diferencialmente em células tumorais ocorrendo uma simbiose metabólica entre as células hipóxicas e aeróbicas, sendo o MCT4 mais expresso em células altamente glicolíticas, que exportam lactato, podendo este ser utilizado pelas células tumorais com metabolismo oxidativo, as quais possuem uma maior expressão de MCT1 [84]. Em tumores metásticos, além do MCT4, também a CD147, apresenta aumento de expressão na membrana plasmática. A CD147 além de atuar como chaperona do MCT1 e MCT4, induz também a atividade de metaloproteinases, estando assim envolvida na proliferação e grau de invasão do tumor [56, 85]. Também o MCT4 tem um papel duplo no cancro: efluxo de lactato proveniente do metabolismo da célula tumoral e regulação do pH intracelular por efluxo de prótons [25]. Nessa regulação do pH intracelular estão envolvidas para além do MCT4 outras proteínas como: (i) ATPase vacuolar (V-ATPase), (ii) permutador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  1 e (iii) anidrase carbónica 9 [25]. O efluxo de prótons evita a acidificação intracelular e subsequente apoptose. Além disso, cria um microambiente tumoral ácido, o qual está associado a uma maior capacidade de invasão e quimio- ou radorresistência [33].



**Figura 6:** Simbiose metabólica entre células tumorais expostas a diferentes pressões de oxigênio. As células tumorais podem apresentar-se com vários níveis de exposição ao oxigênio, consoante a sua localização no tumor e distância aos vasos sanguíneos. As células tumorais mais distantes dos vasos sanguíneos encontram-se normalmente em hipóxia, apresentando uma elevada expressão do fator de transcrição HIF-1 e de enzimas glicolíticas, traduzindo-se numa elevada formação de ácido láctico, o qual é exportado via MCT4. Por sua vez, as células tumorais com maior disponibilidade de oxigênio captam esse lactato, normalmente via MCT1, sendo este utilizado como fonte energética por estas células. LDHA/B - lactato desidrogenase A/B; PDK1 - piruvato desidrogenase cinase 1; MCT1/4 - transportadores de monocarboxilatos 1/4; CA9 - anidrase carbónica 9; NHE1 - permutador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  1; HIF - 1 - fator indutível por hipóxia. Figura adaptada de [83].

O aumento da expressão dos MCTs foi já referido em diversos casos clínicos de tumores sólidos, nomeadamente colorretal, sistema nervoso central, próstata e gástrico, entre outros, muitas das vezes acompanhada com o aumento da expressão da CD147 (revisto em [86]). Neste contexto, os MCTs revelam-se um alvo atrativo no desenvolvimento de terapias antitumorais, principalmente tendo em conta o seu papel no processo de tumorigénese (Figura 7). Assim, foram já realizados estudos tanto *in vivo* como *in vitro* com inibidores de MCTs, nomeadamente com o ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico, tendo-se verificado uma diminuição do crescimento do tumor e do pH intracelular e um aumento da morte celular e da sensibilidade à radioterapia. Por outro lado, o silenciamento dos MCT1 e MCT4 inibiu a invasão mas não a migração (revisto em [86]).



**Figura 7:** Vias metabólicas envolvidas entre células tumorais e efeito da inibição do MCT1 na sobrevivência das células tumorais. **(A)** As células tumorais que se apresentam perto dos vasos sanguíneos apresentam uma elevada disponibilidade de oxigênio e nutrientes, entre eles a glicose, necessários para o seu crescimento. Por outro lado, as células que se encontram mais afastadas dos vasos sanguíneos, vão estar sujeitas a diversos níveis de hipoxia e a escassos níveis de nutrientes. O metabolismo oxidativo das células tumorais em aerobiose permite a utilização de lactato produzido glicoliticamente, em alternativa à glicose, ficando esta disponível para as células mais distantes dos vasos sanguíneos. **(B)** A inibição do MCT1 pode levar à morte celular das células tumorais uma vez que a acumulação de lactato leva a uma acidificação intracelular e à subsequente apoptose. Por outro lado, esta inibição não permite a entrada de lactato para as células, ficando estas obrigadas a utilizar unicamente glicose, a qual deixa de estar disponível para as células em hipoxia que morrem, uma vez que não têm acesso a qualquer fonte de energia. Figura retirada de [38].

#### 1.4. Terapias antitumorais com alvos metabólicos

Nas células tumorais, o “efeito de Warburg” é uma peça chave no fenótipo maligno que estas apresentam. Desta forma, vários compostos têm vindo a ser utilizados em ensaios de terapia antitumoral, tendo como alvo a via glicolítica ou vias de

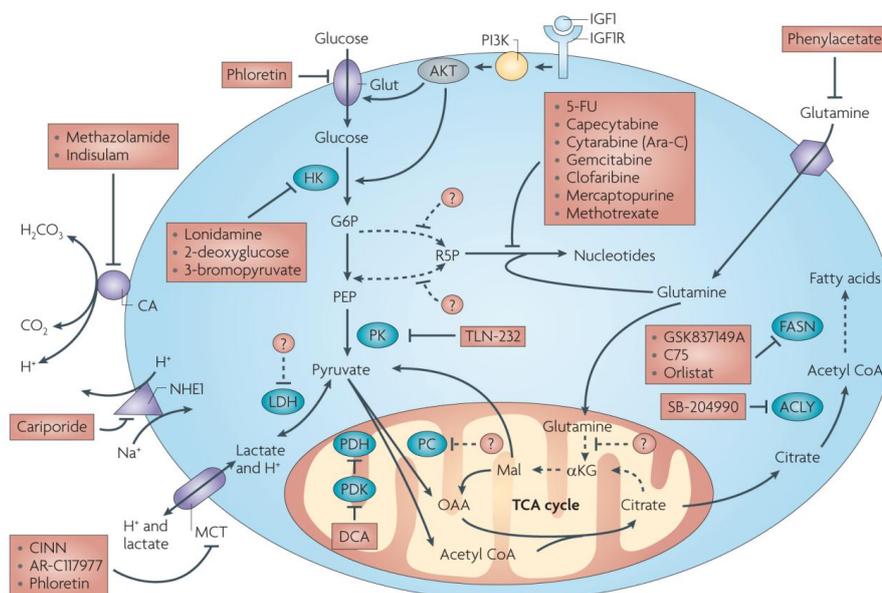
sinalização que regulam o metabolismo celular, em adição aos já referidos inibidores dos MCTs, havendo já ensaios clínicos com alguns desses compostos e encontrando-se muitos outros em fase pré-clínica. A Tabela 3 refere alguns dos principais alvos metabólicos assim como os compostos que têm vindo a ser utilizados.

**Tabela 3:** Alvos metabólicos para o tratamento do cancro, envolvidos no efeito de Warburg. Tabela adaptada de [24].

Alvo	Efeitos	Compostos
Transporte glicose	Inibição do transporte da glicose ou passos iniciais da glicólise	2-desoxiglicose
Hexocinase (HK 1 e 2)	Inibição da atividade enzimática e dissociação da mitocôndria	3-bromopiruvato
Piruvato desidrogenase cinase 1 (PDK1)	Diminuição da inibição da piruvato desidrogenase pela PDK1	Dicloroacetato (DCA)
Lactato desidrogenase A (LDHA)	Inibição	siRNA
Isoenzima PKM2 da piruvato cinase (PK)	Translocação da PKM2 para o núcleo para induzir apoptose	Somatostatina e seu derivado TT-232
HIF-1	Inibição da sua ligação ao DNA	Equinomicina
ERO	A neutralização das ERO reduz a atividade da HIF-1	N-acetilcisteína, vitamina C
MCT1	Inibição	ácido $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico
permutador $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 1	Inibição	Cariporide
anidrase carbónica 9	Inibição	Indisulam sulfonamida
Permutador $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$	Inibição	S-3705
$\text{F}_1\text{F}_0$ ATP sintetase	Inibição	Angioestatina, anticorpos

A reprogramação metabólica no cancro envolve vias de sinalização em que participam cinases (PI3K, mTOR) e fatores de transcrição (HIF, c-Myc) [87]. Essa reprogramação traduz-se no aumento da taxa da glicólise e da glutaminólise, para que a célula tumoral obtenha a energia e precursores biossintéticos necessários à sua proliferação. Os primeiros fármacos anti-metabólicos utilizados na terapia antitumoral tinham como alvo a síntese de ADN (5-fluoruracilo ou metotrexato) (figura 8), baseado na evidência que as células tumorais apresentam taxas elevadas de proliferação. No entanto, apesar desses compostos serem particularmente tóxicos

para as células tumorais, acabam por revelar igualmente baixa especificidade e uma toxicidade apreciável para as células saudáveis, principalmente para as mais proliferativas. O “efeito de Warburg” poderá ser considerado o calcanhar de Aquiles do cancro, dado que é um marco característico das células tumorais, responsável pela sua capacidade proliferativa, assim como pela resistência a fármacos utilizados na quimioterapia convencional. Desta forma, novos compostos direcionados para este fenótipo têm surgido nos últimos anos, alvejando um tratamento mais específico e eficaz do cancro (Figura 8).



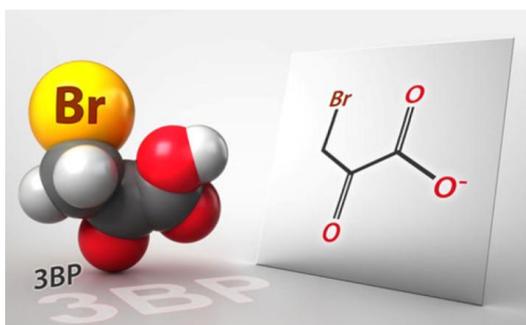
**Figura 8:** Metabolismo de células tumorais e respetivos alvos terapêuticos. Abreviaturas: 5-FU - 5-fluorouracilo;  $\alpha$ KG -  $\alpha$ -cetoglutarato; ACLY - ATP citrato liase; CA - anidrase carbónica; CINN -  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinamato; DCA – dicloroacetato; FASN – ácidos gordos sintase; G6P - glucose-6-fosfato; Glut – transportador de glucose; HK - hexocinase; IGF1- fator de crescimento tipo insulina 1; IGF1R – recetor IGF1; LDH - lactato desidrogenase; Mal – malato; MCT – transportador monocarboxilatos; NHE1 – permutador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  1; OAA – oxaloacetato; PDH - piruvato desidrogenase; PDK - piruvato desidrogenase cinase; PEP - fosfoenol piruvato; PK - piruvato cinase; R5P - ribose 5-fosfato; TCA – ciclo dos ácidos tricarboxílicos. Figura retirada de [87].

De entre os compostos que têm vindo a ser desenvolvidos, destaca-se o 3-bromopiruvato (3-BP), um inibidor metabólico que inibe a produção de ATP quer ao nível da glicólise, quer da energética mitocondrial, e que tem vindo a dar resultados promissores na inibição do crescimento tumoral quer *in vitro* quer *in vivo* [1, 2], estando neste momento em fase de ensaios pré-clínicos [88, 89]. Além disso, foi

publicado muito recentemente o primeiro ensaio translacional que demonstrou que o 3-BP é um agente antitumoral de elevada eficácia e especificidade em humanos [90].

#### 1.4.1. Mecanismo de ação e atividade antitumoral do 3-Bromopiruvato

O 3-bromopiruvato (3-BP) é um agente alquilante derivado do piruvato (Figura 9), que piruvila proteínas, em geral no grupo –SH de resíduos de cisteína, levando à sua perda de funcionalidade. Atua essencialmente como inibidor do metabolismo energético das células tumorais, provocando uma diminuição do ATP e morte celular [1]. Relativamente ao tipo de morte induzida pelo 3-BP, foi verificado, dependendo da linha celular, que poderia envolver autofagia [91], apoptose [92] ou necrose [89].

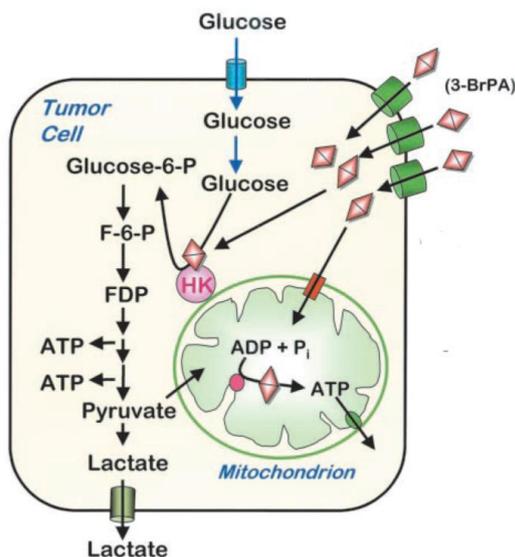


**Figura 9:** Estrutura química do agente alquilante 3-bromopiruvato (3-BP). Figura adaptada de [90].

Um dos principais alvos do 3-BP é a enzima glicolítica HK II [1, 93]. Esta enzima, além de não sofrer inibição pela glicose-6-fosfato, apresentando desta forma atividade constitutiva, tem também a capacidade de se associar com a mitocôndria, especialmente em células tumorais, através da proteína Canal dependente de voltagem (VDAC), ficando assim com acesso privilegiado ao ATP sintetizado na mitocôndria pelo complexo *ATP synthasome* [23, 94-97]. A super-expressão da HK II está associada a um pior prognóstico, já que a glicólise é a principal fonte de energia utilizada pelas células tumorais para sustentar o seu crescimento celular descontrolado. O 3-BP modifica covalentemente a HK II, conduzindo à sua dissociação da mitocôndria e à libertação do fator indutor de apoptose (AIF) e morte celular [93], além de afetar também o complexo *ATP synthasome* [98]. Foi verificado em linhas celulares de hepatoma que uma maior resistência ao 3-BP estava associada a uma menor expressão da HK II, havendo neste caso uma maior formação de ERO [99]. Em linhas celulares de melanoma foi observado um efeito contrário, tendo-se verificado que o 3-BP não induziu a formação de ERO nas linhas mais

resistentes, enquanto nas mais sensíveis houve uma indução de 2-3 vezes [100]. Os autores associam este efeito aos níveis de glutathiona na célula, tendo sido verificado que o 3-BP induzia a sua depleção. Estudos realizados por Lis *et al* [101], utilizando como modelo a levedura *Saccharomyces cerevisiae* demonstraram que a sensibilidade ao 3-BP era potenciada por tratamentos que levavam à diminuição da concentração intracelular de glutathiona, reforçando a ideia de que a glutathiona deverá ter um papel importante na ação do 3-BP.

Além da HK II verificou-se também que o 3-BP afetava outros alvos intracelulares nomeadamente a GAPDH [102-104], piruvato desidrogenase [105], 3-fosfoglicerato cinase [104], succinato desidrogenase [102, 104] e a V-ATPase [106], muito provavelmente por alquilação de grupos -SH de resíduos de cisteína. Contrariamente a outros inibidores metabólicos antitumorais, o 3-BP afeta não só a produção de energia proveniente de glicólise, mas também o metabolismo mitocondrial, induzindo uma completa depleção de ATP e subsequente morte das células tumorais [1]. A Figura 10 apresenta um possível mecanismo de ação do 3-BP em células tumorais [107].



**Figura 10:** Possíveis mecanismos de ação do 3-BP. O 3BP entra na célula por transportadores específicos, possivelmente pelos MCTs e uma vez dentro da célula inibe a produção de ATP quer através da inibição HK II quer por inibição da fosforilação oxidativa. Figura adaptada de [107].

O 3-BP atua como agente citotóxico numa grande diversidade de linhas tumorais, nomeadamente: mieloma [108], hepatoma [109], glioblastoma [91], glioma [92], mesotelioma [110], leucemia [111], linfoma [112], mama [111], pâncreas [89] ou colorretal [113]. Além disso, verificou-se também que o 3-BP potencia o efeito citotóxico de fármacos vulgarmente utilizados em tratamentos convencionais de

quimioterapia como cisplatina, doxorubicina ou 5-fluoruracilo [114-116], podendo vir a ser utilizado como coadjuvante em tratamentos que utilizem estes compostos. Uma vez que os mecanismos de resistência associados a estes compostos envolvem muitas das vezes bombas de efluxo dependentes de ATP, o efeito do 3-BP deverá estar associado à depleção de ATP que provoca na célula. No entanto, não é de excluir que possa estar também associado à alquilação destas proteínas.

O vasto número de estudos sobre a utilização do 3-BP no combate ao cancro, quer *in vivo* quer *in vitro*, nomeadamente o estudo translacional atrás referido, que descreve a eliminação de um carcinoma hepatocelular no primeiro caso humano [90], demonstra o seu potencial uso clínico como agente antitumoral.



## Capítulo II

---

### Objetivos



## 2. Objetivos

Como exposto na introdução desta tese, o 3-bromopiruvato é um agente alquilante, análogo ao piruvato, com fortes propriedades antitumorais *in vitro* e *in vivo* e que apresenta baixa toxicidade para células saudáveis. Apesar de já se ter identificado possíveis alvos do 3-bromopiruvato, como é o caso da HK II, GAPDH ou succinato desidrogenase, o seu mecanismo de ação ainda se encontra por clarificar, nomeadamente o seu mecanismo de entrada na célula tumoral. Sendo o 3-BP derivado do piruvato e análogo do lactato, pode-se colocar a hipótese que o 3-BP possa ser um substrato adicional para os MCTs e que os principais alvos responsáveis pela especificidade e eficácia do 3-BP sejam não só os alvos intracelulares já identificados, mas também a disponibilidade destes transportadores. De facto, já há estudos publicados que indicam que o transportador SMCT1 medeia o transporte de 3-BP [117]. No entanto, este transportador atua como supressor tumoral, não se encontrando a sua expressão ativada em células tumorais, ao contrário do que acontece com os MCTs. Neste contexto, os MCTs podem agir como “cavalos de Tróia”, uma vez que a sua elevada expressão, característica de células tumorais, pode ser utilizado pelo 3-BP para entrar para dentro da célula, destruindo assim seletivamente as células tumorais. Neste trabalho, tentou-se abordar esta questão, tendo sido realizados ensaios para verificar o efeito do 3-BP em diferentes linhas celulares de cancro da mama. Por outro lado, procurou-se abordar o papel de alguns ácidos monocarboxílicos, substratos dos MCTs, na regulação da sua expressão e na sensibilidade das células ao 3-BP e correlacionar a diferente sensibilidade com os níveis de expressão dos MCTs.

Assim, foram objetivos desta tese:

1. Estudar o efeito inibitório de crescimento pelo 3-bromopiruvato em diferentes linhas celulares de cancro de mama, assim como o seu efeito no metabolismo intracelular e o mecanismo de morte envolvido;
2. Analisar o perfil de expressão proteico das diferentes linhas celulares, nomeadamente ao nível dos MCTs, utilizando anticorpos específicos e

---

correlacionar essa expressão com a sensibilidade ao 3-BP;

3. Avaliar o efeito da adição de ácidos monocarboxílicos na ação do 3-BP, e determinar nas células sujeitas aos diferentes tratamentos a expressão dos MCTs por Western-blot e imunocitoquímica;
4. Estudar o efeito do 3-bromopiruvato em linhas celulares não tumorais.

# Capítulo III

---

## Materiais e métodos



### 3. Materiais e métodos

#### 3.1. Linhas celulares

No decorrer deste trabalho foram utilizadas linhas celulares tumorais e não tumorais, designadamente:

- MCF-7, adenocarcinoma de mama, subtipo luminal A, isolada de efusão pleural, positiva para recetor de estrogénio, RE<sup>+</sup>;
- ZR-75-1, adenocarcinoma de mama, subtipo luminal A, isolada de fluido de ascites, positiva para recetor de estrogénio, RE<sup>+</sup>;
- SK-BR-3, adenocarcinoma de mama, subtipo HER2<sup>+</sup>, isolada de efusão pleural, negativa para recetor de estrogénio, RE<sup>-</sup>;
- MDA-MB-231, adenocarcinoma de mama, subtipo basal, isolada de efusão pleural, negativa para recetor de estrogénio RE<sup>-</sup>;
- MDA-MB-468, adenocarcinoma de mama, subtipo basal, isolada de efusão pleural, negativa para recetor de estrogénio RE<sup>-</sup>;
- Hs578T, adenocarcinoma de mama, subtipo basal, tumor primário, negativa para recetor de estrogénio RE<sup>-</sup>;
- Mioblastos L6 (*Rattus norvegicus*);
- Fibroblastos CCD-1090Sk, pele.

Todas as linhas celulares foram obtidas através da *American Type Culture Collection* (ATCC, EUA). As linhas MCF-7, SK-BR-3, ZR-75-1 e foram gentilmente cedidas pela Doutora Young Ko, do Instituto John Hopkins, Baltimore, EUA. Com

exceção dos mioblastos, cuja origem é de rato (*Rattus norvegicus*), todas as restantes linhas celulares são de origem humana.

### 3.2. Reagentes

Os meios de cultura *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) e *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), o soro bovino fetal (SBF), o antibiótico-antimicótico e a Tripsina-EDTA 1x, foram fornecidos pela Gibco™, INVITROGEN CORPORATION. Os reagentes 3-bromopiruvato (3-BP), ácido butírico, ácido láctico, acrilamida, azul de tripano, brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), insulina, N,N,N',N'-tetrametil-etano-1,2-diamina (TEMED), sulforrodamina B (SRB) e Triton X-100, foram fornecidos pela SIGMA. Os ácidos acético e pirúvico foram adquiridos à MERCK, a DNase e respetivo tampão à FERMENTAS, o inibidor de proteases à ROCHE, a membrana de nitrocelulose (Protan) à WHATMAN, o 3,3-diamino-benzidina (DAB) à DAKO e as lâminas revestidas de poli-lisina à THERMO-SCIENTIFIC. Os kits de TUNEL (DeadEnd™ Fluorimetric TUNEL system), de doseamento de ácido láctico e de quantificação de proteínas (BCA™ Protein Assay Kit) foram adquiridos à PROMEGA, SPINREACT e PIERCE, respetivamente. Os anticorpos e respetivos kits de processamento utilizados para imunocitoquímica ou western-blot são da marca LABVISION ou VECTOR KIT, conforme descrito na Tabela 4 Os restantes reagentes eram de qualidade *p.a.* e foram adquiridos à MERCK, SIGMA ou PANREAC.

### 3.3. Condições de cultura

No crescimento e na manutenção de culturas celulares *in vitro* no decorrer deste trabalho, estas foram mantidas em frascos apropriados de 25 cm<sup>2</sup>, designados daqui em diante por frascos T25 (Nunclon™ Δ Surface), numa estufa (SHEL LAB) a 37 °C, humidificada, com 5% de CO<sub>2</sub>. As linhas celulares MCF-7, SK-BR-3, ZR-75-1 e MDA-MB-231 foram crescidas em meio RPMI-1640 suplementado com 1% de antibiótico-antimicótico e 10% de SBF<sup>1</sup>. As linhas celulares de Hs578T, MDA-MB-468, mioblastos e de fibroblastos foram crescidos em meio DMEM, também suplementado

---

<sup>1</sup> No meio de cultura das MCF-7 foi-lhe adicionado 25 µg/ml de insulina.

com 1% de antibiótico-antimicótico e 10% de SBF. Estes meios serão designados daqui em diante por meio de cultura. As células em estudo foram mantidas sempre na fase exponencial do seu crescimento, tendo-se efetuado passagens para subcultura, uma ou duas vezes por semana. Todo o trabalho de manipulação celular foi realizado em condições de assepsia, numa câmara de fluxo laminar de segurança biológica de classe 2, tipo A (Scanlaf, MARS). Previamente à utilização da câmara, os raios UV foram ligados por um período de 15 minutos e a câmara de fluxo e todo o material foram pulverizados com etanol 70% (v/v).

### 3.4. Tripsinização e subcultura das linhas celulares

A tripsinização é o método pelo qual se destacam as células que se encontram em monocamada, pela ação da tripsina. Quando as culturas celulares atingem cerca de 80% de confluência, é necessário realizar uma subcultura (passagem), para evitar que as mesmas entrem em stresse por falta de espaço e nutrientes, possibilitando assim a sua manutenção em fase exponencial de crescimento. Deste modo, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS)<sup>2</sup> estéril (2 mL em frasco T25). De seguida, foi adicionada a solução Tripsina-EDTA 1x (0,5 mL em frasco T25) e as células foram incubadas durante alguns minutos (2-5 minutos) a 37°C, até se obter o seu destacamento, observado microscopicamente. Adicionou-se então meio de cultura (1-2 ml em frasco de cultura T25), de modo a terminar a ação da tripsina (inibida pela presença de SBF no meio de cultura). O meio de cultura, o PBS e a solução de tripsina utilizados neste processo foram pré-aquecidos a 37°C em banho termostaticado (Precistern, SELECTA).

Após a tripsinização, retiraram-se 50 µL de suspensão celular e adicionaram-se 50 µl de azul de tripano, tendo-se procedido de seguida à contagem das células na câmara de *Neubauer*. A determinação do número de células viáveis/mL da suspensão celular fez-se através da contagem das células incolores. A suspensão celular foi inoculada em frascos T25/T75 num volume final de 5/8 mL, numa densidade celular que assegurasse o crescimento adequado para a realização das experiências.

---

<sup>2</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

### 3.5. Congelamento e descongelamento de células

A criopreservação é um método que permite que as culturas celulares possam ser mantidas por longos períodos de tempo sem que ocorram grandes alterações na viabilidade celular. Este método evita igualmente a perda das características fenotípicas, o que acontece quando uma cultura já se encontra senescente, devido a um elevado número de passagens.

O congelamento das células foi realizado a partir de uma cultura celular na fase exponencial do crescimento. As células foram tripsinizadas, adicionando-se de seguida 1 mL de meio de cultura contendo 10 % DMSO, de modo a obter uma densidade celular entre  $1 \times 10^6$  e  $2 \times 10^6$  células/mL. A suspensão celular foi transferida para criotubos e estes foram colocados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  num contentor com isopropanol, para proporcionar o congelamento gradual das células e maior viabilidade. Após 24-48 horas os criotubos foram transferidos para um contentor contendo azoto líquido.

No descongelamento das células, os criotubos foram colocados em banho-maria a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . As células foram ressuspensas com um pequeno volume de meio de congelamento e colocadas num frasco T25 contendo meio de cultura completo. Neste processo colocou-se um volume superior de meio de cultura ao que normalmente se utiliza em frasco T25, para aumentar a diluição do DMSO contido no meio de congelação, reduzindo o seu grau de toxicidade. As culturas celulares foram mantidas a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  em atmosfera contendo 5%  $\text{CO}_2$  para a adesão das células. Após a adesão das células ao frasco de cultura, procedeu-se à substituição do meio de cultura, para eliminar qualquer vestígio de DMSO.

### 3.6. Preparação das soluções de ácidos carboxílicos

As soluções dos ácidos acético, butírico, láctico e pirúvico foram preparadas em PBS para uma concentração final de 100 mM, pH 7,2, e esterilizadas por autoclavagem. A solução *stock* de 3-BP foi preparada em PBS estéril frio, pH 7,2, para uma concentração final de 20 mM e esterilizada por filtração, minutos antes de cada experiência. As soluções *stock* dos restantes ácidos carboxílicos foram armazenadas a

4 °C no período máximo de uma semana. Quando necessário, foram realizadas para os ensaios diluições em tampão PBS, num volume máximo de 10% do volume final. Foi verificado o pH do meio de cultura após adição dos ácidos nas diferentes concentrações tendo-se verificado que não ocorria alteração do mesmo (7,2).

### 3.7. Avaliação da viabilidade celular

Existem diferentes métodos de avaliação da viabilidade celular baseados em ensaios funcionais, rápidos e reprodutíveis. Entre estes, destacam-se os ensaios de MTT (brometo de 3,4,5-dimetilazol-2,5-difeniltetrazólio) e de SRB (sulfurodamina B), ambos utilizados no presente trabalho. Os protocolos a seguir descritos, relativos a estes métodos, referem-se a ensaios efetuados em placas de 96 poços e a um volume de suspensão celular de 100 µL.

#### 3.7.1. Ensaio MTT

Este método avalia a atividade metabólica das células através da quantificação da redução do MTT por desidrogenases mitocondriais de células metabolicamente ativas/viáveis. A redução do MTT origina a produção de cristais de formazano, que podem ser quantificados por espectrofotometria e correlacionados com a proliferação/viabilidade celular. Este método colorimétrico, que permite estimar a citotoxicidade de um composto, foi descrito pela primeira vez por Mosmann em 1983 [118] e estudos posteriores comprovaram a sua eficiência [119, 120].

Nos ensaios realizados por este método, após tratamento pretendido, adicionaram-se 10 µL de MTT (5 mg/ml em PBS) por poço e incubaram-se as culturas mais 4 horas. O produto formazano foi solubilizado por adição de 100 µL de solução de solubilização (10% triton X-100, 0,1M HCl, 89% isopropanol) e a absorvância foi medida a 570 nm num leitor de placas (BIOTEK).

### 3.7.2. Ensaio SRB

O efeito citotóxico de um composto pode igualmente ser avaliado pelo ensaio de SRB, através da quantificação colorimétrica das proteínas celulares (biomassa total). A SRB é um corante brilhante de cor púrpura, com dois grupos sulfônicos, solúvel em água, que se liga aos resíduos de aminoácidos básicos das proteínas, em células previamente fixadas com ácido tricloroacético (TCA). O corante SRB é usado como um indicador quantitativo do conteúdo proteico da cultura celular, sendo este proporcional à densidade de células. Um aumento ou diminuição do número de células resulta numa alteração proporcional da quantidade do corante incorporado nas células em cultura, o que indica o grau de citotoxicidade causado pelo composto em estudo [121].

Após os ensaios pretendidos, as células foram fixadas com 50 µL de 10% TCA, durante 1 hora a 4 ° C, sendo lavadas de seguida com água corrente e secas ao ar durante a noite. Depois das placas estarem completamente secas, adicionou-se 100 µL de 0,4% SRB, seguido de incubação de 30 minutos a 37 °C. Após este passo de coloração, as placas foram lavadas extensivamente com 1% de ácido acético e secas ao ar. O corante ligado foi solubilizado com 10 mM Tris (100 µl por poço) e a absorvância medida a 540 nm. Para cada ensaio foi preparada uma amostra em triplicado, designada por T<sub>0</sub>, em que se removeu o meio de cultura antes da adição do composto, de forma a parar o crescimento das células. Estas amostras foram posteriormente processadas em conjunto com as restantes, servindo como controlo do conteúdo proteico inicial da respetiva linha celular.

### 3.8. Determinação da densidade celular adequada

Foi determinada a densidade celular adequada para garantir que as células se encontravam na fase exponencial de crescimento durante a realização dos diferentes estudos. Para tal, usaram-se placas de 96 poços, nas quais se plaquearam diferentes densidades de suspensão celular (0 a 3,0 x 10<sup>5</sup> células viáveis/mL). Após 24 horas de incubação para promover a adesão celular, foi removido o meio e colocado novo meio. As células foram sujeitas a nova incubação com um tempo correspondente ao período em que decorreram os ensaios e a viabilidade celular foi determinada através do

método MTT. Os resultados apresentados resultaram de pelo menos três experiências independentes, realizadas em triplicado e os dados foram tratados com o *software* GraphPad Prism 5.

### 3.9. Avaliação do efeito citotóxico do 3-BP

Para determinar o IC<sub>50</sub> do 3-BP, as células em fase exponencial foram plaqueadas, numa densidade de  $1,5 \times 10^5$  célula viáveis/ mL, 100  $\mu$ L por poço em placas de 96 poços, incubadas durante 24 horas para aderirem à placa e expostas a diferentes concentrações de 3-BP durante 16 horas. Nas células utilizadas como controlo, o 3-BP foi substituído por PBS. Como branco, utilizou-se o meio de cultura com as respetivas concentrações de composto, em duplicado. Após o tratamento, a viabilidade celular foi determinada pelos ensaios de MTT e SRB descritos anteriormente.

A percentagem de células viáveis foi determinada comparando a absorvância das suspensões celulares tratadas com o controlo (células não tratadas - correspondente a 100% de células viáveis), após subtração do respetivo branco. Os valores de IC<sub>50</sub> foram calculados através do *software* GraphPad Prism 5, aplicando uma regressão não-linear do tipo dose-resposta sigmoidal (inclinação variável), após transformação logarítmica.

### 3.10. Avaliação do efeito do 3-bromopiruvato na morfologia celular

Na avaliação do efeito do 3-BP na morfologia celular, as linhas celulares foram previamente inoculadas em câmaras (Lab-Tek® II, THERMO SCIENTIFIC) numa concentração de  $6,0 \times 10^5$  células/mL (400  $\mu$ L) e incubadas durante 24 h. Ao fim desse período de tempo, e para as diferentes linhas celulares utilizadas, o meio de cultura foi retirado e foi adicionado novo meio de cultura contendo 3-BP em concentrações correspondentes ao IC<sub>50</sub> e ao dobro do IC<sub>50</sub> da respetiva linha celular, num volume correspondente a 10% do volume total. Nas culturas controlo, o meio de cultura adicionado continha PBS, num volume correspondente a 10%. Após 16 h de incubação, as células foram observadas em microscópio invertido com contraste de fase (Slide-in module “CSU-X1” XLmulti S1, ZEISS), com uma ampliação final de 400

x. As imagens foram processadas com o *software* de tratamento de imagem Axion Vision 4.8.1.

### 3.11. Avaliação da apoptose pelo ensaio de *TUNEL*

Na determinação de células apoptóticas presentes nas culturas após exposição a diferentes concentrações de 3-BP foi utilizado o *DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System*.

As diferentes linhas celulares (ZR-75-1, MCF-7 e SK-BR-3) foram plaqueadas em placas de 6 poços numa concentração inicial de  $2,5 \times 10^5$  células viáveis/mL (2 mL) e mantidas até se obter aproximadamente 80% de confluência. O meio de cultura foi então retirado e procedeu-se ao tratamento das células, como descrito para o ensaio de morfologia (ver ponto 3.10). Como controlo positivo, as células foram tratadas com  $500 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , durante 24 horas, uma vez que está descrito que este composto induz a apoptose nestas condições [122]. Após o tratamento, removeu-se o meio de cultura, lavaram-se as células com PBS, procedeu-se à sua tripsinização e a uma nova lavagem com PBS. O meio de cultura, as soluções das lavagens e a suspensão celular resultante da tripsinização foram colocados num tubo de 15 mL, para garantir que todas as células tinham sido recolhidas (viáveis e não viáveis). A suspensão celular resultante foi centrifugada a 2000 rpm durante 10 minutos, lavada com 3 mL de PBS e, após nova centrifugação, fixada por incubação durante 15 minutos à temperatura ambiente com 3 mL de paraformaldeído 4% em PBS. Uma vez fixadas, as células foram diluídas com 8 mL de PBS, centrifugadas novamente (2000 rpm, 10 minutos), ressuspendidas em  $500 \mu\text{L}$  do sobrenadante resultante e transferidas para tubos *ependorf*. Para as diferentes experiências, centrifugaram-se 50000 células da suspensão a analisar numa *cytospin* (THERMO SCIENTIFIC) a 500 rpm, 5 minutos, temperatura ambiente, em lâminas revestidas de poli-lisina, tendo-se marcado com uma caneta hidrofóbica a região da lâmina contendo as células. Procedeu-se de seguida à permeabilização celular com a adição de Triton X-100 0,2% em PBS durante 5 minutos, e à incubação das células permeabilizadas com uma mistura contendo os oligonucleótidos e a enzima transferase terminal durante 1 hora a  $37^\circ\text{C}$ . De seguida, efetuaram-se 3 lavagens sucessivas das lâminas com PBS com a duração de 5 minutos cada. Como controlo positivo da técnica, utilizaram-se células tratadas

com DNase. Após a permeabilização das células, adicionou-se 100 µl de tampão contendo 1 U de DNase I, seguido de 10 minutos de incubação à temperatura ambiente. Após este tratamento, que origina a fragmentação do ADN, mimetizando a apoptose, as lâminas controlo foram tratadas em conjunto com as restantes. Como controlo negativo, para verificar a fluorescência basal, utilizaram-se lâminas às quais não foi adicionada enzima. Procedeu-se à montagem de lamelas em Vectashield com DAPI 0,5 µg/mL para todas as lâminas. As preparações foram observadas num microscópio de fluorescência (Slide-in module “CSU-X1” XL multi S1, ZEISS) e foram contadas no mínimo 400 células em pelo menos três campos diferentes da lâmina. Foram tiradas fotografias com a máquina digital acoplada ao microscópio e, para cada imagem, foi recolhido um plano de focagem representativo. As imagens foram processadas com o *software* de tratamento de imagem Axion Vision 4.8.1.

### 3.12. Doseamento de ácido láctico no meio de cultura

Células das linhas ZR-75-1, MCF-7 e SK-BR-3, foram plaqueadas numa densidade de  $1,5 \times 10^5$  célula viáveis/ mL (100 µL) em placas de 96 poços e tratadas com 3-BP durante 16 horas com uma concentração correspondente ao IC<sub>50</sub> de cada linha celular. O meio de cultura foi então removido e utilizado para a quantificação do ácido láctico extracelular. Foi realizado o mesmo procedimento para células não tratadas. O ácido láctico foi quantificado com a utilização de um *Kit* comercial de acordo com as instruções do fabricante e os valores normalizados para a biomassa final, avaliada pelo ensaio SRB.

### 3.13. Avaliação da reversibilidade do efeito do 3-bromopiruvato

Neste ensaio, células das linhas MCF-7, ZR-75-1 e SK-BR-3, foram plaqueadas e tratadas com 3-BP como descrito anteriormente. Ao fim das 16 horas de tratamento, o meio de cultura contendo o composto foi retirado e as células lavadas duas vezes com PBS, de modo a remover todo o composto. Seguidamente, foi adicionado novo meio de cultura sem o composto e as células incubadas por um período adicional de 48 horas. Após este período de tempo, foi efetuado o ensaio MTT como referido no ponto (ver ponto 3.7.1). Para cada ensaio foram realizadas pelo menos três

experiências independentes em triplicado. Os gráficos foram construídos utilizando o *software* GraphPad Prism 5.

### **3.14. Efeito da adição de ácidos carboxílicos na sensibilidade ao 3-bromopiruvato**

#### **3.14.1. Avaliação da viabilidade celular em células pré-incubadas em meio de cultura com ácidos carboxílicos seguido de incubação em meio com 3-BP**

Células das linhas ZR-75-1, MCF-7 e SK-BR-3 em fase exponencial de crescimento, foram plaqueadas em placas de 96 poços numa concentração de  $1,5 \times 10^5$  células viáveis/mL (100  $\mu$ L) e incubadas durante 24 horas para promover a adesão celular. Após esse tempo, substituiu-se o meio de cultura por novo meio contendo diferentes concentrações de ácidos carboxílicos (lactato, acetato, piruvato ou butirato). Após nova incubação de 24 horas, o meio foi removido, as células foram lavadas com PBS e tratadas durante 16 horas com 3-BP, numa concentração correspondente aos respetivos  $IC_{50}$  para cada linha celular. Como controlo, realizou-se um ensaio sem tratamento com 3-BP, tendo neste caso as células sido incubadas durante 16 horas em meio fresco, após remoção do meio contendo os diferentes ácidos carboxílicos. A viabilidade celular foi avaliada para cada caso pelo ensaio MTT, como descrito em 3.7.1, considerando-se 100% de viabilidade as células não sujeitas a qualquer tratamento.

No caso da linha SK-BR-3, e conforme indicado na secção dos resultados, foi efetuado um ensaio análogo, mas em que se manteve fixa a concentração de butirato (0,5 mM), tendo-se variado a concentração de 3-BP, de acordo com as concentrações previamente utilizadas para a determinação do  $IC_{50}$ . Como controlo, utilizaram-se células em que a solução de butirato foi substituída por PBS. O tratamento dos resultados e a determinação do  $IC_{50}$  do 3-BP foram realizados como descritos em 3.9.

#### **3.14.2. Avaliação da viabilidade celular em células incubadas em meio de cultura com ácidos carboxílicos e 3-BP em simultâneo**

Células das linhas ZR-75-1, MCF-7 e SK-BR-3 foram plaqueadas em placas de 96 poços, como descrito em 3.9. Após adesão celular, o meio de cultura foi removido e foi adicionado novo meio de cultura com diferentes concentrações de ácidos carboxílicos (lactato ou butirato) em conjunto com 3-BP, numa concentração correspondente ao respetivo IC<sub>50</sub> para cada linha celular. Como controlo, realizou-se um ensaio paralelo sem tratamento com 3-BP, tendo neste caso as células sido incubadas com meio contendo apenas lactato ou butirato, nas diferentes concentrações utilizadas. As células foram incubadas 16 horas e viabilidade foi avaliada pelo ensaio MTT.

### 3.15. Avaliação da expressão proteica

A expressão e localização das proteínas MCT1, MCT2, MCT4, CD147, HKII e Pgp foram avaliadas por imunocitoquímica de blocos de células parafinizadas (*cytoblocks*) e, no caso do MCT1 e MCT4, por Western-blot de extratos de proteína total.

#### 3.15.1. Preparação de cytoblocks em parafina

As linhas celulares foram mantidas em frascos T75 até uma confluência de 80-90%. Após os diferentes tratamentos descritos na secção de resultados, as culturas celulares foram sujeitas a tripsinização e centrifugação (1000 rpm à temperatura ambiente durante 5 minutos). O sobrenadante foi removido e as células foram fixadas, por incubação durante a noite, em 2-3 mL de formaldeído 3,7% em PBS. As células fixadas foram novamente centrifugadas e os *pellets* obtidos foram processados num processador de tecido automático (TP1020, LEICA) e incluídos em blocos de parafina (Unidade de formação de blocos, EG1140H, LEICA).

#### 3.15.2. Imunocitoquímica

A imunocitoquímica é um método direto que permite analisar e identificar a distribuição subcelular de proteínas. A coloração imunológica é realizada por anticorpos específicos para a proteína em estudo, por meio de uma deteção cromogénica. A enzima conjugada com o anticorpo secundário une-se ao substrato, produzindo um precipitado de cor no local da proteína.

Para os ensaios de imunocitoquímica, secções de 4  $\mu\text{m}$  do *cytoblock* foram desparafinizados e reidratados. As lâminas foram submetidas ao tratamento adequado de recuperação do antigénio (Tabela 4), lavadas com PBS e incubadas com 3% de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em metanol para bloquear a atividade endógena da peroxidase. As lâminas foram tratadas com a respetiva solução de bloqueio 10 (Kit LABVISION) ou 20 minutos (Kit Vector), após o que foram incubadas com os anticorpos primários apropriados. Os tempos e as condições de incubação para cada anticorpo são descritos na Tabela 4. As lâminas foram então lavadas com PBS, incubadas com o anticorpo secundário biotilado por 10 ou 30 minutos e tratadas com uma solução de peroxidase estreptavidina/avidina durante 10 minutos à temperatura ambiente ou 45 minutos a 37 °C, dependendo do sistema de deteção utilizado (Kit LABVISION ou Kit VECTOR, respetivamente). A imunorreatividade foi desenvolvida pela adição do DAB durante 10 minutos. Todas as lâminas foram para contracoloração com hematoxilina/eosina, em aparelho automático (Entellan<sup>TM</sup>). Os controlos positivos para cada anticorpo da imunocoloração estão descritos na Tabela 4. As lâminas foram visualizadas num microscópio de contraste de fase com uma magnificação de 400x.

**Tabela 4:** Procedimento imunocitoquímico para avaliar a expressão das diferentes proteínas (MCT1, MCT2, MCT4, CD147, HK II e Pgp).

Proteína	Controlo Positivo	Recuperação Antigénica	Sistema de Deteção	Anticorpo Primário (companhia e referência; diluição e condições de incubação)
MCT1	Carcinoma Cólon	Tampão Citrato (10mM, pH=6) 98°C; 20 min	R.T.U. VECTASTAIN Elite ABC Kit (VECTOR laboratories)	Chemicon (AB3538P) 1:200, <i>overnight</i> , temperatura ambiente
MCT2	Rim	Tampão Citrato (10mM, pH=6) 98°C; 20 min	Ultravision Detection System Anti-polyvalent, HRP (Lab Vision Corporation)	Santa Cruz (sc-50322) 1:200, 2 horas, temperatura ambiente
MCT4	Carcinoma Cólon	Tampão Citrato (10mM, pH=6), 98°C; 20 min	R.T.U. VECTASTAIN Elite ABC Kit (VECTOR laboratories)	Santa Cruz (sc-50329), 1:500, 2 horas, temperatura ambiente
CD147	Carcinoma Cólon	EDTA (1mM, pH=8) 98°C; 20 min	Ultravision Detection System Anti-polyvalent, HRP (Lab Vision)	Zymed (187344) 1:500, 2 horas, temperatura ambiente

Proteína	Controlo Positivo	Recuperação Antigénica	Sistema de Deteção	Anticorpo Primário (companhia e referência; diluição e condições de incubação)
			Corporation)	
Pgp	Carcinoma Cólon	Tampão Citrato (10mM, pH=6) 98°C; 20 min	R.T.U. VECTASTAIN Elite ABC Kit (VECTOR laboratories)	Santa Cruz (sc-13131) 1:300, <i>overnight</i> , temperatura ambiente
HK II	Carcinoma Cólon	EDTA (1mM, pH=8) 98°C; 20 min	Ultravision Detection System Anti-polyvalent, HRP (Lab Vision Corporation)	AvCam (av-104836) 1:750, 2 horas, temperatura ambiente

### 3.15.3. Preparação de extratos proteicos

Para cada linha celular foi colocada em triplicado a respetiva suspensão celular numa placa de 6 poços, tendo-se colocado entre 250 000 e 350 000 células em cada poço. Depois das células terem atingido cerca de 80% de confluência, foi retirado o meio de cultura e as células foram colocadas em gelo e lavadas com 1 mL de PBS frio. O PBS de lavagem foi retirado e foi adicionado 200 µL de tampão de lise<sup>3</sup>. As células foram depois raspadas para se destacarem do fundo da placa e a suspensão transferida para um tubo *eppendorf*, previamente arrefecido. A suspensão foi deixada a incubar durante 15 minutos em gelo, sendo a mistura levada ocasionalmente ao vórtex. Por fim, o lisado foi centrifugado (13000 rpm, 15 min, 4°C) e recolheu-se o sobrenadante contendo o extrato proteico para análise.

### 3.15.4. Quantificação de proteínas

Os ensaios de quantificação foram realizados utilizando o *kit* “BCA™ Protein Assay Kit” (Pierce Biotechnology, Inc.), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. Este método combina a redução do Cobre (Cu<sup>2+</sup> a Cu<sup>+</sup>) pela proteína num meio alcalino, apresentando-se a solução no final com cor púrpura. Este complexo

<sup>3</sup> Tampão de lise: 150 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 1% Triton X-100, de 1% NP40, 50 mM Tris-HCl pH 7,5 e 1/7 de inibidor de proteases, Roche Applied Sciences.

solúvel em água apresenta uma elevada absorvância a 562 nm, proporcional à concentração de proteína.

Efetuuou-se uma curva de calibração (D.O. *versus* concentração de proteína total) com a albumina do soro bovino (BSA) para cada ensaio. Os padrões para a curva de calibração, assim como as diferentes amostras a testar, foram preparadas de acordo as instruções do fabricante, tendo sido efetuada a leitura dos valores de absorvância a 562 nm após 30 minutos de incubação. A concentração de proteína em cada amostra foi determinada através da curva de calibração construída, tendo em conta o fator de diluição da amostra.

### 3.15.5. Análise de proteínas por SDS-PAGE

As proteínas obtidas como descrito no ponto 3.15.3., foram analisadas por SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) num sistema de eletroforese vertical (BIORAD). A cassette foi colocada no respetivo suporte após lavagem com água destilada e etanol. A solução de gel resolvente 12,5%<sup>4</sup>, foi aplicada na cassette até cerca de 1,5 cm do topo e de seguida foi colocada cerca de 1 ml de água destilada. Depois do gel resolvente estar polimerizado, a água foi retirada e foi aplicado o gel de empacotamento<sup>5</sup>, sendo inserido o pente no final da aplicação. Após a polimerização, o tanque da eletroforese foi enchido com o tampão de eletroforese<sup>6</sup> e o pente retirado. Foram preparados 20 µg de extrato proteico por solubilização com o tampão de aplicação 4x<sup>7</sup> e desnaturadas por fervura durante 5 min. As proteínas assim preparadas, assim como o padrão de pesos moleculares (*Low Range Molecular Weight*, BIORAD), também fervido durante 5 min, foram aplicadas no gel de poliacrilamida e corridas a uma amperagem constante de 15 mA até as amostras entrarem no gel resolvente, após o que se aumentou a amperagem para 20 mA, até a

---

<sup>4</sup> Composição da solução de gel resolvente: 1,8 ml Tris/HCl 1,5 M pH 8,8, SDS 0,4%; 2,4 ml Acrilamida 30% /Bisacrilamida 1%; 3,0 ml H<sub>2</sub>O destilada, 57 µl PSA 10 %; 6 µl TEMED.

<sup>5</sup> Composição da solução de gel de empacotamento: 0,625 ml Tris/HCl 0,5 M pH 6,8, SDS 0,4%; 250 µl Acrilamida 30% /Bisacrilamida 1%; 1,6 ml H<sub>2</sub>O destilada, 20 µl PSA 10 %; 2,5 µl TEMED.

<sup>6</sup> Composição do tampão de electroforese: 25 mM Tris, 192 mM glicina, 0,1% SDS, pH 8.3.

<sup>7</sup> Composição do tampão de aplicação 4x: 0,25 M Tris/HCl pH 8.3; 8% SDS; 40% Glicerol; 20% 2-mercaptoetanol.

marca azul do tampão atingir a parte inferior do gel. No fim da eletroforese, o gel foi corado durante a noite com solução azul de Comassie R-250<sup>8</sup>, seguindo-se várias lavagens com solução descorante até visualização das bandas proteicas e aquisição da imagem ou transferido para uma membrana de nitrocelulose como descrito em 3.15.6.

### 3.15.6. Western-Blot

Após as amostras de proteicas terem sido separadas e analisadas por SDS-PAGE, procedeu-se à realização do Western-Blot propriamente dito.

As proteínas, foram transferidas para membranas de nitrocelulose com a utilização do tampão de transferência<sup>9</sup>. Terminada a transferência, procedeu-se á lavagem das membranas com Tris-Buffered Saline Tween-20<sup>10</sup> (TBST) e efetuou-se o bloqueio das membranas com o tampão de bloqueio (5% leite em pó desnatado em TBST) durante uma hora, à temperatura ambiente e com agitação suave. As membranas foram lavadas 3 vezes com TBST e incubadas durante a noite a 4°C com os anticorpos primários (MCT1, MCT4) nas diluições descritas na Tabela 4. A actina foi utilizada como controlo de *loading*. Após a incubação, as membranas foram lavadas 3 vezes com TBST e colocaram-se os *blot* em solução de anticorpo secundário apropriado, conjugado com peroxidase, durante uma hora, à temperatura ambiente, com agitação suave. Foram efetuadas 2 lavagens em TBST e uma com TBS, com a duração de 10 minutos cada, à temperatura ambiente, com agitação suave. Após a lavagem, colocou-se cada membrana em solução de ECL<sup>11</sup> e envolveram-se em papel aderente. Colocaram-se as membranas em cassetes com filme autorradiográfico na câmara escura, durante diferentes períodos de tempo, e procedeu-se à sua revelação.

---

<sup>8</sup> Composição da solução azul de Comassie R-250: 0,05% Azul de Comassie R-250; 0,5% ácido acético; 20% metanol.

<sup>9</sup> Tampão de transferência: 192mM Glicina; 25mM Tris Base; 20% Metanol – pH 8,3.

<sup>10</sup> Tris-Buffered Saline Tween-20: TBST- Tris-HCl 20 mM, NaCl 137 mM, 0,1% (v/v) Tween-20®.

<sup>11</sup> Solução de ECL: 100 mM Tris pH 8,5; 90 mM Ácido Coumárico; 100mM Luminol; 0,5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

O teor de proteína foi avaliado através da medição da densidade de cada banda e normalizada com o conteúdo de actina através da utilização do *software* Chemidoc XRS (BIORAD).

### 3.16. Tratamento estatístico

A análise estatística e a construção de gráficos foram realizadas recorrendo ao *software* GraphPad Prism 5. Os resultados obtidos ao longo do trabalho são expressos como média  $\pm$  desvio padrão, para  $n$  experiências independentes. O significado estatístico dos resultados foi analisado 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 IV

---

Resultados

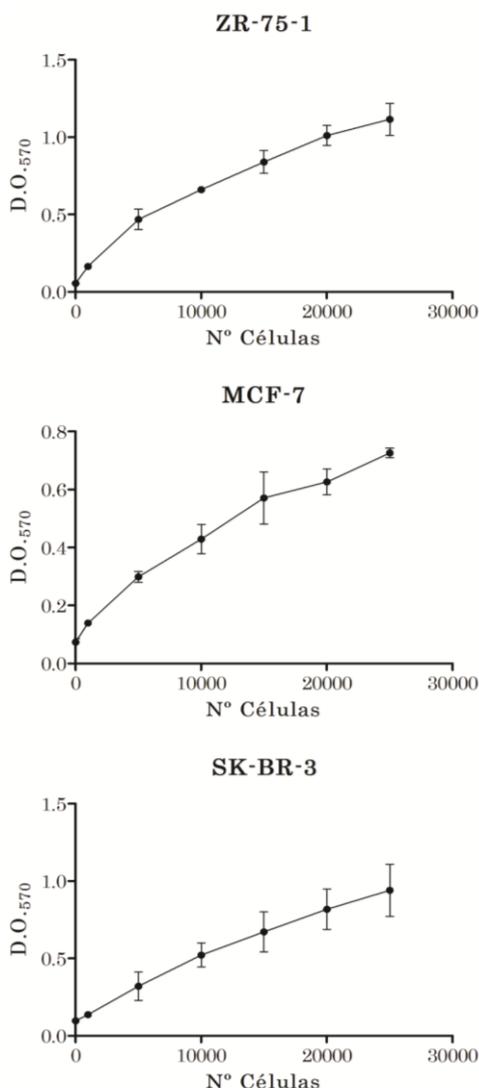


## 4. Resultados

### 4.1. Efeito do 3-BP em linhas celulares de cancro de mama

#### 4.1.1. Determinação da densidade celular adequada para inoculação

No presente trabalho pretendeu-se avaliar a citotoxicidade do 3-BP em diferentes linhas celulares de cancro de mama (ZR-75-1, MCF-7 e SK-BR-3). Antes de se



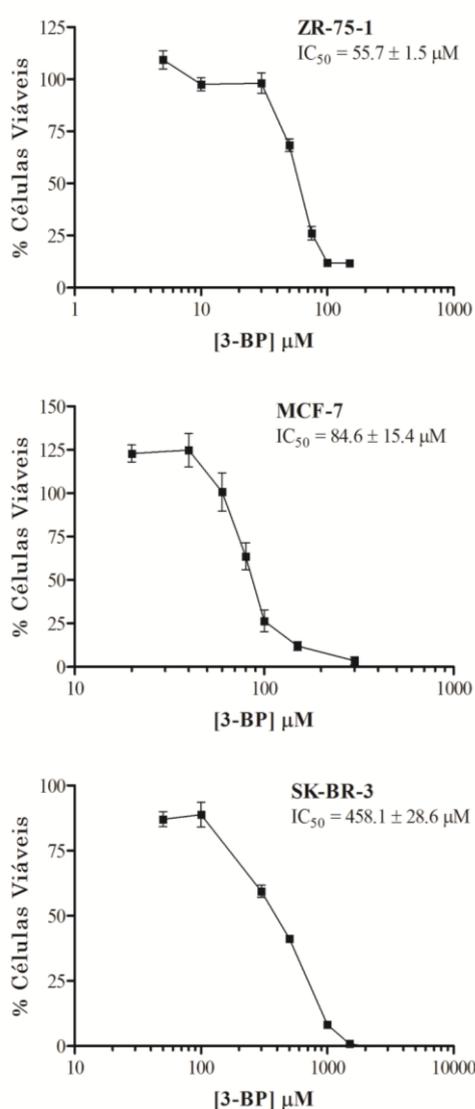
proceder aos estudos de viabilidade na presença do composto, foi determinada a densidade celular inicial adequada para que, durante o tempo do ensaio, as células se encontrassem em fase exponencial de crescimento, nunca atingindo a confluência. Deste modo, foram inoculadas diferentes densidades celulares para cada linha, sendo as células incubadas por um período de tempo idêntico ao utilizado nos ensaios de citotoxicidade (24 + 16 horas). Ao fim desse tempo, procedeu-se ao ensaio MTT e foi construído o gráfico da D.O.<sub>570</sub> em função do número de células inoculadas (Figura 11). Foi escolhido para a realização dos ensaios subsequentes e para todas as linhas celulares o valor de 15000 células viáveis, compreendido na zona linear de todos os gráficos obtidos. É de referir que foram posteriormente efetuados ensaios com uma maior duração (até 24 + 16 + 48 horas), tendo-se verificado que o número de

**Figura 11:** Correlação entre a densidade celular inicial das linhas celulares em estudo (ZR-75-1, MCF-7 e SK-BR-3) e a absorvância final a 570 nm, avaliada pelo ensaio de MTT. As células foram incubadas nas mesmas condições em que decorreram os ensaios de determinação do IC<sub>50</sub> do 3-BP (ver ponto 3.9). Os resultados representam os valores médios ± D.P. de triplicados de pelo menos três experiências independentes.

células determinado era também apropriado para estes ensaios (resultados não apresentados).

#### 4.1.2. Efeito citotóxico do 3-BP em células de cancro de mama

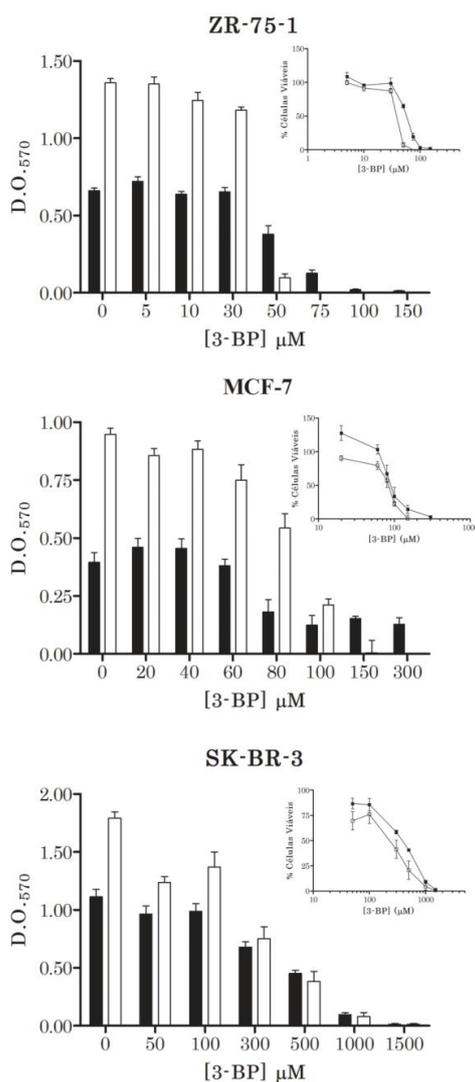
A viabilidade de linhas celulares de cancro de mama (ZR-75-1, MCF-7 e SK-BR-3), incubadas na presença de diferentes concentrações de 3-BP, foi avaliada pelo ensaio de MTT (ver ponto 3.7.1). Num primeiro ensaio, testaram-se três tempos diferentes de incubação da linha celular MCF-7: 16, 24 e 48 horas. Embora se tenha verificado



uma diminuição do valor do IC<sub>50</sub> com o aumento do tempo de incubação, essa diferença não foi relevante, tendo-se obtido os valores de IC<sub>50</sub> de 84,6 ± 15,4; 82,8 ± 11,1 e 72,9 ± 12,4 μM para os tempos de 16, 24 e 48 horas de incubação, respetivamente. Assim, foi escolhido o tempo mais curto de incubação, correspondente a 16 horas, para os ensaios subsequentes nas restantes linhas celulares, uma vez que foi já evidente para esse tempo o efeito citotóxico do 3-BP. Em todas as linhas celulares, o 3-BP levou a um aumento da morte das células, de uma forma dependente da concentração. No entanto, as três linhas testadas apresentaram diferentes sensibilidades ao 3-BP (Figura 12), tendo este um maior efeito nas linhas celulares RE<sup>+</sup> ZR-75-1 e MCF-7 (IC<sub>50</sub> de 55,7 ± 1,5 e 84,6 ± 15,4 μM, respetivamente). A linha RE<sup>-</sup> SK-BR-3 foi a que apresentou maior resistência à ação do composto, tendo-se obtido um IC<sub>50</sub> de 458,1 ± 28,6 μM.

**Figura 12:** Efeito do 3-BP na viabilidade celular das linhas celulares de cancro de mama ZR-75-1, MCF-7 e SK-BR-3, após 16 horas de incubação na presença do composto, avaliado pelo ensaio de MTT. Os resultados representam os valores médios ± D.P. de triplicados de pelo menos três experiências independentes.

O ensaio de MTT é um método indireto para estimar a citotoxicidade de um composto, com base na atividade metabólica das células [118], pelo que se procedeu igualmente ao ensaio de SRB para avaliar o efeito do 3-BP na viabilidade celular. Este método, como referido anteriormente, estima a biomassa celular de acordo com o conteúdo proteico das células [123]. Foi encontrada para as três linhas a mesma ordem de sensibilidade, tendo sido os valores de  $IC_{50}$  da mesma ordem de grandeza do ensaio de MTT:  $42,6 \pm 4,7$ ;  $67,8 \pm 1,5$  e  $405,0 \pm 88,2 \mu\text{M}$ , para as linhas celulares ZR-75-1, MCF-7 e SR-BR-3, respetivamente. Adicionalmente, para concentrações de



3-BP superiores ao valor de  $IC_{50}$ , foi encontrado um menor teor em biomassa celular, comparativamente aos valores  $T_0$  (correspondentes à biomassa celular no momento da adição do composto), sendo praticamente nulo para elevadas concentrações de 3-BP, o que indica que o seu efeito é citotóxico e não apenas citostático.

Foi também estudado se as células viáveis tratadas com 3-BP tinham o crescimento afetado, mesmo após a remoção do composto, ou seja, se este tinha um efeito irreversível. Para tal, depois do tratamento, removeu-se o meio (contendo 3-BP e as células mortas) e as células foram lavadas e incubadas com meio sem composto, por um período adicional de 48h como descrito em 3.13. A Figura 13 apresenta os resultados obtidos para a viabilidade celular, determinada pelo ensaio de MTT, antes (barras pretas) e após (barras brancas)

**Figura 13:** Capacidade das células de cancro de mama recuperarem após tratamento com 3-BP, avaliada pelo ensaio de MTT. As barras representam a quantidade de MTT reduzido, estimada pela  $D.O._{570}$ , em função da concentração de 3-BP antes (barras pretas) e após (barras brancas) um período de recuperação de 48 horas em meio sem composto. Os insertos em cada gráfico representam a viabilidade celular, normalizada para o controlo: (□) células recuperadas, (■) células não recuperadas. Os resultados representam os valores médios  $\pm$  D.P. de triplicados de pelo menos três experiências independentes.

essa incubação. As células tratadas com concentrações de 3-BP inferiores ao  $IC_{50}$  da respectiva linha foram capazes de recuperar e de se dividir de forma semelhante às células não tratadas. No entanto, para concentrações de 3-BP próximas ou superiores ao  $IC_{50}$ , o efeito foi irreversível e as células não recuperaram, tendo sido este efeito mais notório na linha mais sensível, ZR-75-1. De facto, verifica-se que as células previamente sujeitas à ação do composto nestas concentrações acabam por morrer, no caso das linhas ZR-75-1 e MCF-7, ou deixam de proliferar no caso da linha SK-BR-3. Na linha ZR-75-1, verificou-se, após o período de recuperação, uma diminuição de cerca de 90% da viabilidade celular para uma concentração de 3-BP de 50  $\mu$ M, não se encontrando células viáveis após este tempo, para concentrações de 3-BP a partir de 75  $\mu$ M. Na linha MCF-7, quando se utilizou uma concentração de 3-BP de 100  $\mu$ M, ocorreu uma paragem da proliferação das células viáveis e para concentrações a partir de 150  $\mu$ M não se observaram células viáveis, após a incubação em meio sem composto. Relativamente às células SK-BR-3, o comportamento foi diferente e, apesar de não se ter observado morte das células tratadas que tinham permanecido viáveis, estas deixaram de proliferar para concentrações de 3-BP a partir de 500  $\mu$ M.

#### 4.1.3. Influência do 3-BP na indução da apoptose

Para as linhas celulares em estudo, foi analisada, através no ensaio de TUNEL, a capacidade do 3-BP induzir apoptose. Foi verificada marcação positiva em células de todas as linhas tratadas com 3-BP, apesar de se verificar uma maior fragmentação do ADN e da condensação da cromatina nas células controlo tratadas com  $H_2O_2$  (Figura 14 a). A Figura 14 b apresenta os resultados quantitativos do ensaio. Na linha celular ZR-75-1 obteve-se um número semelhante de células apoptóticas para ambas as concentrações de 3-BP utilizadas ( $IC_{50}$  e  $2 \times IC_{50}$ ). No entanto, para as outras duas linhas, o número de células apoptóticas aumentou com o aumento da concentração de 3-BP. A percentagem de células apoptóticas em células de todas as linhas tratadas com o  $IC_{50}$  do 3-BP foi menor que 50 %, ao passo que a viabilidade destas células foi cerca de 50 % conforme estimado pelo ensaio de azul tripano. Assim, o efeito inibitório do 3-BP pode também ser devido a outra forma de morte celular como por exemplo necrose ou autofagia.

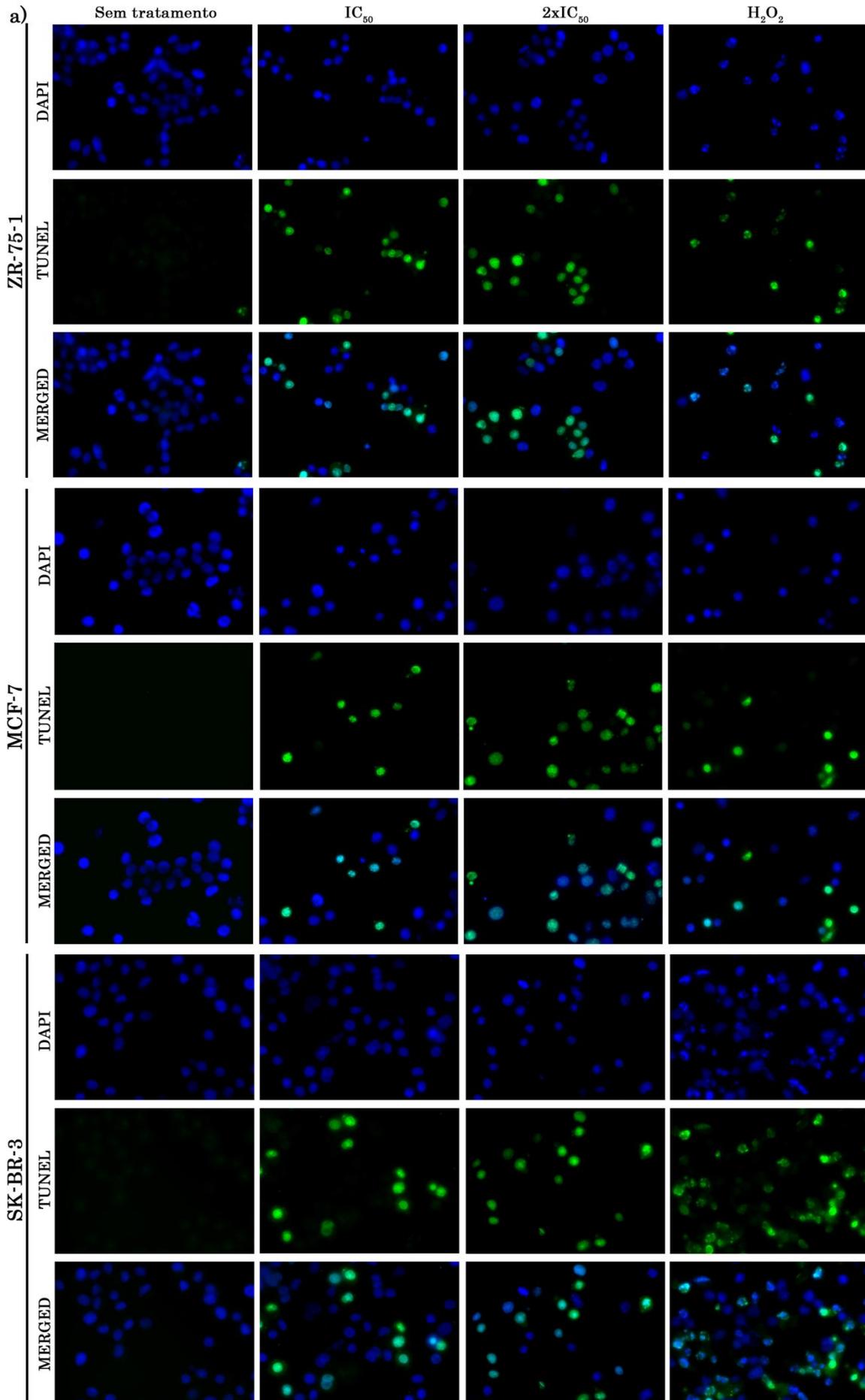
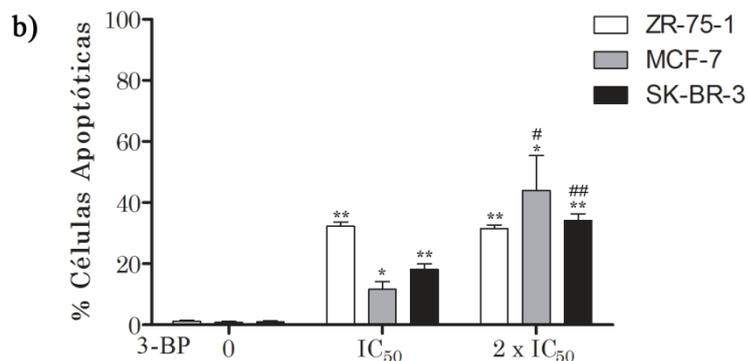


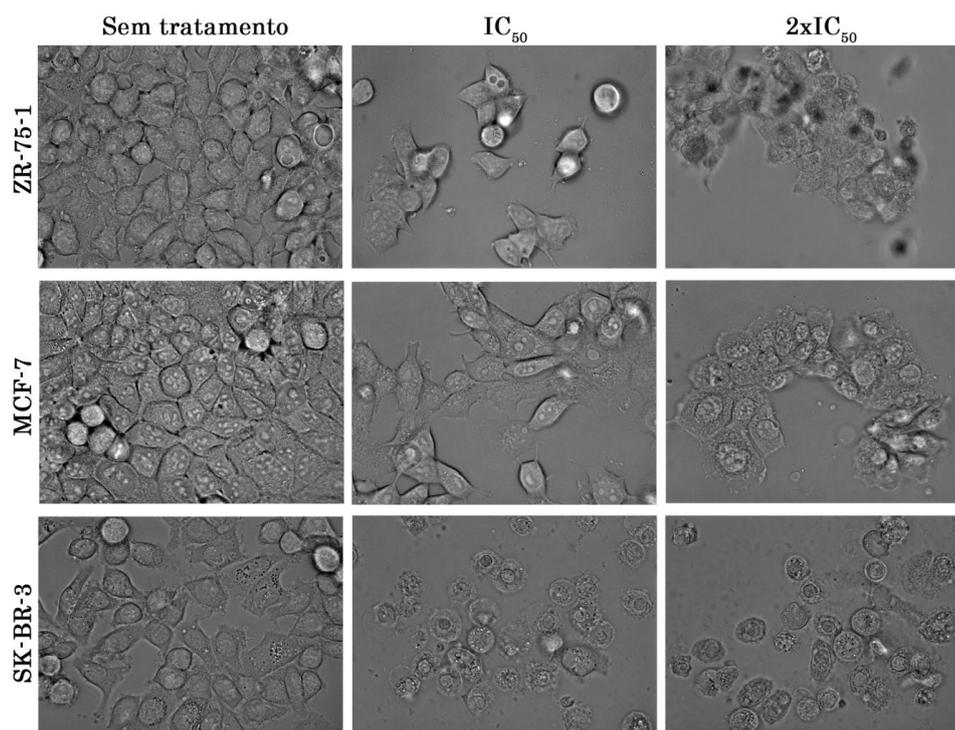
Figura 14: Continua na página seguinte.



**Figura 14:** Apoptose induzida pelo 3-BP nas linhas celulares ZR-75-1, MCF-7 e SK-BR-3. (a) Células não tratadas e tratadas com 3-BP (IC<sub>50</sub> e 2 x IC<sub>50</sub>) ou com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (controlo positivo), foram analisadas pelo ensaio de TUNEL, coradas com DAPI e visualizadas por microscopia de fluorescência. (b) Resultados quantitativos do ensaio de TUNEL de células não tratadas e tratadas com 3-BP. Os resultados apresentados são relativos ao valor médio ± D.P. de duas experiências independentes. O significado estatístico foi estimado pelo teste *t*-student: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  – significativamente diferentes das células não tratadas; #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$  – significativamente diferentes das células tratadas com IC<sub>50</sub> de 3-BP.

#### 4.1.4. Alterações morfológicas induzidas pelo 3-BP

Foi igualmente analisado o efeito do 3-BP na morfologia das células. Para todas as linhas foram observadas alterações morfológicas com o tratamento (Figura 15). Observou-se opacidade do citoplasma, retração celular, aumento da vacuolização e, no caso da linha celular SK-BR-3, a presença de núcleos proeminentes. Para além disso, verificou-se perda da integridade e diminuição da viabilidade celular. Este fenótipo foi mais acentuado nas células tratadas com 2 x IC<sub>50</sub> de 3-BP, para todas as linhas.



**Figura 15:** Alterações morfológicas induzidas pelo 3-BP nas linhas celulares ZR-75-1, MCF-7 e SK-BR-3 não tratadas e tratadas com 3-BP (IC<sub>50</sub> e 2 x IC<sub>50</sub>).

#### 4.1.5. Ação do 3-BP no metabolismo celular

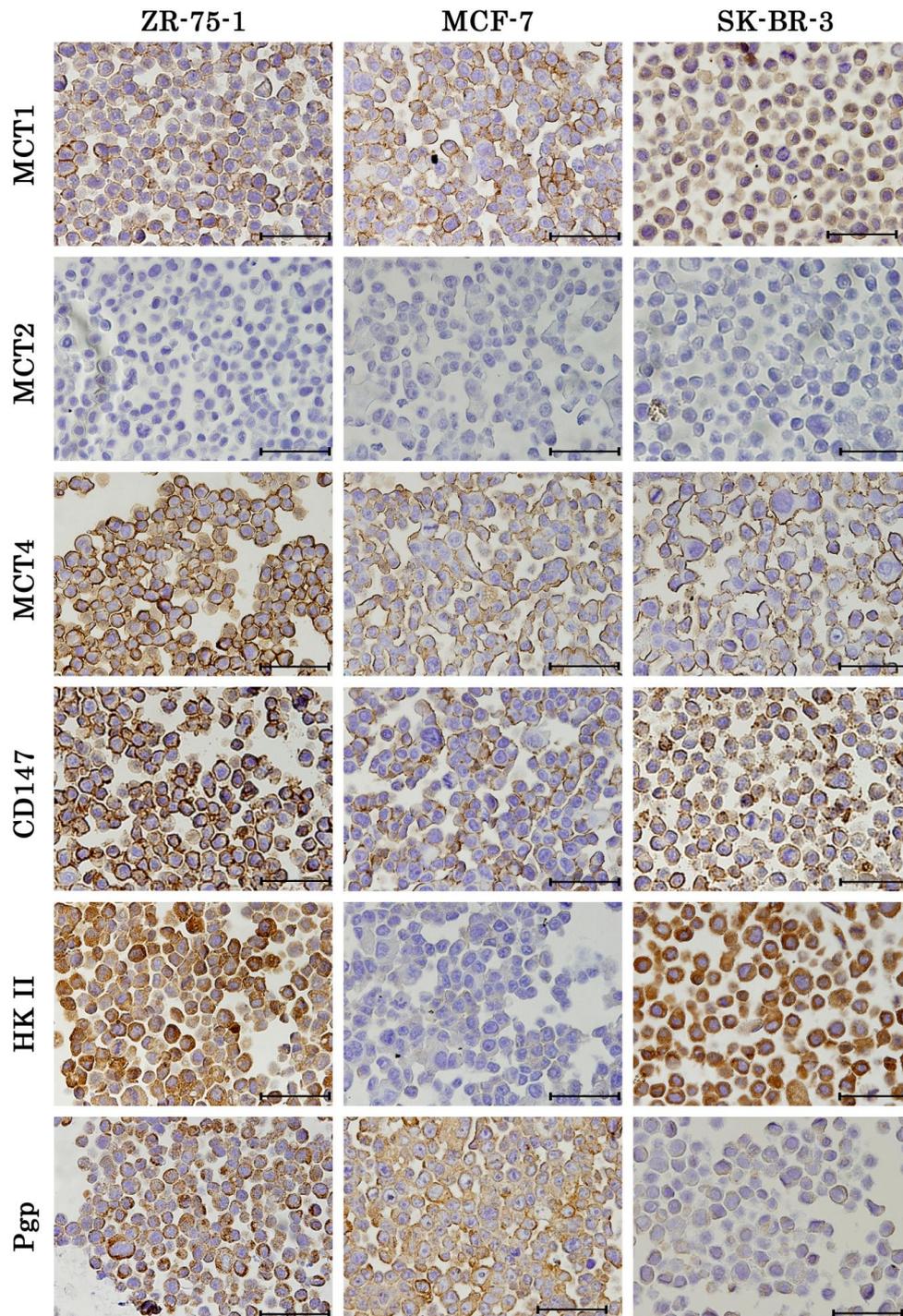
O 3-BP inibe a glicólise, conduzindo à depleção do ATP celular e consequentemente à morte da célula. Como consequência, será esperada uma alteração nos níveis de lactato exportado pelas células tratadas. Desta forma, procedeu-se à quantificação do ácido láctico extracelular em células não tratadas e tratadas com o IC<sub>50</sub> de 3-BP (Tabela 5). Foi observado para todas as linhas celulares uma diminuição dos níveis de ácido láctico exportado, em concordância com o efeito inibitório do 3-BP na via glicolítica, sendo esse efeito menos notório na linha celular mais resistente ao composto, SK-BR-3.

**Tabela 5:** Concentração extracelular de ácido láctico em linhas celulares de cancro de mama (ZR-75-1, MCF-7 e SK-BR-3) incubadas durante 16 horas na ausência ou presença do IC<sub>50</sub> de 3-BP. Os resultados foram normalizados para a biomassa total, dividindo a quantidade de ácido láctico total pela densidade ótica a 540 nm, determinada pelo ensaio de SRB. O significado estatístico foi estimado pelo teste *t* student: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,005$  – significativamente diferentes das células não tratadas.

Concentração de ácido láctico ( $\mu\text{g}$ ácido láctico / biomassa total)		
Células	Sem tratamento	IC <sub>50</sub>
ZR-75-1	30,0 $\pm$ 4,0	22,4 $\pm$ 0,9 **
MCF-7	19,0 $\pm$ 0,3	11,1 $\pm$ 0,8 ***
SK-BR-3	19,2 $\pm$ 0,9	16,4 $\pm$ 1,0 *

#### 4.1.6. Expressão basal e na presença de 3-BP de MCT1, MCT2, MCT4, CD147, HKII e Pgp, em linhas celulares de cancro de mama

O 3-BP, sendo um derivado do piruvato, provavelmente utiliza os mesmos transportadores de membrana que outros monocarboxilatos (piruvato, lactato, butirato ou acetato), as isoformas dos MCTs 1-4. A Figura 16 mostra a expressão basal destas proteínas nas três linhas celulares de cancro de mama em estudo (ZR-75-1, MCF-7 e SK-BR-3). Excluiu-se dessa análise o MCT3, uma vez que este se localiza exclusivamente em células epiteliais de retina e epitélio do plexo coróide [59, 76, 124]. Além dos MCTs, analisou-se também a expressão da proteína CD147 (proteína chaperona do MCT1 e MCT4), da HK II (enzima glicolítica alvo do 3-BP) e da Pgp (proteína envolvida na multirresistência a fármacos). Relativamente às proteínas envolvidas no transporte de monocarboxilatos, verificou-se que as proteínas MCT1, MCT4 e CD147 apresentam expressão em todas as linhas celulares, ao contrário do MCT2 cuja expressão não foi visualizada. Na linha mais sensível ao 3-BP (ZR-75-1) observou-se uma maior expressão das proteínas CD147 e MCT4. A linha SK-BR-3, a mais resistente ao 3-BP, apresentou uma menor expressão de MCT1, nomeadamente ao nível da membrana plasmática. Relativamente à HK II e à Pgp, apesar de se encontrarem diferenças na sua expressão nas diferentes linhas, nada indica que esta expressão esteja correlacionada com a diferença de sensibilidade ao 3-BP, uma vez que foi encontrada na linha mais resistente, SK-BR-3 uma baixa expressão da Pgp e uma expressão de HK II semelhante à observada na linha mais sensível.



**Figura 16:** Avaliação por imunocitoquímica da expressão das proteínas MCT1, MCT2, MCT4, CD147, HK II e Pgp nas linhas celulares ZR-75-1, MCF-7 e SK-BR-3. A barra corresponde a 50  $\mu$ m. Os resultados são representativos de duas experiências independentes.

Foi ainda avaliada a expressão das proteínas em estudo envolvidas no transporte de monocarboxilatos (MCT1, MCT2, MCT4, CD147) na linha celular SK-BR-3, mais resistente à ação do 3-BP. Os resultados referentes a esta análise serão apresentados

posteriormente em conjunto com resultados da subsecção seguinte (Figura 22), tendo-se verificado que a adição do 3-BP não induziu modificações significativas na expressão destas proteínas.

## **4.2. Influência de ácidos carboxílicos metabólicos na ação do 3-BP em linhas celulares de cancro de mama**

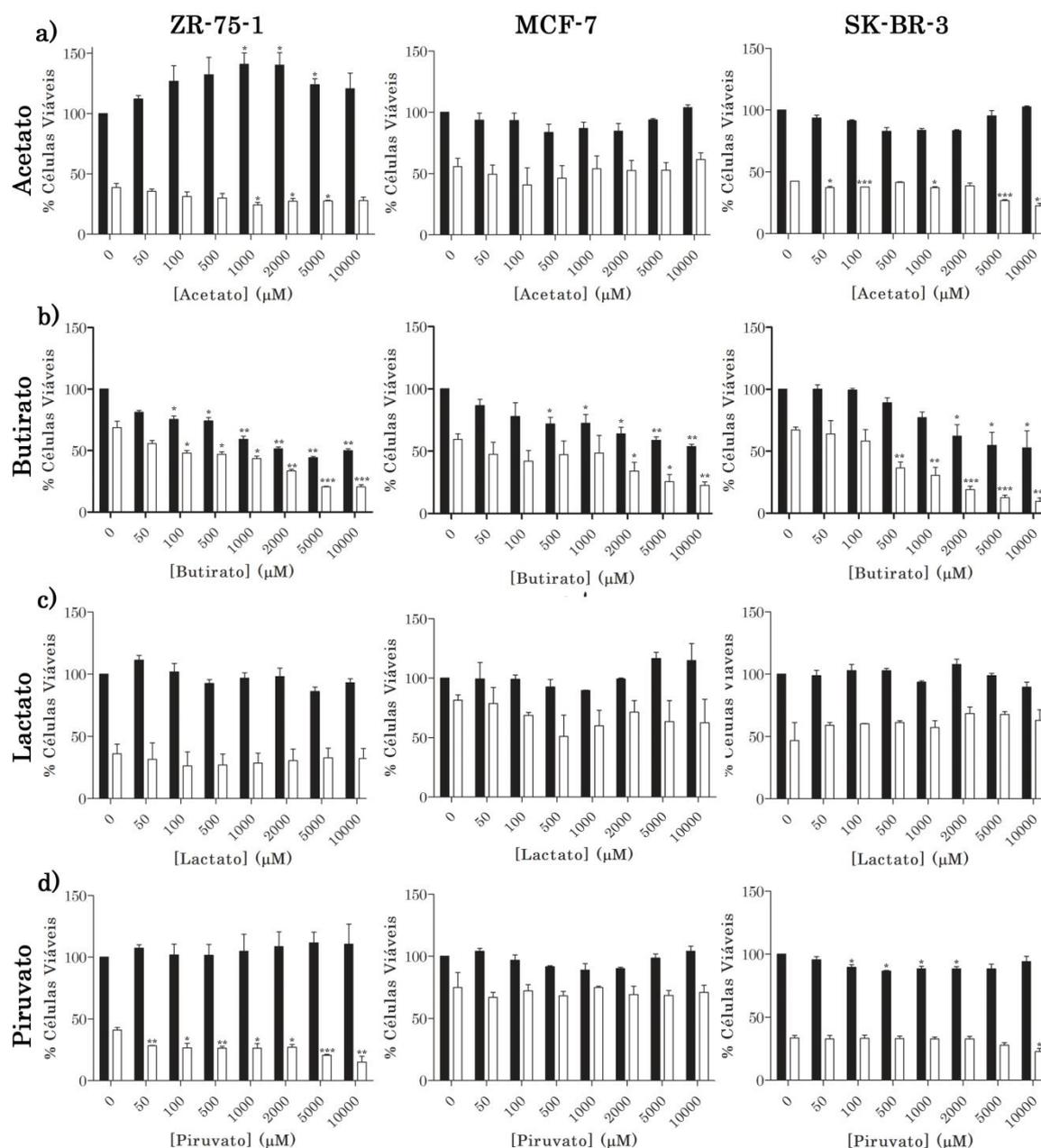
### **4.2.1. Citotoxicidade do 3-BP em células pré-incubadas com ácidos carboxílicos**

Tratando-se o 3-BP de um derivado do piruvato, foi-se avaliar a influência de diferentes ácidos monocarboxílicos de cadeia curta (acetato, butirato, lactato e piruvato) na atividade antitumoral do 3-BP. Para tal, as células foram pré-incubadas com os referidos ácidos em diferentes concentrações antes de se proceder ao tratamento com 3-BP ( $IC_{50}$  correspondente a cada linha) e foi avaliada a viabilidade celular pelo ensaio de MTT. Como controlo, foi realizado um ensaio análogo sem a adição de 3-BP, para verificar se o próprio ácido provocava alterações na proliferação celular. A Figura 17 apresenta os resultados da viabilidade das células tratadas com os diferentes ácidos. É de notar que foram obtidos diferentes comportamentos das células conforme o ácido adicionado, quer para as células tratadas apenas com o ácido em estudo (Figura 17, barras pretas), quer em conjunto com 3-BP (Figura 17, barras brancas).

O tratamento das células durante 24 horas apenas com acetato, lactato ou piruvato, em concentrações que variaram entre 50 e 10000  $\mu$ M não levou a qualquer perda de viabilidade das células. No caso das células tratadas só com butirato, foi observado um comportamento diferente, tendo-se verificado que o próprio ácido é citotóxico, uma vez que ocorreu um aumento da morte celular à medida que se aumentava a sua concentração (Figura 17, barras pretas).

Relativamente às células que foram tratadas com 3-BP após a pré-incubadas com os ácidos, também se verificaram diferenças na viabilidade celular, conforme o ácido utilizado (Figura 17, barras brancas). No que diz respeito ao lactato, não existiu alteração da viabilidade, independentemente da concentração de ácido utilizado na

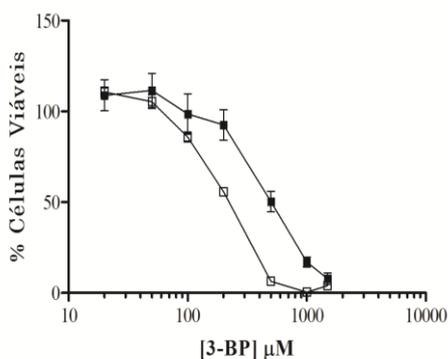
pré-incubação. O piruvato e acetato apresentaram comportamentos diferentes consoante a linha celular em estudo. Para o caso do piruvato, tal como para o lactato, não se verificou alteração na viabilidade das células MCF-7. No entanto, nas restantes linhas, com a adição do ácido nas concentrações mais elevadas observou-se um aumento do efeito citotóxico do 3-BP, ainda que ligeiro, mais notório na linha ZR-75-1. Relativamente ao pré-tratamento com acetato, o comportamento foi análogo, mas neste caso só se verificou um ligeiro aumento do efeito citotóxico do 3-BP na linha celular SK-BR-3. Esta indução do efeito citotóxico foi observada para todas as linhas, quando se tratou da pré-incubação com butirato, embora mais notória na linha celular mais resistente, a linha SK-BR-3.



**Figura 17:** Viabilidade celular, avaliada pelo ensaio de MTT, de células das diferentes linhas (ZR-75-1, MCF-7 e SK-BR-3) incubadas 24 horas em meio contendo acetato (a), butirato (b), lactato (c) ou piruvato (d) numa gama de concentrações até 10000  $\mu\text{M}$ , seguido de 16 horas de incubação em meio com (barras brancas) ou sem (barras pretas) 3-BP na concentração correspondente ao  $\text{IC}_{50}$  de cada linha celular. Os resultados apresentados são relativos ao valor médio  $\pm$  D.P. de três experiências independentes. O significado estatístico foi estimado pelo teste *t*-student: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,005$  – significativamente diferentes das células não tratadas.

Foi realizado, na linha SK-BR-3, um ensaio em que se fez a pré-incubação das células com a concentração fixa de butirato de 500  $\mu\text{M}$ , uma concentração que ainda não é letal para as células, mas que já potencia a ação do 3-BP, conforme se pode verificar

na Figura 18. Seguidamente, estas células foram tratadas com uma gama de concentrações de 3-BP até 1500  $\mu\text{M}$  e foi determinado o  $\text{IC}_{50}$  nessas células, assim como em células controlo não sujeitas à pré-incubação com ácido (Figura 18). Como se pode verificar, a pré-incubação com butirato levou a uma diminuição acentuada do valor do  $\text{IC}_{50}$ , de  $423,9 \pm 3,5 \mu\text{M}$  para  $199,3 \pm 10,3 \mu\text{M}$ , o que vem confirmar o papel do butirato na potenciação da citotoxicidade do 3-BP. É de referir, que nas células não sujeitas a pré-tratamento com butirato (Figura 18, ■), se procedeu a uma incubação com igual duração de tempo em meio sem ácido, tendo esse passo adicional, relativamente ao ensaio descrito na Figura 18, onde se determinou o  $\text{IC}_{50}$  do 3-BP. No entanto, para os dois casos os valores de  $\text{IC}_{50}$  foram próximos e significativamente superiores ao obtido para as células pré-incubadas em meio com butirato 500  $\mu\text{M}$  (Figura 18, □).



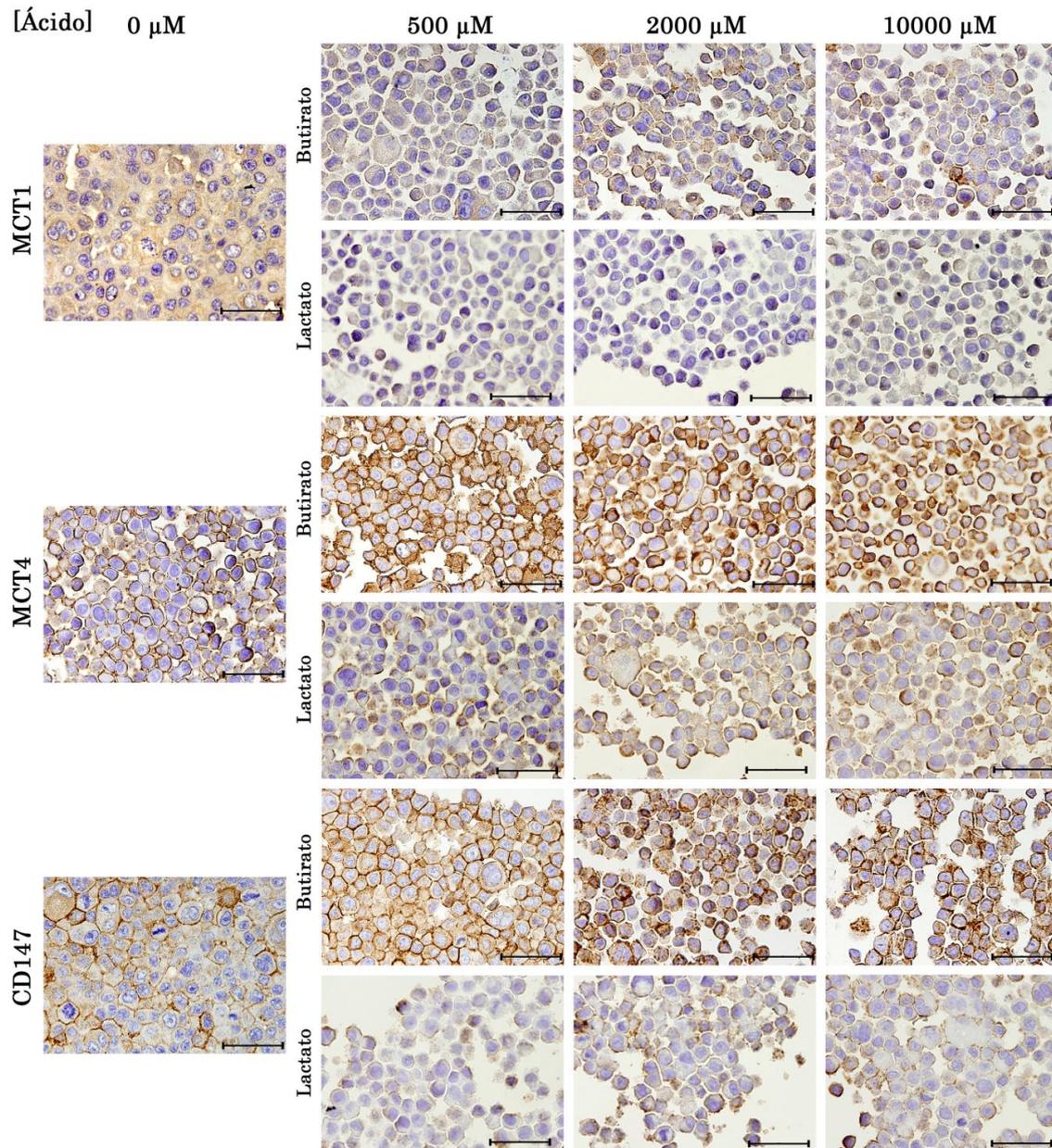
**Figura 18:** Efeito do 3-BP na viabilidade celular na linha SK-BR-3 avaliado pelo ensaio de MTT. As células foram incubadas 24 horas em meio com (□) ou sem (■) butirato 500  $\mu\text{M}$ , seguido de incubação com diferentes concentrações de 3-BP durante 16 horas. Os resultados representam os valores médios  $\pm$  D.P. de triplicados de pelo menos três experiências independentes.

#### 4.2.2. Expressão de MCT1, MCT4 e CD147 em células SK-BR-3 incubadas na presença de diferentes ácidos monocarboxílicos

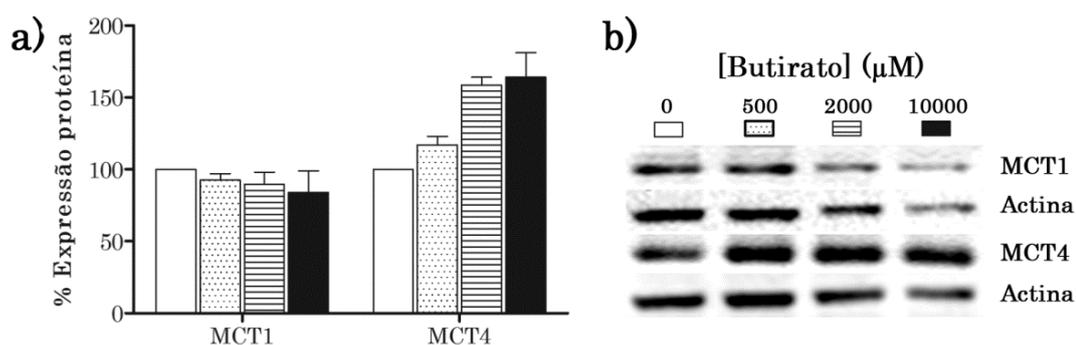
A linha celular SK-BR-3 foi a que apresentou a maior resposta à ação do 3-BP após pré-tratamento com butirato, pelo que os ensaios subsequentes referentes à análise de expressão de proteínas, possivelmente envolvidas na ação do 3-BP, foram desenvolvidos nesta linha. Assim, células SK-BR-3 foram incubadas na presença de diferentes concentrações (500, 2000 e 10000  $\mu\text{M}$ ) de butirato e foi avaliada a expressão de proteínas envolvidas no transporte de monocarboxilatos, nomeadamente o MCT1, MCT2, MCT4 e CD147 por imunocitoquímica. Foi também avaliada a expressão das mesmas proteínas em células incubadas com iguais concentrações de lactato, como termo de comparação, uma vez que este ácido não provocou qualquer alteração no efeito citotóxico do 3-BP, para todas as linhas celulares analisadas. A Figura 19 apresenta os resultados obtidos neste ensaio. No que diz respeito ao MCT1, não foi observada uma diferença significativa na sua

expressão em ambos os casos, comparativamente às células não tratadas, apesar de se ter visualizado um ligeiro aumento da sua expressão na membrana plasmática em células tratadas com butirato. Nestas mesmas células, também foi observado um aumento da expressão quer do MCT4, quer da CD147, ao contrário do que aconteceu nas células tratadas com lactato. Relativamente ao MCT2, e tal como anteriormente observado, não foi observada expressão significativa em células sujeitas a ambos os tratamentos (resultados não apresentados).

Para se confirmar estes resultados, foi realizada uma análise por Western-blot da expressão do MCT1, MCT4 e CD147 em células tratadas com butirato, tomando como referência células não tratadas. Como ilustrado na Figura 20, foi observado um aumento da expressão do MCT4, mas não do MCT1, com o aumento da concentração do butirato, consistente com os resultados obtidos por imunocitoquímica. A proteína CD147, embora tenha sido detetada, não foi quantificada devido à presença de várias bandas associadas com o padrão de glicosilação da proteína, o que torna a quantificação pouco precisa (resultados não apresentados).



**Figura 19:** Expressão imunocitoquímica das proteínas MCT1, MCT4 e CD147 na linha celular SK-BR-3 tratada com diferentes concentrações de butirato ou lactato durante 24 horas. A expressão destas proteínas foi igualmente avaliada em células não tratadas, utilizadas como controlo. A barra corresponde a 50  $\mu\text{m}$ . Os resultados são representativos de duas experiências independentes.



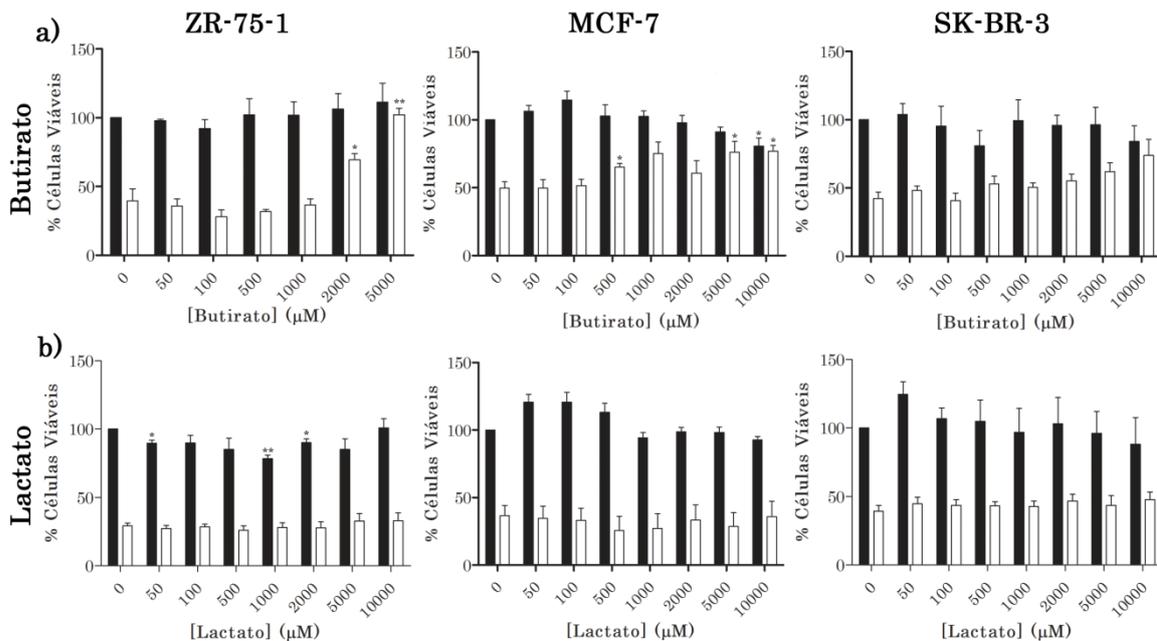
**Figura 20:** Expressão do MCT1 e MCT4, avaliada por Western-blot em células SK-BR-3 tratadas com diferentes concentrações de butirato. **(a)** Níveis de expressão proteica relativos às células controlo (não tratadas). Os resultados representam os valores médios  $\pm$  D.P. de duas experiências independentes. **(b)** Resultados representativos da expressão do MCT1 e MCT4 avaliada por Western-blot.

#### 4.2.3. Viabilidade celular de células incubadas com ácidos carboxílicos e 3-BP em simultâneo

Uma vez que os resultados anteriores indicam um possível papel dos MCTs na ação do 3-BP, realizou-se um ensaio em que as células das linhas de cancro de mama em estudo (ZR-75-1, MCF-7 e SK-BR-3) foram incubadas durante 16 horas com 3-BP em simultâneo com alguns ácidos carboxílicos substratos desses transportadores (butirato e lactato). Como controlo, foi efetuada uma experiência em paralelo em que as células foram incubadas apenas na presença dos ácidos. A Figura 21 apresenta os resultados da viabilidade celular das células tratadas com os diferentes ácidos, sozinhos ou em simultâneo com o 3-BP ( $IC_{50}$  respetivo de cada linha celular).

Relativamente à incubação das células apenas com butirato, verificou-se que, ao contrário do ensaio descrito em 3.14.1 (pré-incubação com o ácido), não ocorreu perda de viabilidade das células, mesmo para as concentrações mais elevadas (exceto na concentração de 10000  $\mu$ M para a linha MCF-7). Isso poderá ser justificado pelo facto de se ter utilizado um menor tempo de incubação (16 horas *vs* 24 horas) (Figura 21 a, barras pretas). É de notar que a incubação das células apenas com lactato não induziu morte celular (Figura 21 b, barras pretas), em concordância com o anteriormente observado.

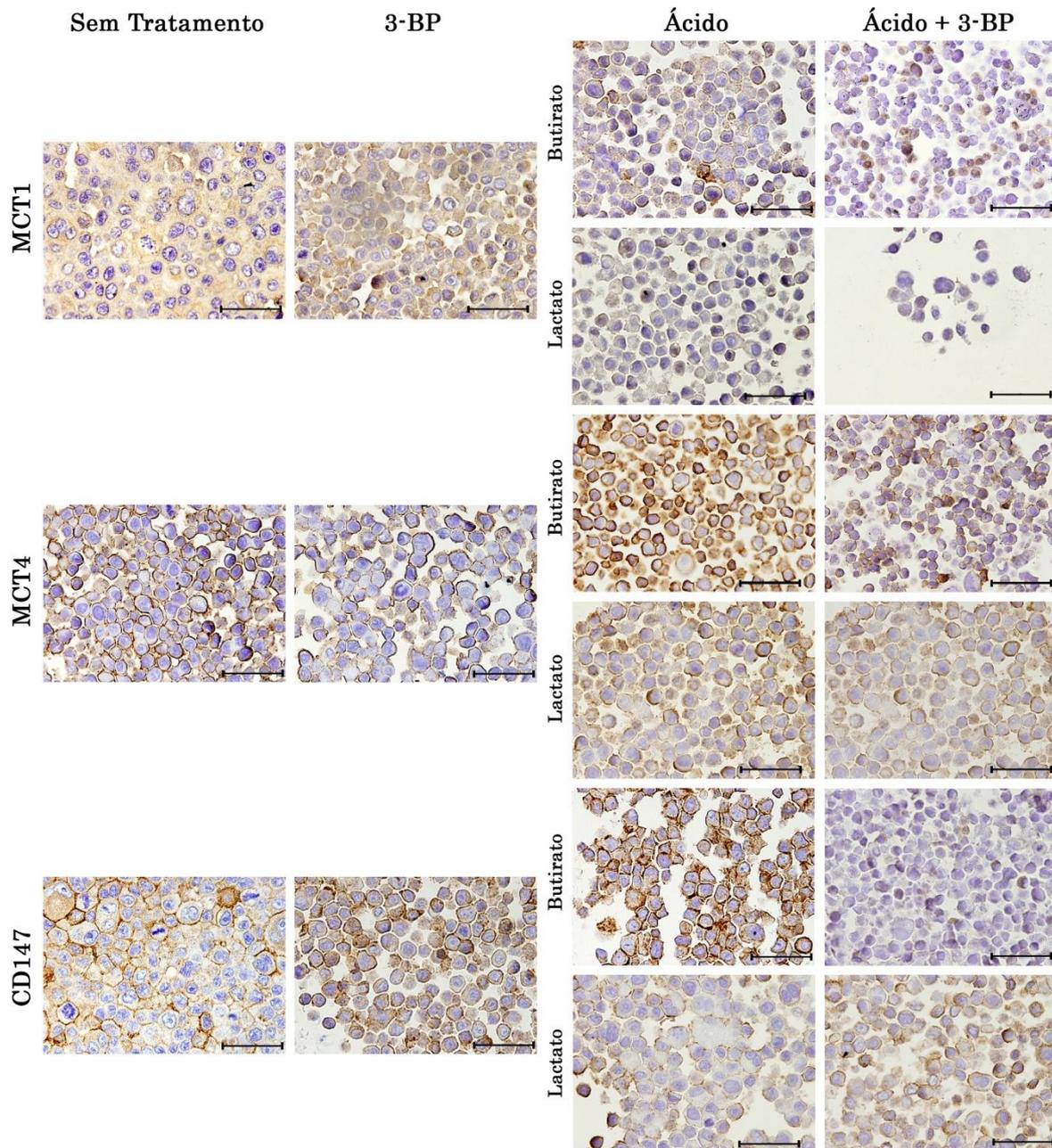
No que diz respeito ao tratamento das células com butirato ou lactato em simultâneo com 3-BP foram obtidos diferentes comportamentos das células, conforme o ácido adicionado. Assim, enquanto o tratamento das células com 3-BP em simultâneo com diferentes concentrações de butirato levou a uma inibição do efeito do 3-BP, o mesmo não aconteceu com a utilização do lactato (Figura 21, barras brancas).



**Figura 21:** Viabilidade celular, avaliada pelo ensaio de MTT, de células das diferentes linhas (ZR-75-1, MCF-7 e SK-BR-3) incubadas 16 horas em meio contendo butirato (a) ou lactato (b) numa gama de concentrações até 10000  $\mu\text{M}$  com (barras brancas) ou sem (barras pretas) adição de 3-BP em simultâneo, na concentração correspondente ao  $\text{IC}_{50}$  de cada linha celular. Os resultados apresentados são relativos ao valor médio  $\pm$  D.P. de três experiências independentes. O significado estatístico foi estimado pelo teste *t*-student: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  – significativamente diferentes das células não tratadas.

Os resultados obtidos neste ensaio em particular, poderiam indicar à partida que o butirato estava a inibir de forma competitiva a entrada do 3-BP. No entanto, no ensaio com lactato, que utiliza os mesmos transportadores que o butirato (MCTs) [56, 59] e, presumivelmente, os mesmos que o 3-BP, o mesmo não acontece. Desta forma, o possível efeito inibitório que estes ácidos poderiam ter na entrada do 3-BP, não justifica todos os resultados obtidos, a não ser que o butirato e o 3-BP utilizem outro transportador, diferente do transportador utilizado pelo lactato. Para ajudar a esclarecer esta situação, foi avaliada a expressão das proteínas MCT1, MCT4 e CD147 por imunocitoquímica nas células sujeitas a estes tratamentos e comparada

com a expressão obtida em células tratadas só com 3-BP ou só com butirato/ lactato (Figura 22). Foram obtidos neste ensaio, resultados diferentes consoante o ácido em estudo. Relativamente ao tratamento com lactato e 3-BP em simultâneo não existem alterações significativas na expressão destas proteínas relativamente quer ao tratamento apenas com 3-BP, quer ao tratamento apenas com lactato. No entanto as células tratadas com butirato e 3-BP em simultâneo o comportamento foi bastante diferente comparativamente às células tratadas apenas com butirato. Neste caso foi observado que o butirato deixou de induzir o aumento da expressão dos MCTs e, principalmente, da CD147, sendo os níveis de expressão semelhantes ou mesmo inferiores aos da expressão basal. É de realçar que no tratamento das células com ácido e 3-BP em simultâneo, por limitações de tempo, foi apenas realizada uma experiência de análise de expressão das proteínas em estudo, pelo que será necessário realizar no futuro mais experiências independentes, assim como estudos de expressão quantitativos como Western-blot, para confirmação destes resultados.



**Figura 22:** Expressão imunocitoquímica das proteínas MCT1, MCT4 e CD147 na linha celular SK-BR-3, tratada com: (i)  $IC_{50}$  de 3-BP durante 16 horas, (ii)  $10000 \mu M$  de butirato ou lactato durante 24 horas e (iii)  $IC_{50}$  de 3-BP em simultâneo com  $10000 \mu M$  de butirato ou lactato durante 16 horas. A expressão destas proteínas foi igualmente avaliada em células não tratadas, utilizadas como controlo. A barra corresponde a  $50 \mu m$ . Os resultados são representativos de duas experiências independentes, exceto o ensaio relativo ao tratamento das células com butirato ou lactato em simultâneo com 3-BP, em que apenas foi realizada uma experiência.

Em suma, analisando todos os resultados obtidos referentes à ação dos ácidos carboxílicos no efeito do 3-BP, verifica-se que a pré-incubação do butirato, ao contrário do lactato, ativa a expressão global dos MCTs e potencia a ação do 3-BP,

mas quando adicionado em simultâneo inibe a sua citotoxicidade, especialmente em concentrações mais elevadas de butirato. Tal poderá estar relacionado com a presença de uma permease que tenha como substratos butirato e 3-BP, mas não lactato. Outra hipótese, de acordo com os resultados obtidos por imunocitoquímica, é que a incubação simultânea das células com butirato e 3-BP provoca uma diminuição da expressão da proteína chaperona CD147 e provavelmente uma diminuição da atividade dos MCTs.

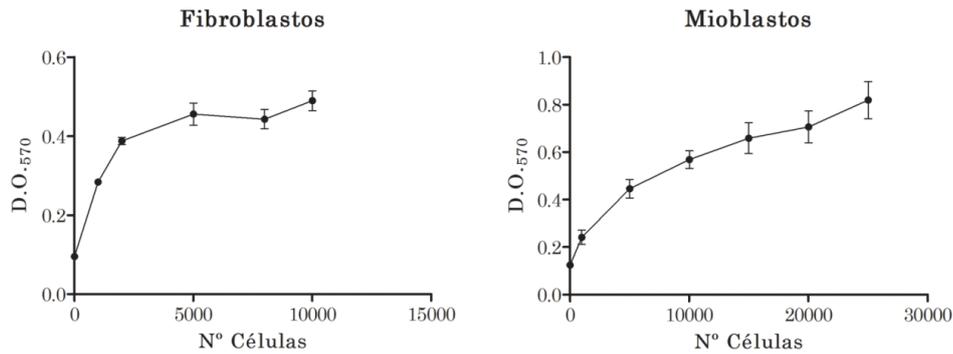
### 4.3. Efeito do 3-BP em linhas celulares não tumorais

Foram realizados estudos paralelos do efeito do 3-BP em linhas celulares não tumorais, tendo-se escolhido como modelos celulares os fibroblastos CCD-1090Sk e os mioblastos L6.

A escolha dos fibroblastos teve como base o facto de se tratarem das células mais comuns do tecido conjuntivo, estando associados às células tumorais em todos os estádios da progressão do cancro [125]. Apesar de este modelo não ser o mais apropriado para avaliar a citotoxicidade do 3-BP, em células normais de mama, foi o escolhido uma vez não se encontrar disponível no nosso laboratório uma linha não tumoral de mama.

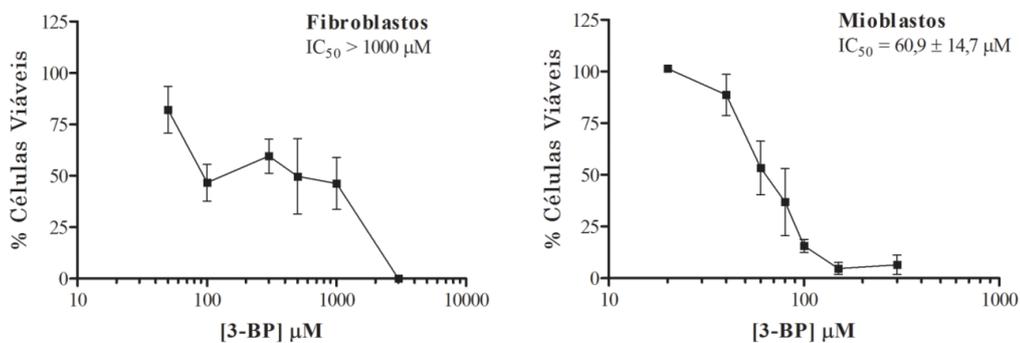
Por outro lado, a linha celular de mioblastos foi escolhida, tendo em conta que os MCTs parecem estar envolvidos no mecanismo de ação do 3-BP, e que o tecido muscular apresenta uma expressão significativa destes transportadores [64, 126-128]. É de referir que também este não é o melhor modelo, uma vez que não se trata de uma linha celular humana, mas sim de rato. A escolha destas linhas não tumorais teve como base além das razões antes expostas, a sua disponibilidade no laboratório.

Antes de se proceder à determinação do IC<sub>50</sub> do 3-BP nestas linhas determinou-se, tal como para as linhas anteriores, a densidade celular adequada para a realização dos ensaios. Como se pode observar por análise da Figura 23, o número de 15000 células viáveis por poço foi também adequado para os mioblastos, enquanto para os fibroblastos, o número apropriado foi de 2000 células viáveis por poço.



**Figura 23:** Correlação entre a densidade celular inicial das linhas celulares em estudo (Fibroblastos CCD-1090Sk e Mioblastos L6) e a absorvância final a 570 nm, avaliada pelo ensaio de MTT. As células foram incubadas nas mesmas condições em que decorreram os ensaios de determinação do IC<sub>50</sub> do 3-BP (ver ponto 3.9). Os resultados representam os valores médios  $\pm$  D.P. de triplicados de pelo menos três experiências independentes.

No que se refere à determinação do valor de IC<sub>50</sub> do 3-BP, as linhas celulares apresentaram valores distintos (Figura 24). Assim, os fibroblastos apresentaram uma elevada resistência ao 3-BP, com um IC<sub>50</sub> superior a 1000  $\mu$ M, enquanto os mioblastos se mostram muito mais sensíveis com um IC<sub>50</sub> de  $60,9 \pm 14,7 \mu$ M.



**Figura 24:** Efeito do 3-BP na viabilidade celular das linhas celulares Fibroblastos CCD-1090Sk e Mioblastos L6, após 16 horas de incubação na presença do composto, avaliado pelo ensaio de MTT. Os resultados representam os valores médios  $\pm$  D.P. de duplicados de pelo menos três experiências independentes.

Estes resultados indicam que, tal como para as linhas tumorais, existe uma diferença na sensibilidade ao 3-BP em linhas não tumorais, consoante a linha em estudo. Encontra-se por esclarecer a razão dessa diferença, pelo que uma análise da expressão dos MCTs, CD147 e proteínas alvo do 3-BP (como a HK II), poderia ajudar

a esclarecer esta questão. No entanto, os anticorpos das proteínas em estudo utilizados não são todos funcionais em rato, pelo que o ensaio deverá ser repetido posteriormente utilizando diferentes linhas celulares não tumorais humanas, para melhor justificar os resultados obtidos. É de salientar, no entanto, que os resultados obtidos com os fibroblastos são promissores da não toxicidade do 3-BP nas células saudáveis, o que também foi já demonstrado com estudos *in vivo* [1].

# Capítulo V

---

Discussão geral e  
conclusões



## 5. Discussão geral e conclusões

A maioria das células tumorais apresenta uma reprogramação metabólica, mudando para um fenótipo glicolítico, mesmo em condições aeróbias, designado “efeito de Warburg”. O 3-BP é um fármaco que atua no metabolismo da glicose inibindo a produção de energia nas células tumorais, quer ao nível da glicólise, quer ao nível mitocondrial [23]. O efeito citotóxico do 3-BP foi descrito em diferentes tipos de cancro como, pâncreas, melanoma ou hepático [89, 100, 104], por exemplo. O cancro da mama é uma das neoplasias mais comuns em todo o mundo e das principais causas de morte em mulheres. Neste estudo, foi avaliada a citotoxicidade do 3-BP em três linhas de celulares do cancro da mama, duas positivas para recetores de estrogénio (RE<sup>+</sup>) - MCF-7 e ZR-75-1 e uma negativa (RE<sup>-</sup>) - SK-BR-3. Em todas as linhas celulares, o 3-BP apresentou citotoxicidade dependente da dose e da linha em estudo, induzindo a apoptose e alterações na morfologia da célula. Além disso, o tratamento com 3-BP levou a uma diminuição na produção de ácido láctico, confirmando o seu papel como um agente antiglicolítico.

As três linhas celulares apresentaram diferentes sensibilidades para o 3-BP. A linha celular RE<sup>-</sup>, SK-BR-3, foi a mais resistente, seguida pela MCF-7 e ZR-75-1, ambas RE<sup>+</sup>. Estudos posteriores realizados com a linha RE<sup>-</sup> MDA-MB-231, indicaram que esta apresenta igualmente uma maior resistência ao 3-BP, com um IC<sub>50</sub> de 148,6 ± 28,1 µM. No entanto, quando foram utilizadas outras duas linhas celulares RE<sup>-</sup> (MDA-MB-468 e Hs578T), foi encontrada uma elevada sensibilidade ao 3-BP com IC<sub>50</sub> de 40,77 ± 2,11 (MDA-MB-468) e 69,95 ± 2,99 (Hs578T). Deste modo, não parece existir uma correlação direta entre a sensibilidade ao 3-BP e a expressão dos RE, como poderia à primeira vista parecer, devendo existir outros fatores envolvidos nas diferentes sensibilidades observadas. Com o objetivo de elucidar esta questão, foi avaliada a expressão de proteínas que poderão estar envolvidas neste fenótipo (MCTs, CD147, HK II e Pgp). A expressão da Pgp em células tumorais é uma das principais causas de resistência aos tratamentos convencionais de quimioterapia [129]. A expressão desta proteína nas linhas em estudo não indicou que fosse esta a razão da maior resistência ao 3-BP observada na linha SK-BR-3, uma vez que, pelo contrário, foi a linha mais sensível, ZR-75-1, a que apresentou maior expressão. Apesar da Pgp mediar o efluxo de fármacos utilizados em quimioterapia com

estruturas muito diversas, estes são na sua maioria de natureza hidrofóbica [129], o que não é o caso do 3-BP. Num estudo realizado com *Saccharomyces cerevisiae* como modelo, verificou-se também que o 3-BP não era exportado pelas bombas de efluxo desta levedura, envolvidas na resistência pleiotrópica a compostos [101]. Quanto à HK II também não se verificou uma correlação entre a sua expressão e a ação do 3-BP. Apesar da linha mais sensível (ZR-75-1) ser a que apresenta uma maior expressão da HK II e uma maior produção de ácido láctico, a linha de sensibilidade intermédia (MCF-7) apresenta menor expressão da proteína comparativamente à linha SK-BR-3 (a mais resistente), e uma produção de lactato equivalente. É de realçar no entanto que neste estudo, apenas observamos a expressão da enzima glicolítica HK II, podendo outras enzimas desta via estar envolvidas na ação do 3-BP, como por exemplo a GAPDH, outra enzima glicolítica descrita como alvo do 3-BP [102-104]. Foi ainda estudada a expressão de proteínas envolvidas no transporte de monocarboxilatos. Sendo o 3-BP um halo-derivado do piruvato e possível substrato dos MCTs, uma diferente expressão destas proteínas poderá conduzir a uma variação da sensibilidade das células ao 3-BP. De facto, a linha mais sensível é a que apresenta maior expressão global dos MCTs 1 e 4 (e também da CD147). A linha celular MCF-7 apresenta uma expressão do MCT4 semelhante à linha SK-BR-3, mas parece ter uma maior expressão na membrana plasmática de MCT1. Embora estes resultados não nos permitam concluir com certeza que esta é a causa da maior ou menor sensibilidade ao 3-BP, até porque poderão estar vários fatores envolvidos, indicam no entanto que a expressão global do MCT1 e MCT4 poderá ser um fator chave neste processo. Quando as células foram tratadas com 3-BP, não foram observadas diferenças significativas na expressão destas proteínas. No entanto, apesar do 3-BP não alterar esta expressão, não significa que não altere a atividade proteica, nomeadamente da HK II, como descrito noutros estudos [1, 93], dado que se trata de um agente alquilante.

Está descrito que cancros de mama RE<sup>-</sup> apresentam uma maior resistência a tratamentos hormonais e um pior prognóstico, pelo que é de elevada importância desenvolver terapias alternativas ao tratamento hormonal. Aumentar a sensibilidade destas células a fármacos quimioterápicos, como é o caso do 3-BP, é de grande importância na terapia deste tipo de cancro. No entanto, como se verificou para o caso da linha SK-BR-3, pode acontecer que células de cancro de mama RE<sup>-</sup>, sejam resistentes ao 3-BP. Neste trabalho, foi demonstrado que o tratamento com o

butirato sensibiliza as células para o 3-BP, o que poderá ser relevante em termos de terapia. Tem sido descrito que o butirato, o qual é um substrato dos MCTs, pode induzir a expressão do MCT1 em colonócitos humanos, na linha tumoral Caco-2 e na linha não tumoral AA/C1 [65, 66]. Estes resultados mostraram, pela primeira vez que, em células do cancro de mama, o butirato é capaz de aumentar a expressão do MCT4. Relativamente ao MCT1, apesar de não ter ocorrido alteração da sua expressão global, o butirato parece induzir um redireccionamento do transportador para a membrana plasmática. O butirato parece ter um papel importante na regulação do MCT4 e CD147 (chaperona), e estas na sensibilidade ao 3-BP. Nas mesmas condições experimentais, o lactato não induziu alterações significativas dos padrões de expressão do MCT1, MCT2, MCT4 e CD147, nem na sensibilidade ao 3-BP. Assim, pode-se especular que o MCT4 e sua proteína chaperona CD147, e possivelmente o MCT1, são efetores positivos na resposta ao 3-BP encontrando-se provavelmente envolvidos na captação do fármaco pelas células tumorais. De facto, estudos de transporte realizados pelo nosso grupo de investigação, utilizando 3-BP radioativo demonstraram que a linha mais resistente ao 3-BP (SK-BR-3) foi a que apresentou um maior valor de  $K_m$  e um menor valor de  $V_{max}$ . Quando estas células foram tratadas com butirato, verificou-se que ocorreu uma diminuição do valor de  $K_m$  ( $0,65 \pm 0,10$  mM), comparativamente às células não tratadas ( $2,52 \pm 0,27$  mM) (Azevedo Silva, J., comunicação pessoal), ou seja, ocorreu um aumento da afinidade dos transportadores para o 3-BP, o que pode justificar o aumento da citotoxicidade observado. Este efeito verificou-se ser específico para o butirato, já que nenhuns dos restantes ácidos monocarboxílicos testados (piruvato, lactato ou acetato) foram capazes de aumentar significativamente a citotoxicidade do 3-BP. É de realçar no entanto que o comportamento foi diferente, consoante o ácido utilizado (Figura 17). Assim, apesar de ter sido com o butirato que se verificou uma maior sensibilização das células ao 3-BP e em todas as linhas celulares, o acetato e o piruvato induziram essa sensibilização mas só na presença de elevadas concentrações de ácido e em algumas das linhas. No que diz respeito ao tratamento com lactato, não ocorreu qualquer alteração na citotoxicidade do 3-BP em nenhuma das situações estudadas. Tal como o butirato, o lactato também se encontra descrito como indutor da expressão do MCT1. Tal não se verificou no presente estudo, provavelmente por não se ter utilizado as mesmas linhas celulares, uma vez que se utilizaram as mesmas condições de concentração de ácido e tempo de incubação já publicadas [64]. Para além disso, verificou-se também que ao contrário do butirato, o lactato não induziu a

expressão nem do MCT4 nem da CD147, conforme referido. Estes resultados reforçam o provável papel dos MCTs e CD147 na citotoxicidade do 3-BP. Relativamente ao acetato e piruvato, estes estudos de expressão não foram realizados no presente trabalho.

O influxo e efluxo de monocarboxilatos por simporte com protões são mediados pelas isoformas MCT 1 a 4, sendo a direção do transporte definido pelo gradiente de concentração de protões e do ácido através da membrana plasmática [56, 75]. Os MCTs transportam uma grande variedade de monocarboxilatos, de acordo com a sua localização tecidual e afinidades para o substrato. A análise da expressão dos MCTs demonstrou que o MCT1 e o MCT4 foram expressos nas linhas em estudo, ao contrário do MCT2, cuja expressão não foi detetada. Não foi realizada a avaliação da expressão do MCT3, uma vez que a sua localização se encontra confinada ao epitélio pigmentar da retina (RPE) e epitélio do plexo coróide (CPE) [56, 76]. O MCT1 é um transportador que aceita uma vasta gama de substratos, quando comparado a outros membros MCT, estando envolvido quer no influxo quer no efluxo de lactato [55]. Dado o elevado valor de  $K_m$  para os seus substratos, o principal papel do MCT4 na célula tem sido atribuído ao efluxo de lactato em células com elevada atividade glicolítica, [56, 83, 84, 130, 131]. Embora o MCT4 esteja envolvido no efluxo de lactato devido à baixa afinidade para o ácido, o seu possível papel na entrada de monocarboxilatos na célula não pode ser excluída. De facto foram já realizados estudos que demonstraram que o MCT1 transporta butirato com alta afinidade e foi colocada a hipótese do MCT4 ser um transportador de baixa afinidade que medeia também a entrada deste ácido na célula [132]. De acordo com os resultados apresentados neste trabalho, podemos levantar a hipótese de que o butirato entra nas células por ambos os transportadores, MCT1 e MCT4, e induz a expressão deste último, em células de cancro de mama. À primeira vista, poder-se-ia esperar que 3-BP, na gama de concentrações utilizadas ( $\mu\text{M}$ ), entrasse na célula através do transportador de elevada afinidade, MCT1. O butirato induziu a expressão do MCT1 na membrana plasmática, bem como um aumento generalizado da expressão do MCT4, pelo que a capacidade global da célula para o transporte de 3-BP deverá ter sido estimulado.

As condições utilizadas nas experiências utilizadas neste trabalho ( $\text{pH} > 7,0$ ) asseguraram a prevalência forma aniónica dos ácidos, pelo que terão de estar

presentes na membrana transportadores como MCT1 e MCT4 para mediar a sua entrada. A indução da expressão do MCT4 pelo butirato leva provavelmente ao aumento da entrada do 3-BP na célula. No que diz respeito ao MCT1, serão necessários ensaios adicionais para clarificar o seu papel neste processo, nomeadamente no que diz respeito à sua realocização, mas neste caso ao contrário do descrito [38], nem o butirato, nem o lactato parecem ativar a sua expressão global. Tendo em conta que o MCT4, contrariamente ao MCT1, é regulado positivamente pelo HIF-1 [133], e uma vez que se verificou que o principal efeito do butirato é ao nível do MCT4, poder-se-á colocar a hipótese que o butirato regule a expressão do MCT4, via HIF-1. Se o HIF-1 estiver de facto envolvido nessa regulação, será expectável que seja específico para o butirato e que o lactato não atue por essa via, contrariamente ao NF-kB, envolvido na regulação do MCT1, quer pelo butirato, quer pelo lactato [64, 65]. Pode-se ainda colocar a hipótese que este efeito do butirato seja ao nível das desacetilases de histonas (HDAC), uma vez que está descrito que quer o butirato quer o 3-BP, são inibidores destas enzimas [67, 117, 134]. A hiperacetilação das histonas induz genes envolvidos no ciclo celular e apoptose [134], pelo que a ação do 3-BP pode ser potenciada pelo pré-tratamento das células com butirato.

Foi já descrito que o butirato pode por si só, inibir a proliferação e induzir a morte celular, em células de adenocarcinoma do cólon, o que está relacionado pela sua ação nas HDAC [134-137]. Tal resultado foi também verificado no presente estudo, em célula de cancro de mama. A produção de butirato ocorre naturalmente a partir da fermentação microbiana no cólon, sendo a fonte principal de carbono utilizada pelos colonócitos [138]. O butirato está descrito como tendo um papel preventivo, inibindo a proliferação celular e sendo capaz de induzir a apoptose, em células de adenocarcinoma do cólon [139]. No entanto, não surpreende que possa atuar também noutras células, nomeadamente em células de cancro de mama, como observado neste trabalho. É de salientar que este efeito do butirato só foi observado com tempo de incubação de 24 horas e não de 16 horas. Encontra-se descrito no entanto que para outras linhas celulares, o efeito citotóxico do butirato é dependente do tempo [140], o mesmo se tendo verificado neste trabalho.

Estudos realizados em linhas celulares tumorais, incubadas com monocarboxilatos (butirato e lactato) em simultâneo com 3-BP, demonstraram que o efeito foi diferente conforme o ácido utilizado. No que diz respeito ao butirato verificou-se que este

apresentava um efeito antagônico ao observado quando realizada a pré-incubação com este ácido, tendo sido observado uma diminuição do efeito do 3-BP com o aumento da concentração do ácido (Figura 21a). Quando realizada a incubação simultânea das células com lactato e 3-BP, não se verificou alteração da citotoxicidade do 3-BP (Figura 21b). Os resultados obtidos com butirato poderiam indicar à primeira vista que estaria a ocorrer uma inibição competitiva, uma vez que os dois compostos deverão utilizar os mesmos transportadores (MCTs), o que se traduziria numa inibição da entrada do 3-BP para concentrações elevadas do butirato. No entanto, os resultados obtidos com lactato contrariam essa hipótese, uma vez que este também é transportado pelos MCTs, nomeadamente pelo MCT1. Para além disso, os valores de  $K_m$  de entrada de lactato e butirato são semelhantes [76], pelo que seria de esperar uma inibição do efeito do 3-BP pelo lactato semelhante à ocorrida com butirato, o que não se verificou. Na tentativa de explicar estes resultados e correlacioná-los com os MCTs, foi analisada a expressão por imunocitoquímica destes transportadores, assim como da CD147 nestas condições, tendo como base de comparação células não tratadas ou tratadas em separado com 3-BP ou com o ácido (Figura 22). Curiosamente, quando as células foram incubadas na presença de 3-BP em simultâneo com butirato, este aparentemente deixou de induzir a expressão dos MCTs e principalmente da CD147, em que parece até ocorrer uma diminuição da expressão, comparativamente às células controlo. Estes resultados são um pouco surpreendentes, pelo que seria interessante realizar ensaios de PCR em tempo real e de western-blot, para aprofundar o conhecimento da regulação da expressão destas proteínas e para validação destes resultados, até porque os resultados de imunocitoquímica não são quantitativos e foi apenas realizada uma experiência. Além disso, seria interessante também analisar a expressão quer do HIF-1 quer das HDAC, que poderão estar envolvidas na ação do butirato. A expressão dos MCTs, em células tratadas com lactato e 3-BP em simultâneo é semelhante à obtida em células tratadas só com 3-BP ou só com lactato, o que é concordante com os ensaios de viabilidade efetuados nas mesmas condições. Pode-se ainda colocar a hipótese já referenciada, de que exista um transportador que tenha como substratos o butirato e 3-BP, mas não o lactato. Se assim for, tal transportador poderá ser o MCT4 ou outro transportador não identificado. O MCT1, uma vez que transporta também o lactato com uma afinidade semelhante ao butirato, não será de acordo com esta hipótese o principal responsável pelo transporte do 3-BP. A repetição

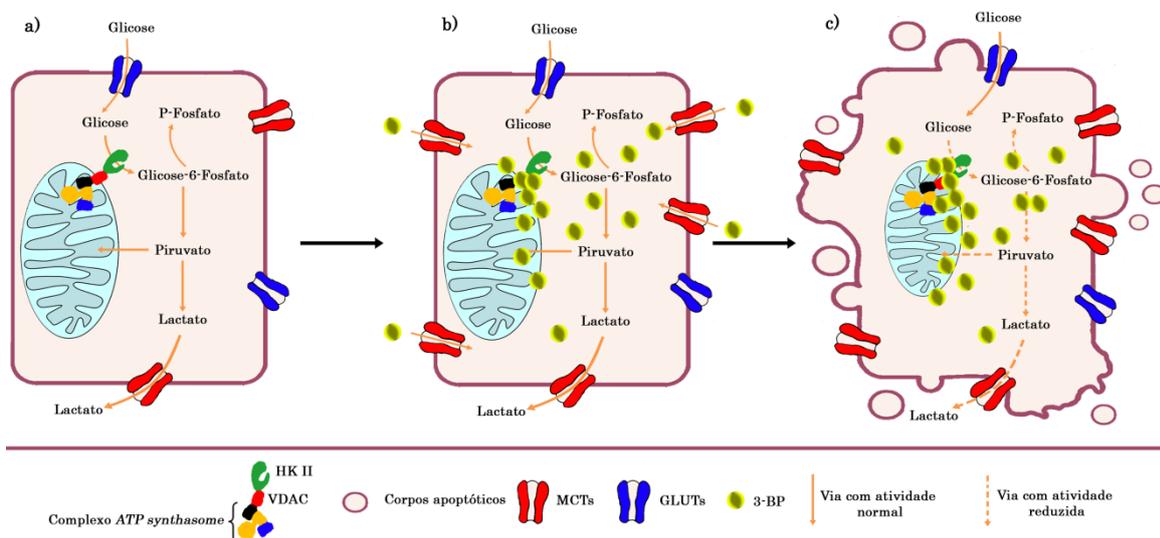
destas experiências com o MCT1 e/ou MCT4 silenciados e o doseamento de metabolitos no meio de cultura poderão ajudar a esclarecer esta questão.

É de referir, no que diz respeito ao efeito do piruvato e do lactato, que estudos realizados em células de glioma apresentaram resultados diferentes dos aqui apresentados, no que diz respeito ao seu efeito na ação do 3-BP. Neste tipo de células, verificou-se que o tratamento prévio ou simultâneo com lactato/ piruvato e 3-BP, levou a uma menor citotoxicidade do 3-BP [141]. No presente trabalho, o lactato não provocou qualquer alteração na citotoxicidade do 3-BP, enquanto que o pré-tratamento com piruvato provocou um ligeiro aumento dessa citotoxicidade, embora não para todas as linhas em estudos e só na presença de elevadas concentrações. Esta diferença poderá ser justificada pelo facto de células de glioma apresentarem uma elevada taxa glicolítica [142] e presumivelmente uma elevada expressão de MCTs. Assim, nesta linha a adição do ácido não levará possivelmente a qualquer alteração dessa expressão, e conseqüente aumento da citotoxicidade do 3-BP. Por outro lado, essa elevada expressão basal poderá conduzir a uma maior entrada de lactato e piruvato, que poderão antagonizar o efeito do 3-BP, conforme referido pelos autores [141].

O presente estudo trouxe novas pistas relativamente ao mecanismo de ação do 3-BP, nomeadamente no seu transporte para a célula. Os resultados demonstraram que em célula do cancro de mama o 3-BP diminui a atividade glicolítica, e induz a morte celular, nomeadamente por apoptose. No entanto não é de excluir que possam ter ocorrido outros processos de morte, nomeadamente autofagia ou necrose. Ensaios adicionais com a anexina V/IP ou com monodansilcadaverina, por exemplo, poderão ajudar a esclarecer esta questão. Como referido na introdução, já foram descritos os vários tipos de morte provocados pela ação do 3-BP, dependendo da linha celular em estudo. Adicionalmente, verificou-se que o efeito do 3-BP é citotóxico e não citostático, provocando um efeito irreversível nas células de cancro de mama em estudo, tratadas com o fármaco, acabando estas mesmo por morrer, mesmo após remoção do composto. Estudos realizados em linhas celulares não tumorais (fibroblastos CCD-1090Sk e mioblastos L6) demonstraram que existe uma diferença de sensibilidade ao 3-BP, podendo ser justificada pela diferente expressão dos MCTs e CD147, uma vez que será esperado que os mioblastos apresentem uma elevada expressão destas proteínas [64, 126-128]. No entanto uma vez que se trava de uma

linha celular de rato, os estudos de expressão não foram realizados, pelo que seria de interesse utilizar uma linha humana até para verificar o possível efeito de citotoxicidade do 3-BP em células normais de diferentes tecidos.

Neste trabalho foi demonstrado pela primeira vez o papel do butirato na indução da expressão do MCT4 e da sua chaperona CD147. Este aumento encontra-se associado muito provavelmente a um aumento da capacidade da célula em transportar o 3-BP (Figura 25). Estes resultados poderão vir a ter impacto no tratamento clínico e no potencial uso do butirato como coadjuvante do 3-BP no tratamento do cancro de mama, nomeadamente em tumores mais resistentes e/ou resistentes ao tratamento hormonal.



**Figura 25:** Possível mecanismo de ação do butirato na potenciação do efeito do 3-BP. A célula tumoral apresenta uma elevada atividade glicolítica com um subsequente aumento da produção de lactato, o que se correlaciona com o seu carácter maligno (a). O tratamento com butirato leva a um aumento da expressão dos MCTs, possível mecanismo de entrada do 3-BP (b). O aumento da entrada do 3-BP vai provocar uma inibição da atividade da HK II e do metabolismo mitocondrial, entre outros possíveis alvos, levando a uma depleção de ATP e consequente morte celular por apoptose ou outro tipo de morte (c).

# Capítulo VI

---

Perspetivas futuras



## 6. Perspetivas futuras

Os estudos realizados neste trabalho trouxeram para a comunidade científica novas pistas para a elucidação do mecanismo de ação do 3-BP, nomeadamente no que diz respeito ao papel dos MCTs, permitindo colocar novas perspetivas de investigação a desenvolver no futuro, tais como:

Os resultados demonstraram que os MCTs deverão estar envolvidos na entrada do 3-BP em células tumorais, podendo estar correlacionado com a sua especificidade. A realização de ensaios de transporte ajudará a esclarecer o papel destas proteínas como permeases do 3-BP. Como controlo, deverá ser efetuado o silenciamento destes mesmo transportadores, assim como da sua chaperona. É de referir que estes ensaios já estão a ser executados por outros membros da equipa de investigação e os resultados até agora obtidos indicam que de facto o 3-BP deverá ser substrato dos MCTs.

Um resultado deste trabalho que poderá ter particular importância a nível terapêutico é a potenciação do efeito do 3-BP pela pré-incubação com butirato, em células resistentes ao 3-BP. Tendo em conta o possível papel dos MCTs/ CD147 nessa potenciação, seria de interesse analisar o tipo de regulação ocorrida (transcricional ou pós-transcricional) e identificar possíveis fatores de transcrição envolvidos, nomeadamente o HIF-1. Será também importante analisar a expressão das HDAC nesta situação. Estes mesmos estudos deverão ser efetuados em células incubadas em simultâneo com butirato e 3-BP, no sentido de tentar explicar a causa da diminuição da expressão dos MCTs/ CD147, comparativamente ao tratamento apenas com butirato. O doseamento de 3-BP e de butirato (ou dos restantes ácidos carboxílicos estudados) no meio extracelular nas diferentes situações testadas pode também dar pistas sobre o mecanismo envolvido no efeito dos ácidos e consequentemente na citotoxicidade do 3-BP.

Apesar dos resultados obtidos indicarem que os MCTs/ CD147, deverão ter um papel importante na ação do 3-BP, poderão não justificar completamente a diferente sensibilidade ao composto, podendo haver envolvimento de outras proteínas. Neste

sentido será importante avaliar os níveis de expressão e localização celular de alvos de 3-BP já identificados tais como HK II, GAPDH [102-104], piruvato desidrogenase [105], 3-fosfoglicerato cinase [104], succinato desidrogenase [102, 104] e a V-ATPase [106], assim como de outras proteínas, para além dos MCTs/ CD147, que também poderão estar envolvidas no transporte, tais como o transportador SMCT (que já foi descrito como transportador do 3-BP [57, 58]) e a chaperona CD44 (que já foi descrita como proteína chaperona dos MCTs [143]). Adicionalmente, poderá verificar-se se outros tipos de morte celular para além da apoptose estão envolvidos na ação do 3-BP através de ensaios utilizando a anexina V/PI ou a monodansilcadaverina, por exemplo.

O estudo realizado no presente trabalho poderá ser estendido a outros modelos de linhas celulares tumorais e não tumorais. Estes estudos poderão também ser alargados a ensaios *in vivo*, injetando em ratinhos linhas celulares com ou sem expressão de MCTs. Os ratinhos serão depois sujeitos a tratamento com 3-BP sozinho ou com butirato seguido de 3-BP, sacrificados e os tumores serão analisados no que diz respeito ao seu tamanho, à expressão de MCTs e de outras proteínas relevantes.

## Capítulo VII

---

Bibliografía



## 7. Bibliografia

1. Ko, Y.H., P.L. Pedersen, and J.F. Geschwind, *Glucose catabolism in the rabbit VX2 tumor model for liver cancer: characterization and targeting hexokinase*. *Cancer Lett*, 2001. **173**(1): p. 83-91.
2. Ko, Y.H., et al., *Advanced cancers: eradication in all cases using 3-bromopyruvate therapy to deplete ATP*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **324**(1): p. 269-75.
3. Jemal, A., et al., *Global cancer statistics*. *CA Cancer J Clin*, 2011. **61**(2): p. 69-90.
4. Nigro, J.M., et al., *Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types*. *Nature*, 1989. **342**(6250): p. 705-8.
5. Jemal, A., et al., *Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2010. **19**(8): p. 1893-907.
6. Hulka, B.S. and P.G. Moorman, *Breast cancer: hormones and other risk factors*. *Maturitas*, 2008. **61**(1-2): p. 203-13.
7. Baan, R., et al., *Carcinogenicity of alcoholic beverages*. *Lancet Oncol*, 2007. **8**(4): p. 292-3.
8. Key, J., et al., *Meta-analysis of studies of alcohol and breast cancer with consideration of the methodological issues*. *Cancer Causes Control*, 2006. **17**(6): p. 759-70.
9. Althuis, M.D., et al., *Global trends in breast cancer incidence and mortality 1973-1997*. *Int J Epidemiol*, 2005. **34**(2): p. 405-12.
10. Autier, P., et al., *Disparities in breast cancer mortality trends between 30 European countries: retrospective trend analysis of WHO mortality database*. *BMJ*, 2010. **341**: p. c3620.
11. Kushi, L.H., et al., *American Cancer Society Guidelines on Nutrition and Physical Activity for cancer prevention: reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity*. *CA Cancer J Clin*, 2006. **56**(5): p. 254-81; quiz 313-4.
12. Kwan, M.L., et al., *Epidemiology of breast cancer subtypes in two prospective cohort studies of breast cancer survivors*. *Breast Cancer Res*, 2009. **11**(3): p. R31.
13. Cheang, M.C., et al., *Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(5): p. 1368-76.
14. Perou, C.M., et al., *Molecular portraits of human breast tumours*. *Nature*, 2000. **406**(6797): p. 747-52.
15. Atalay, M.C., *Multidrug resistance in locally advanced breast cancer*. 2004.
16. Winer EP, M.M., Osborne CK, Harris JR, *Cancer of the breast*. In: *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. eds. De Vita Jr VT, Hellman S, Rosenberg SA. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001: p. 1264-1333.
17. Hicks, C., et al., *Integrative Analysis of Response to Tamoxifen Treatment in ER-Positive Breast Cancer Using GWAS Information and Transcription Profiling*. *Breast Cancer (Auckl)*, 2012. **6**: p. 47-66.
18. *Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials*. *Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group*. *Lancet*, 1998. **351**(9114): p. 1451-67.
19. Warburg, O., *On the origin of cancer cells*. *Science*, 1956. **123**(3191): p. 309-14.

20. Koppenol, W.H., P.L. Bounds, and C.V. Dang, *Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(5): p. 325-37.
21. Seyfried, T.N. and L.M. Shelton, *Cancer as a metabolic disease*. Nutr Metab (Lond), 2010. **7**: p. 7.
22. Vander Heiden, M.G., L.C. Cantley, and C.B. Thompson, *Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation*. Science, 2009. **324**(5930): p. 1029-33.
23. Pedersen, P.L., *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*. J Bioenerg Biomembr, 2007. **39**(3): p. 211-22.
24. Kroemer, G. and J. Pouyssegur, *Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel*. Cancer Cell, 2008. **13**(6): p. 472-82.
25. Izumi, H., et al., *Cellular pH regulators: potentially promising molecular targets for cancer chemotherapy*. Cancer Treat Rev, 2003. **29**(6): p. 541-9.
26. Fischer, K., et al., *Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells*. Blood, 2007. **109**(9): p. 3812-9.
27. Swietach, P., R.D. Vaughan-Jones, and A.L. Harris, *Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase 9*. Cancer Metastasis Rev, 2007. **26**(2): p. 299-310.
28. Schwickert, G., et al., *Correlation of high lactate levels in human cervical cancer with incidence of metastasis*. Cancer Res, 1995. **55**(21): p. 4757-9.
29. Walenta, S., et al., *Correlation of high lactate levels in head and neck tumors with incidence of metastasis*. Am J Pathol, 1997. **150**(2): p. 409-15.
30. Walenta, S., et al., *High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers*. Cancer Res, 2000. **60**(4): p. 916-21.
31. Brizel, D.M., et al., *Elevated tumor lactate concentrations predict for an increased risk of metastases in head-and-neck cancer*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2001. **51**(2): p. 349-53.
32. Lopez-Lazaro, M., *The warburg effect: why and how do cancer cells activate glycolysis in the presence of oxygen?* Anticancer Agents Med Chem, 2008. **8**(3): p. 305-12.
33. Gatenby, R.A. and R.J. Gillies, *Why do cancers have high aerobic glycolysis?* Nat Rev Cancer, 2004. **4**(11): p. 891-9.
34. Omar, H.A., et al., *Energy restriction as an antitumor target*. Future Oncol, 2010. **6**(11): p. 1675-9.
35. Pani, G., et al., *Mitochondrial superoxide dismutase: a promising target for new anticancer therapies*. Curr Med Chem, 2004. **11**(10): p. 1299-308.
36. Ortega, A.D., et al., *Glucose avidity of carcinomas*. Cancer Lett, 2009. **276**(2): p. 125-35.
37. Porporato, P.E., et al., *Anticancer targets in the glycolytic metabolism of tumors: a comprehensive review*. Front Pharmacol, 2011. **2**: p. 49.
38. Kennedy, K.M. and M.W. Dewhirst, *Tumor metabolism of lactate: the influence and therapeutic potential for MCT and CD147 regulation*. Future Oncol, 2010. **6**(1): p. 127-48.
39. Semenza, G.L., *Transcriptional regulation by hypoxia-inducible factor 1 molecular mechanisms of oxygen homeostasis*. Trends Cardiovasc Med, 1996. **6**(5): p. 151-7.

40. Kim, J.W., et al., *HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia*. Cell Metab, 2006. **3**(3): p. 177-85.
41. Vaupel, P., *The role of hypoxia-induced factors in tumor progression*. Oncologist, 2004. **9 Suppl 5**: p. 10-7.
42. Mazurek, S., et al., *Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading*. Semin Cancer Biol, 2005. **15**(4): p. 300-8.
43. Christofk, H.R., et al., *The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth*. Nature, 2008. **452**(7184): p. 230-3.
44. Zhang, H., et al., *HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity*. Cancer Cell, 2007. **11**(5): p. 407-20.
45. Harris, A.L., *Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(1): p. 38-47.
46. Taylor, C.T. and J. Pouyssegur, *Oxygen, hypoxia, and stress*. Ann N Y Acad Sci, 2007. **1113**: p. 87-94.
47. Semenza, G.L., *Involvement of hypoxia-inducible factor 1 in human cancer*. Intern Med, 2002. **41**(2): p. 79-83.
48. Gottlieb, E. and I.P. Tomlinson, *Mitochondrial tumour suppressors: a genetic and biochemical update*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(11): p. 857-66.
49. Mankoff, D.A., et al., *Tumor-specific positron emission tomography imaging in patients: [18F] fluorodeoxyglucose and beyond*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(12): p. 3460-9.
50. Shields, A.F., *Positron emission tomography measurement of tumor metabolism and growth: its expanding role in oncology*. Mol Imaging Biol, 2006. **8**(3): p. 141-50.
51. Gambhir, S.S., *Molecular imaging of cancer with positron emission tomography*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(9): p. 683-93.
52. Reitzer, L.J., B.M. Wice, and D. Kennell, *Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells*. J Biol Chem, 1979. **254**(8): p. 2669-76.
53. Shanware, N.P., et al., *Glutamine: pleiotropic roles in tumor growth and stress resistance*. J Mol Med (Berl), 2011. **89**(3): p. 229-36.
54. DeBerardinis, R.J. and T. Cheng, *Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer*. Oncogene, 2010. **29**(3): p. 313-24.
55. Halestrap, A.P. and N.T. Price, *The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation*. Biochem J, 1999. **343 Pt 2**: p. 281-99.
56. Halestrap, A.P. and M.C. Wilson, *The monocarboxylate transporter family--role and regulation*. IUBMB Life, 2012. **64**(2): p. 109-19.
57. Coady, M.J., et al., *The human tumour suppressor gene SLC5A8 expresses a Na<sup>+</sup>-monocarboxylate cotransporter*. J Physiol, 2004. **557**(Pt 3): p. 719-31.
58. Srinivas, S.R., et al., *Cloning and functional identification of slc5a12 as a sodium-coupled low-affinity transporter for monocarboxylates (SMCT2)*. Biochem J, 2005. **392**(Pt 3): p. 655-64.
59. Halestrap, A.P. and D. Meredith, *The SLC16 gene family--from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond*. Pflugers Arch, 2004. **447**(5): p. 619-28.
60. Merezhinskaya, N. and W.N. Fishbein, *Monocarboxylate transporters: past, present, and future*. Histol Histopathol, 2009. **24**(2): p. 243-64.

61. Poole, R.C., C.E. Sansom, and A.P. Halestrap, *Studies of the membrane topology of the rat erythrocyte H<sup>+</sup>/lactate cotransporter (MCT1)*. *Biochem J*, 1996. **320 ( Pt 3)**: p. 817-24.
62. Carpenter, L. and A.P. Halestrap, *The kinetics, substrate and inhibitor specificity of the lactate transporter of Ehrlich-Lettre tumour cells studied with the intracellular pH indicator BCECF*. *Biochem J*, 1994. **304 ( Pt 3)**: p. 751-60.
63. Kirk, P., et al., *CD147 is tightly associated with lactate transporters MCT1 and MCT4 and facilitates their cell surface expression*. *EMBO J*, 2000. **19(15)**: p. 3896-904.
64. Hashimoto, T., et al., *Lactate sensitive transcription factor network in L6 cells: activation of MCT1 and mitochondrial biogenesis*. *FASEB J*, 2007. **21(10)**: p. 2602-12.
65. Borthakur, A., et al., *Regulation of monocarboxylate transporter 1 (MCT1) promoter by butyrate in human intestinal epithelial cells: involvement of NF- $\kappa$ B pathway*. *J Cell Biochem*, 2008. **103(5)**: p. 1452-63.
66. Cuff, M.A., D.W. Lambert, and S.P. Shirazi-Beechey, *Substrate-induced regulation of the human colonic monocarboxylate transporter, MCT1*. *J Physiol*, 2002. **539(Pt 2)**: p. 361-71.
67. Sealy, L. and R. Chalkley, *DNA associated with hyperacetylated histone is preferentially digested by DNase I*. *Nucleic Acids Res*, 1978. **5(6)**: p. 1863-76.
68. Candido, E.P., R. Reeves, and J.R. Davie, *Sodium butyrate inhibits histone deacetylation in cultured cells*. *Cell*, 1978. **14(1)**: p. 105-13.
69. Kruh, J., *Effects of sodium butyrate, a new pharmacological agent, on cells in culture*. *Mol Cell Biochem*, 1982. **42(2)**: p. 65-82.
70. Lin, R.Y., et al., *Human monocarboxylate transporter 2 (MCT2) is a high affinity pyruvate transporter*. *J Biol Chem*, 1998. **273(44)**: p. 28959-65.
71. Broer, S., et al., *Characterization of the high-affinity monocarboxylate transporter MCT2 in *Xenopus laevis* oocytes*. *Biochem J*, 1999. **341 ( Pt 3)**: p. 529-35.
72. Klier, M., et al., *Transport activity of the high-affinity monocarboxylate transporter MCT2 is enhanced by extracellular carbonic anhydrase IV but not by intracellular carbonic anhydrase II*. *J Biol Chem*, 2011. **286(31)**: p. 27781-91.
73. Grollman, E.F., et al., *Determination of transport kinetics of chick MCT3 monocarboxylate transporter from retinal pigment epithelium by expression in genetically modified yeast*. *Biochemistry*, 2000. **39(31)**: p. 9351-7.
74. Philp, N.J., et al., *Loss of MCT1, MCT3, and MCT4 expression in the retinal pigment epithelium and neural retina of the 5A11/basigin-null mouse*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003. **44(3)**: p. 1305-11.
75. Halestrap, A.P., *The monocarboxylate transporter family--Structure and functional characterization*. *IUBMB Life*, 2012. **64(1)**: p. 1-9.
76. Morris, M.E. and M.A. Felmler, *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*. *AAPS J*, 2008. **10(2)**: p. 311-21.
77. Thomas, C., et al., *Effects of high-intensity training on MCT1, MCT4, and NBC expressions in rat skeletal muscles: influence of chronic metabolic alkalosis*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007. **293(4)**: p. E916-22.
78. Wilson, M.C., et al., *Basigin (CD147) is the target for organomercurial inhibition of monocarboxylate transporter isoforms 1 and 4: the ancillary*

- protein for the insensitive MCT2 is EMBIGIN (gp70)*. J Biol Chem, 2005. **280**(29): p. 27213-21.
79. Ladanyi, M., et al., *The precystalline cytoplasmic granules of alveolar soft part sarcoma contain monocarboxylate transporter 1 and CD147*. Am J Pathol, 2002. **160**(4): p. 1215-21.
80. Pinheiro, C., et al., *Increased expression of monocarboxylate transporters 1, 2, and 4 in colorectal carcinomas*. Virchows Arch, 2008. **452**(2): p. 139-46.
81. Pinheiro, C., et al., *Increasing expression of monocarboxylate transporters 1 and 4 along progression to invasive cervical carcinoma*. Int J Gynecol Pathol, 2008. **27**(4): p. 568-74.
82. Brooks, G.A., *Intra- and extra-cellular lactate shuttles*. Med Sci Sports Exerc, 2000. **32**(4): p. 790-9.
83. Semenza, G.L., *Tumor metabolism: cancer cells give and take lactate*. J Clin Invest, 2008. **118**(12): p. 3835-7.
84. Sonveaux, P., et al., *Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice*. J Clin Invest, 2008. **118**(12): p. 3930-42.
85. Su, J., X. Chen, and T. Kanekura, *A CD147-targeting siRNA inhibits the proliferation, invasiveness, and VEGF production of human malignant melanoma cells by down-regulating glycolysis*. Cancer Lett, 2009. **273**(1): p. 140-7.
86. Pinheiro, C., et al., *Role of monocarboxylate transporters in human cancers: state of the art*. J Bioenerg Biomembr, 2012.
87. Tennant, D.A., R.V. Duran, and E. Gottlieb, *Targeting metabolic transformation for cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(4): p. 267-77.
88. Pelicano, H., et al., *Glycolysis inhibition for anticancer treatment*. Oncogene, 2006. **25**(34): p. 4633-46.
89. Bhardwaj, V., et al., *Glycolytic enzyme inhibitors affect pancreatic cancer survival by modulating its signaling and energetics*. Anticancer Res, 2010. **30**(3): p. 743-9.
90. Ko, Y.H., et al., *A translational study "case report" on the small molecule "energy blocker" 3-bromopyruvate (3BP) as a potent anticancer agent: from bench side to bedside*. J Bioenerg Biomembr, 2012.
91. Davidescu, M., et al., *Bromopyruvate mediates autophagy and cardiolipin degradation to monolyso-cardiolipin in GL15 glioblastoma cells*. J Bioenerg Biomembr, 2012.
92. El Sayed, S.M., et al., *3-Bromopyruvate antagonizes effects of lactate and pyruvate, synergizes with citrate and exerts novel anti-glioma effects*. J Bioenerg Biomembr, 2012.
93. Chen, Z., et al., *Role of mitochondria-associated hexokinase II in cancer cell death induced by 3-bromopyruvate*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1787**(5): p. 553-60.
94. Nakashima, R.A., L.J. Scott, and P.L. Pedersen, *The role of mitochondrial hexokinase binding in the abnormal energy metabolism of tumor cell lines*. Ann N Y Acad Sci, 1986. **488**: p. 438-50.
95. Mathupala, S.P., Y.H. Ko, and P.L. Pedersen, *Hexokinase II: cancer's double-edged sword acting as both facilitator and gatekeeper of malignancy when bound to mitochondria*. Oncogene, 2006. **25**(34): p. 4777-86.
96. Bustamante, E. and P.L. Pedersen, *High aerobic glycolysis of rat hepatoma cells in culture: role of mitochondrial hexokinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(9): p. 3735-9.

97. Bustamante, E., H.P. Morris, and P.L. Pedersen, *Energy metabolism of tumor cells. Requirement for a form of hexokinase with a propensity for mitochondrial binding.* J Biol Chem, 1981. **256**(16): p. 8699-704.
98. Mathupala, S.P., Y.H. Ko, and P.L. Pedersen, *Hexokinase-2 bound to mitochondria: cancer's stygian link to the "Warburg Effect" and a pivotal target for effective therapy.* Semin Cancer Biol, 2009. **19**(1): p. 17-24.
99. Kim, J.S., et al., *Role of reactive oxygen species-mediated mitochondrial dysregulation in 3-bromopyruvate induced cell death in hepatoma cells : ROS-mediated cell death by 3-BrPA.* J Bioenerg Biomembr, 2008. **40**(6): p. 607-18.
100. Qin, J.Z., H. Xin, and B.J. Nickoloff, *3-Bromopyruvate induces necrotic cell death in sensitive melanoma cell lines.* Biochem Biophys Res Commun, 2010. **396**(2): p. 495-500.
101. Lis, P., et al., *Transport and cytotoxicity of the anticancer drug 3-bromopyruvate in the yeast Saccharomyces cerevisiae.* J Bioenerg Biomembr, 2012.
102. Dell'Antone, P., *Targets of 3-bromopyruvate, a new, energy depleting, anticancer agent.* Med Chem, 2009. **5**(6): p. 491-6.
103. Ganapathy-Kanniappan, S., et al., *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is pyruvylated during 3-bromopyruvate mediated cancer cell death.* Anticancer Res, 2009. **29**(12): p. 4909-18.
104. Pereira da Silva, A.P., et al., *Inhibition of energy-producing pathways of HepG2 cells by 3-bromopyruvate.* Biochem J, 2009. **417**(3): p. 717-26.
105. Korotchikina, L.G., M. Showkat Ali, and M.S. Patel, *Involvement of alpha-cysteine-62 and beta-tryptophan-135 in human pyruvate dehydrogenase catalysis.* Arch Biochem Biophys, 1999. **369**(2): p. 277-87.
106. Dell'Antone, P., *Inactivation of H<sup>+</sup>-vacuolar ATPase by the energy blocker 3-bromopyruvate, a new antitumour agent.* Life Sci, 2006. **79**(21): p. 2049-55.
107. Geschwind, J.F., et al., *Novel therapy for liver cancer: direct intraarterial injection of a potent inhibitor of ATP production.* Cancer Res, 2002. **62**(14): p. 3909-13.
108. Nakano, A., et al., *Up-regulation of hexokinaseII in myeloma cells: targeting myeloma cells with 3-bromopyruvate.* J Bioenerg Biomembr, 2012.
109. Rodrigues-Ferreira, C., A.P. da Silva, and A. Galina, *Effect of the antitumoral alkylating agent 3-bromopyruvate on mitochondrial respiration: role of mitochondrially bound hexokinase.* J Bioenerg Biomembr, 2012.
110. Philippe, I., et al., *Experimental results using 3-bromopyruvate in mesothelioma: in vitro and in vivo studies.* J Bioenerg Biomembr, 2012.
111. Verhoeven, H.A. and L.J. van Griensven, *Flow cytometric evaluation of the effects of 3-bromopyruvate (3BP) and dichloracetate (DCA) on THP-1 cells: a multiparameter analysis.* J Bioenerg Biomembr, 2012.
112. Schaefer, N.G., et al., *Systemic administration of 3-bromopyruvate in treating disseminated aggressive lymphoma.* Transl Res, 2012. **159**(1): p. 51-7.
113. Tang, Z., et al., *Over-expression of GAPDH in human colorectal carcinoma as a preferred target of 3-Bromopyruvate Propyl Ester.* J Bioenerg Biomembr, 2012.
114. Ihrlund, L.S., et al., *3-Bromopyruvate as inhibitor of tumour cell energy metabolism and chemopotentiator of platinum drugs.* Mol Oncol, 2008. **2**(1): p. 94-101.
115. Sanchez-Arago, M. and J.M. Cuezva, *The bioenergetic signature of isogenic colon cancer cells predicts the cell death response to treatment with 3-bromopyruvate, iodoacetate or 5-fluorouracil.* J Transl Med, 2011. **9**: p. 19.

116. Nakano, A., et al., *Glycolysis inhibition inactivates ABC transporters to restore drug sensitivity in malignant cells*. PLoS One, 2011. **6**(11): p. e27222.
117. Thangaraju, M., 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): p. 4655-66.
118. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
119. Ferrari, M., M.C. Fornasiero, and A.M. Isetta, *MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro*. J Immunol Methods, 1990. **131**(2): p. 165-72.
120. van de Loosdrecht, A.A., et al., *A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leukemia*. J Immunol Methods, 1994. **174**(1-2): p. 311-20.
121. Skehan, P., et al., *New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening*. J Natl Cancer Inst, 1990. **82**(13): p. 1107-12.
122. Singh, M., H. Sharma, and N. Singh, *Hydrogen peroxide induces apoptosis in HeLa cells through mitochondrial pathway*. Mitochondrion, 2007. **7**(6): p. 367-73.
123. Vichai, V. and K. Kirtikara, *Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening*. Nat Protoc, 2006. **1**(3): p. 1112-6.
124. Halestrap, A.P., *The monocarboxylate transporter family-Structure and functional characterization*. IUBMB Life, 2012. **64**(1): p. 1-9.
125. Kalluri, R. and M. Zeisberg, *Fibroblasts in cancer*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(5): p. 392-401.
126. Dubouchaud, H., et al., *Endurance training, expression, and physiology of LDH, MCT1, and MCT4 in human skeletal muscle*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2000. **278**(4): p. E571-9.
127. Baker, S.K., K.J. McCullagh, and A. Bonen, *Training intensity-dependent and tissue-specific increases in lactate uptake and MCT-1 in heart and muscle*. J Appl Physiol, 1998. **84**(3): p. 987-94.
128. Bonen, A., et al., *Isoform-specific regulation of the lactate transporters MCT1 and MCT4 by contractile activity*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2000. **279**(5): p. E1131-8.
129. Sharom, F.J., *The P-glycoprotein multidrug transporter*. Essays Biochem, 2011. **50**(1): p. 161-78.
130. Dimmer, K.S., et al., *The low-affinity monocarboxylate transporter MCT4 is adapted to the export of lactate in highly glycolytic cells*. Biochem J, 2000. **350 Pt 1**: p. 219-27.
131. Manning Fox, J.E., D. Meredith, and A.P. Halestrap, *Characterisation of human monocarboxylate transporter 4 substantiates its role in lactic acid efflux from skeletal muscle*. J Physiol, 2000. **529 Pt 2**: p. 285-93.
132. Lecona, E., et al., *Kinetic analysis of butyrate transport in human colon adenocarcinoma cells reveals two different carrier-mediated mechanisms*. Biochem J, 2008. **409**(1): p. 311-20.
133. Ullah, M.S., A.J. Davies, and A.P. Halestrap, *The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1alpha-dependent mechanism*. J Biol Chem, 2006. **281**(14): p. 9030-7.
134. Davie, J.R., *Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate*. J Nutr, 2003. **133**(7 Suppl): p. 2485S-2493S.

135. Hague, A. and C. Paraskeva, *The short-chain fatty acid butyrate induces apoptosis in colorectal tumour cell lines*. Eur J Cancer Prev, 1995. **4**(5): p. 359-64.
136. Hinnebusch, B.F., et al., *The effects of short-chain fatty acids on human colon cancer cell phenotype are associated with histone hyperacetylation*. J Nutr, 2002. **132**(5): p. 1012-7.
137. Cuff, M., et al., *The human colonic monocarboxylate transporter Isoform 1: its potential importance to colonic tissue homeostasis*. Gastroenterology, 2005. **128**(3): p. 676-86.
138. MacFarlane, G.a.J.C., *The colonic flora, fermentation and large bowel digestive function*, in *The Large Intestine: Physiology, Pathophysiology and Disease*. 1991, New York: Raven Press Ltd.
139. Lupton, J.R., *Microbial degradation products influence colon cancer risk: the butyrate controversy*. J Nutr, 2004. **134**(2): p. 479-82.
140. Zhang, Y., et al., *Butyrate induces cell apoptosis through activation of JNK MAP kinase pathway in human colon cancer RKO cells*. Chem Biol Interact, 2010. **185**(3): p. 174-81.
141. El Sayed, S.M., et al., *3-Bromopyruvate antagonizes effects of lactate and pyruvate, synergizes with citrate and exerts novel anti-glioma effects*. J Bioenerg Biomembr, 2012. **44**(1): p. 61-79.
142. Galeffi, F. and D.A. Turner, *Exploiting Metabolic Differences in Glioma Therapy*. Curr Drug Discov Technol, 2012.
143. Slomiany, M.G., et al., *Hyaluronan, CD44, and emmprin regulate lactate efflux and membrane localization of monocarboxylate transporters in human breast carcinoma cells*. Cancer Res, 2009. **69**(4): p. 1293-301.

---

**Anexos**



# Butyrate activates the monocarboxylate transporter MCT4 expression in breast cancer cells and enhances the antitumor activity of 3-bromopyruvate

Odília Queirós · Ana Preto · António Pacheco ·  
Céline Pinheiro · João Azevedo-Silva ·  
Roxana Moreira · Madalena Pedro · Young H. Ko ·  
Peter L. Pedersen · Fátima Baltazar · Margarida Casal

Received: 4 January 2012 / Accepted: 15 January 2012  
© Springer Science+Business Media, LLC 2012

**Abstract** Most malignant tumors exhibit the Warburg effect, which consists in increased glycolysis rates with production of lactate, even in the presence of oxygen. Monocarboxylate transporters (MCTs), maintain these glycolytic rates, by mediating the influx and/or efflux of lactate and are overexpressed in several cancer cell types. The lactate and pyruvate

analogue 3-bromopyruvate (3-BP) is an inhibitor of the energy metabolism, which has been proposed as a specific anti-tumor agent. In the present study, we aimed at determining the effect of 3-BP in breast cancer cells and evaluated the putative role of MCTs on this effect. Our results showed that the three breast cancer cell lines used presented different sensitivities to 3-BP: ZR-75-1 ER (+)>MCF-7 ER (+)>SK-BR-3 ER (-). We also demonstrated that 3-BP reduced lactate production, induced cell morphological alterations and increased apoptosis. The effect of 3-BP appears to be cytotoxic rather than cytostatic, as a continued decrease in cell viability was observed after removal of 3-BP. We showed that pre-incubation with butyrate enhanced significantly 3-BP cytotoxicity, especially in the most resistant breast cancer cell line, SK-BR-3. We observed that butyrate treatment induced localization of MCT1 in the plasma membrane as well as overexpression of MCT4 and its chaperone CD147. Our results thus indicate that butyrate pre-treatment potentiates the effect of 3-BP, most probably by increasing the rates of 3-BP transport through MCT1/4. This study supports the potential use of butyrate as adjuvant of 3-BP in the treatment of breast cancer resistant cells, namely ER (-).

O. Queirós · A. Pacheco · R. Moreira · M. Pedro  
Centro de Investigação em Ciências da Saúde (CICS),  
Instituto Superior de Ciências da Saúde-Norte / CESPU,  
Rua Central de Gandra, 1317,  
4585-116 Gandra, PRD, Portugal

A. Preto · J. Azevedo-Silva · M. Casal (✉)  
CBMA - Center of Molecular and Environmental Biology,  
Department of Biology, University of Minho,  
Campus de Gualtar,  
Braga 4710-057, Portugal  
e-mail: mcasal@bio.uminho.pt

C. Pinheiro · F. Baltazar  
Life and Health Sciences Research Institute (ICVS),  
School of Health Sciences, University of Minho,  
Campus de Gualtar,  
Braga 4710-057, Portugal

C. Pinheiro · F. Baltazar  
ICVS/3B's - PT Government Associate Laboratory,  
Braga, Guimarães, Portugal

Y. H. Ko  
300 Redland Court, Suite 212,  
Owings Mills, MD 21117, USA

P. L. Pedersen  
Department of Biological Chemistry, John Hopkins University,  
School of Medicine,  
Baltimore 21205-2185, USA

**Keywords** 3-bromopyruvate · Butyrate · Monocarboxylate transporters · Warburg effect

## Abbreviations

3-BP	3-bromopyruvate
ATCC	American Type Culture Collection
DAB	3,3'-diamino-benzidine
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride
ER	Estrogen Receptor

EMMPRIN	Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer
FBS	Fetal bovine serum
HKII	Hexokinase II
MCT	Monocarboxylate transporter
MTT	3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
OD	Optical density
OXPHOS	Oxidative phosphorylation
PBS	Phosphate-buffered saline
SRB	Sulphorhodamine B
RT	Room temperature
TBST	Tris-buffered saline Tween-20
TCA	Trichloroacetic Acid
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling assay
VDAC	Voltage Dependent Anion Channel

## Introduction

One of the hallmarks of cancer is the “Warburg effect” or “aerobic glycolysis”, consisting in a metabolic switch in energy production, relying mostly on glycolysis with lactate production, even in the presence of O<sub>2</sub>, rather than on oxidative phosphorylation (OXPHOS), characteristic of normal tissues (Warburg 1956). Cancer cells take advantage of this metabolic switch, namely the increased access to biosynthetic precursors for anabolic reactions, provision of antioxidant defenses and higher ability to escape the immune system, to invade neighbor cells and survive in conditions of intermittent hypoxia (Pedersen 2007; Kroemer and Pouyssegur 2008). The efflux of lactate and protons, resulting from the glycolytic phenotype of cancer cells, prevents the acid-induced apoptosis and creates an extracellular acidic environment that suppresses the effect of the immune system and favors tumor invasion through the activation of metalloproteinases (Pedersen 2007; Kroemer and Pouyssegur 2008; Izumi et al. 2003; Fischer et al. 2007; Swietach et al. 2007). It is then not surprising that lactate production from cancer cells correlates positively with tumor aggressiveness and malignancy (Schwickert et al. 1995; Walenta et al. 1997; Walenta et al. 2000; Brizel et al. 2001). Exploiting the differential metabolism of cancer cells can thus be a valuable approach for the development of selective anticancer drugs, with low toxicity to normal cells.

3-Bromopyruvate (3-BP) is a potent antitumoral alkylating agent, which exerts its effect by inhibiting cancer cell energy metabolism and depleting cellular ATP (Ko et al. 2001). One major target of 3-BP is the glycolytic enzyme hexokinase II (HKII) (Ko et al. 2001; Chen et al. 2009). This hexokinase isoform is insensitive to feedback inhibition by

glucose-6-phosphate and associates with mitochondria, especially in cancer cells, *via* Voltage Dependent Anion Channel protein (VDAC) that has privileged access to mitochondrial ATP (Mathupala et al. 2006; Bustamante and Pedersen 1977; Bustamante et al. 1981; Nakashima et al. 1986). Overexpression of HKII is associated with poor prognosis, as glycolysis is the primary energy source used by cancer cells to sustain their uncontrolled cell growth. 3-BP affects not only the energy production coming from glycolysis but also from mitochondrial respiration, inducing ATP depletion and cell death in rapidly growing tumors (Ko et al. 2001). 3-BP treatment completely eradicated advanced cancers in a rodent model without apparent toxicity to the animals, as normal cells are spared from the 3-BP effect (Ko et al. 2004). Although several 3-BP targets have been identified, in addition to HKII, its mechanism of action is not elucidated, particularly the mechanism of uptake into tumor cells.

3-BP is a synthetic derivative of pyruvate and an analogue of lactate, being likely transported by the same permeases. A family of proton-coupled monocarboxylate transporters (MCTs) was described as being involved in the transport of monocarboxylic acids (Halestrap and Price 1999; Halestrap and Meredith 2004; Halestrap and Wilson 2011; Halestrap 2011). The MCT family comprises 14 members but only four of them (MCT1-4) were functionally characterized as mediating the proton-coupled transport of monocarboxylic acids across the plasma membrane (namely lactate, pyruvate, butyrate and acetate) (Halestrap and Meredith 2004; Halestrap and Wilson 2011; Halestrap 2011; Kennedy and Dewhirst 2010). Both MCT1 and MCT4 were found in cancer cells, closely associated with CD147, also known as Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN) or basigin, a chaperone needed for the correct targeting of MCT1 and MCT4 to the cell surface and for their activity (Izumi et al. 2003; Halestrap 2011; Nabeshima et al. 2006; Riethdorf et al. 2006; Hussien and Brooks 2011; Kirk et al. 2000; Wilson et al. 2005). Although these transporters are present in the plasma membrane of normal cells, there is evidence for their upregulation in cancer cells, given the increased lactic acid production and consequent efflux by the cell (Froberg et al. 2001; Fang et al. 2006; Pinheiro et al. 2008a; Pinheiro et al. 2008b; Pinheiro et al. 2010a; Pinheiro et al. 2010b). Tumor cells take up or export lactate according to the oxygen availability, lactate concentration and expression of the MCT subtype at the plasma membrane (Brooks 2000; Semenza 2008). Lactate efflux is thought to be mediated mostly by the MCT4 isoform, whereas oxidative cancer cells can take up lactate through MCT1 (Semenza 2008; Sonveaux et al. 2008; Draoui and Feron 2011). MCTs can be upregulated by different stimuli, including hormones (testosterone), exercise and also by exposure to carboxylic acids like lactic and butyric acids (Kennedy and Dewhirst 2010).

We hypothesized that 3-BP can be an additional substrate for MCTs and that the major players responsible for 3-BP specificity and efficacy are not only HKII but also the availability of MCTs at the plasma membrane. In this context, MCTs can act as “Trojan horses”, as their elevated expression can be used by this chemotherapeutic agent to enter into the cells and selectively kill cancer cells. In this work, we assayed the effect of 3-BP in different breast cancer cell lines, addressed the role of monocarboxylic acids in the regulation of MCTs expression and correlated it with the sensitivity of cells to 3-BP.

## Material and methods

### Chemicals

3-BP, butyric acid and lactic acid were purchased from Sigma. Acetic acid and pyruvic acid were purchased from Merck. 3-BP and carboxylic acid solutions were freshly prepared in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4. The addition of 3-BP and carboxylic acid solutions to the culture medium never exceeded 10% of the final volume.

### Cell cultures

Three breast cancer cell lines were used: MCF-7 and ZR-75-1, both Estrogen Receptor positive (ER (+)) and SK-BR-3 Estrogen Receptor negative (ER(-)), obtained from ATCC (American Type Culture Collection). All cell lines were grown as monolayers at 37°C in a humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub>, in RPMI-1640 medium (Invitrogen) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Invitrogen), 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen), with MCF-7 supplemented with 25 µg/ml insulin (Sigma). Cells were kept in exponential growth phase and subcultured once or twice a week. For the assays, subconfluent cells, in exponential growth phase, were detached with trypsin/EDTA (Invitrogen) and resuspended in fresh medium at the appropriate density.

### Cell survival assays

#### *MTT assay*

To determine the IC<sub>50</sub> of 3-BP, cells were seeded in 96-well plate, assuring that they were in the exponential growth phase during the assay. Cells were incubated during 24 h to adhere and exposed to different concentrations of 3-BP during 16 h. As control, 3-BP solution was replaced by PBS 1x (vehicle). After treatment, 10 µl of 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT, Sigma) was added (5 mg/ml in PBS) and the cells were incubated

for a further 4 h. The formazan product was solubilized with a HCl/Triton X100/isopropanol solution and the absorbance measured at 570 nm.

The percentage of viable cells was determined comparing the absorbance of the treated cells to the untreated control cells (corresponding to 100% of viable cells). Three independent experiments (at least) were performed in triplicate and IC<sub>50</sub> values were estimated using the GraphPad Prism 4 software, applying a sigmoidal dose–response (variable slope) non-linear regression, after logarithmic transformation.

#### *SRB assay*

After the treatment above described, adherent cells were fixed with 10% trichloroacetic acid (TCA), for 1 h at 4°C, rinsed with water, air-dried and stained with 0.4% sulphorhodamine B (SRB, Sigma) for 30 min at 37°C. After staining, the plates were rinsed with 1% acetic acid and air-dried. The bound dye was solubilized with 10 mM Tris (100 µl per well) and the absorbance measured at 540 nm. At least three independent assays were done in triplicate and the results treated as previously described for the MTT assay.

#### Reversibility of 3-BP effect

Cells were seeded into 96-well plates and incubated for 24 h. After incubation, cells were exposed to different concentrations of 3-BP. After 16 h, the medium was removed, the cells were washed with PBS 1x and fresh culture medium without drug was added. After a further 48 h of incubation, the MTT assay was performed. At least three independent experiments (in triplicate) were performed for each assay. Graphs were plotted using the GraphPad Prism 4 software.

#### Effect of 3-BP on cell morphology

Exponential cells growing in 6-well plates were treated during 16 h with 3-BP in a concentration corresponding to the respective IC<sub>50</sub> or 2× IC<sub>50</sub>. In the control cells, 3-BP was replaced by PBS 1x in the culture medium. After the incubation period, the cells were observed in an inverted phase contrast microscope.

#### Apoptosis assay

The terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling assay (TUNEL) was employed to detect fragmented genomic DNA, typical of apoptotic cells, using the DeadEnd™ Fluorimetric TUNEL system (Promega). Cells were plated and treated with 3-BP in the

same conditions as reported for the morphological observations. After incubation with medium containing 3-BP (or PBS 1×, in the untreated cells), both adherent and cells in suspension were collected, washed with the PBS 1× and fixed with 4% paraformaldehyde. Slides with cytopins of the cell suspension were processed according to manufacturer's instructions. The slides were observed in a fluorescence microscope and a minimal of 400 cells was counted.

#### Lactic acid quantification in the culture medium

Cells in exponential growth phase were seeded and incubated for 24 h. Cells were then treated during 16 h with 3-BP in a concentration corresponding to the respective IC<sub>50</sub>. The culture medium was removed and reserved for extracellular lactic acid quantification. The same was done for untreated cells. Lactic acid was measured using a commercial kit (Spinreact) and the values normalized for the total biomass at the time of the assay, evaluated by the SRB assay.

#### Effect of pre-incubation with carboxylic acids on 3-BP sensitivity

Cells in exponential growth phase were seeded in 96-well plates, incubated during 24 h to adhere and exposed to different concentrations of carboxylic acids (lactate, acetate, pyruvate or butyrate), adjusted to pH 7.4. After 24 h of incubation, the medium was removed and replaced by medium containing 3-BP in a concentration corresponding to the respective IC<sub>50</sub> for each cell line or with 3-BP free medium (control). Cells were incubated a further 16 h and viability was evaluated by the MTT assay.

#### Protein expression assessment

MCT1, MCT2, MCT4 and CD147 expression was assessed by immunocytochemistry of cytoblocks and Western-blot of total protein extracts.

#### Preparation of paraffin cytoblocks

For preparation of the paraffin cytoblocks, cells were grown in T75 flasks until reaching approximately 80% confluence. After treatments (described in the results), cultures were trypsinized and cell suspensions centrifuged. The supernatants were removed and cells fixed with 3.7% formaldehyde overnight. Cells were re-centrifuged and the pellets processed in an automatic tissue processor (TP1020, Leica), before inclusion into paraffin (block-forming unit, EG1140H, Leica).

#### Immunocytochemistry

For the evaluation of MCT1, MCT2, MCT4 and CD147 protein expression by immunocytochemistry, 4 μm cytoblock sections were deparaffinised and rehydrated. Slides were then submitted to the adequate heat-induced antigen retrieval treatment (Table 1), washed with PBS 1× and incubated with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in methanol to inactivate endogenous peroxidase activity. Non-specific binding sites were blocked (Blocking solution, Labvision or Vector Kit) and the cell sections were incubated with the appropriate primary antibodies. The times and conditions of incubation for each antibody are described in Table 1. Slides were washed with PBS 1×, incubated with the secondary biotinylated antibody (Labvision or Vector Kit) and then with Streptavidin/ Avidin Peroxidase solution (Labvision or Vector kit, respectively), following manufacturers'

**Table 1** Immunocytochemical procedure to assess the expression of the different proteins

Protein	Positive control	Antigen retrieval	Detection system	Primary antibody (company and reference; dilution and incubation conditions)
MCT1	Colon carcinoma	Citrate buffer (10 mM, pH=6) 98°C; 20 min	R.T.U. VECTASTAIN Elite ABC Kit (VECTOR laboratories)	Chemicon (AB3538P) 1:200, overnight, RT
MCT2	Kidney	Citrate buffer (10 mM, pH=6) 98°C; 20 min	Ultravision Detection System Anti-polyvalent, HRP (Lab Vision Corporation)	Santa Cruz (sc-50322) 1:200, 2 h, RT
MCT4	Colon carcinoma	Citrate buffer (10 mM, pH=6) 98°C; 20 min	R.T.U. VECTASTAIN Elite ABC Kit (VECTOR laboratories)	Santa Cruz (sc-50329) 1:500, 2 h, RT
CD147	Colon carcinoma	EDTA (1 mM, pH=8) 98°C; 20 min	Ultravision Detection System Anti-polyvalent, HRP (Lab Vision Corporation)	Zymed (187344) 1:500, 2 h, RT

RT Room temperature

instructions. Immunocytochemical reactions were developed with 3,3'-diamino-benzidine (DAB+Substrate System, LabVision). All cytochemical sections were counterstained with hematoxylin/ eosin, dehydrated and mounted. Positive controls for immunostaining with each antibody are described in Table 1. Slides were visualized in a phase contrast microscope.

### Protein extraction

The expression of MCT1, MCT2, MCT4 and CD147 was also evaluated by Western-blotting. Cells were grown in cell culture dishes until reaching approximately 80% confluence and subjected to the respective treatment described in the results. After incubation, cells were washed with ice-cold PBS 1x and collected by scrapping using ice-cold lysis buffer (150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1% NP40, 50 mM Tris-HCl pH 7.5 and 1/7 protease inhibitor cocktail, Roche Applied Sciences). The suspension was transferred to a pre-cooled 1.5 ml tube and incubated on ice during 15 min, being occasionally vortexed. The lysate was centrifuged (13,000 rpm, 15 min, 4°C) and the supernatant collected for protein analysis. The protein content of the extracts was measured using the BCA™ Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, Inc.), according to manufacturer's instructions.

### Western-blot assays

Western-blot assays were performed according to conventional procedures. Briefly, 20 µg of protein samples were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. After transfer, membranes were washed with Tris-buffered saline Tween-20 (TBST) and blocked with a 5% skimmed milk solution in TBST, for 1 h at room temperature, with gentle shaking. Membranes were rinsed three times with TBST and incubated with the primary antibodies MCT1, MCT4 and CD147 overnight at 4°C at the dilutions described in Table 1. Actin was used as loading control. After incubation, membranes were washed three times with TBST and treated with the appropriate secondary antibody, conjugated with horseradish peroxidase, for 1 h at room temperature with gentle

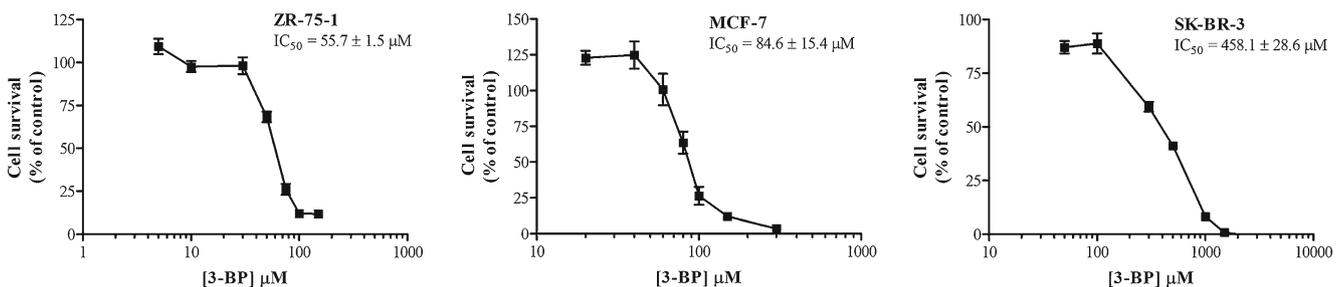
shaking. The immunoreactive proteins were visualized using the Enhanced chemiluminescence detection kit, in an imaging system (Chemidoc, BioRad). The protein content was evaluated by measuring the density of each band and normalizing to the actin content.

## Results

### 3-BP affects survival of breast cancer cells

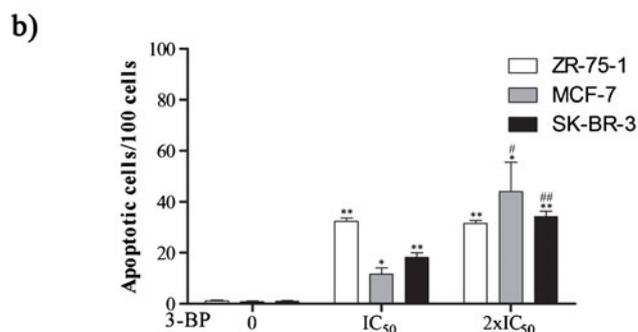
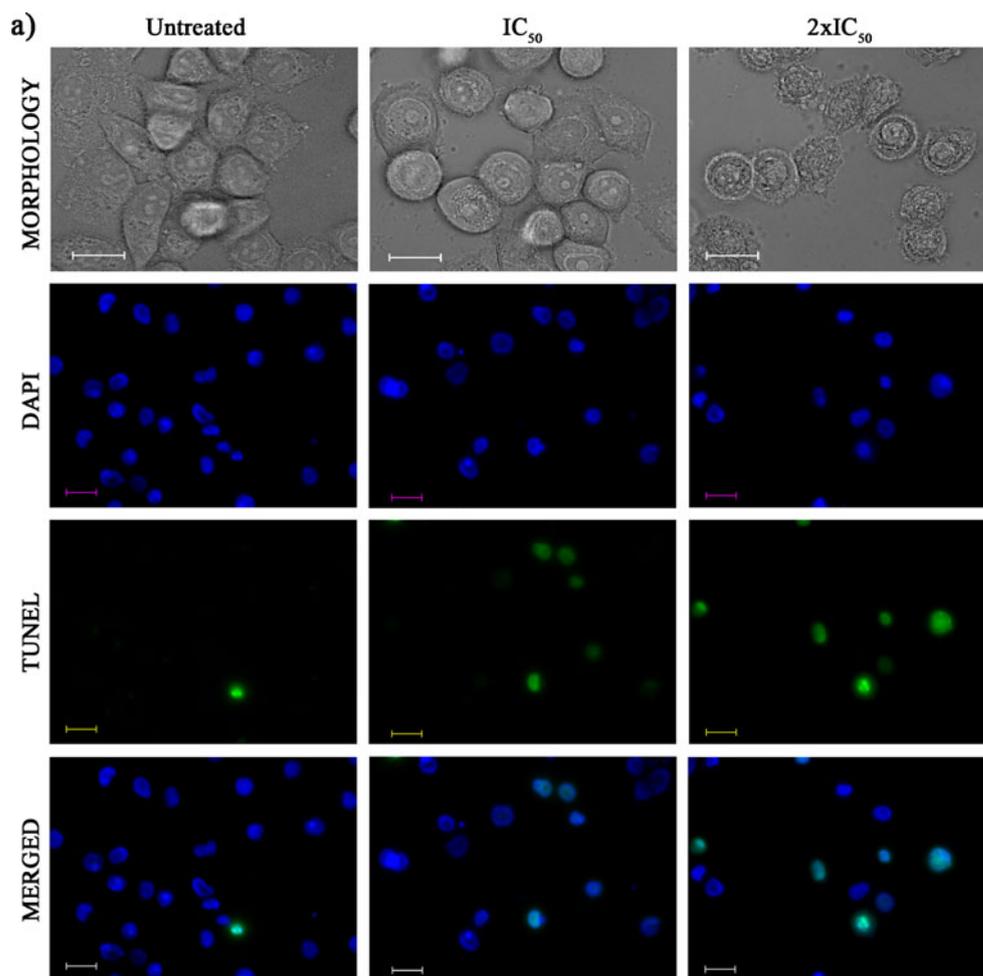
Three breast cancer cell lines (MCF-7, ZR-75-1 and SK-BR-3) were treated with 3-BP and its effect on cell viability was evaluated by the MTT assay. After a short period of incubation (16 h), 3-BP decreased cell survival in a dose-dependent manner in all the cell lines. The three cell lines presented different sensitivities to 3-BP (Fig. 1), with a more potent effect in the ER (+) cell lines: ZR-75-1 and MCF-7 ( $IC_{50}$  of  $55.7 \pm 1.5$  and  $84.6 \pm 15.4$  µM, respectively), while the ER (-) cell line SK-BR-3 was more resistant ( $IC_{50}$  of  $458.1 \pm 28.6$  µM). The MTT assay is an indirect method to evaluate the cytotoxicity of a compound, based on the reduction of MTT to formazan, by metabolically active cells (Mosmann 1983). These results were cross-checked by the SRB assay, which estimates cell biomass according to the protein content of the cells (Vichai and Kirtikara 2006). The same order of sensitivity for the three cell lines was observed and the  $IC_{50}$  values estimated were at the same order of magnitude:  $42.6 \pm 4.7$ ;  $67.8 \pm 1.5$  and  $405.0 \pm 88.2$  µM for ZR-75-1, MCF7 and SK-BR-3, respectively. For 3-BP concentrations higher than the  $IC_{50}$ , a lower cell biomass was found comparing to the  $t_0$  values (corresponding to cell biomass at the time of the addition of the compound), being near zero for high 3-BP concentrations (data not shown), indicating its cytotoxic rather than cytostatic nature.

3-BP effect on cell morphology and apoptosis was also assessed in the three cell lines. Figure 2a shows representative results of the morphological alterations observed for SK-BR-3 cell line, treated with 3-BP in concentrations corresponding to  $IC_{50}$  and  $2 \times IC_{50}$ . Loss of integrity and



**Fig. 1** 3-BP effect on cell viability of the breast cancer cell lines ZR-75-1, MCF-7 and SK-BR-3, evaluated by the MTT assay. Results are the mean  $\pm$  SD of triplicates of at least three independent experiments

**Fig. 2** 3-BP effect in cell morphology and apoptosis in breast cancer cells. Untreated and treated cells with 3-BP in a concentration corresponding to  $IC_{50}$  or  $2 \times IC_{50}$  were analyzed by TUNEL assay and stained with DAPI. **(a)** SK-BR-3 cells visualized in a phase contrast and fluorescence microscope. The scale bar corresponds to 20  $\mu$ m. **(b)** Number of apoptotic cells of ZR-75-1, MCF-7 and SK-BR-3 counted for all the conditions analyzed. The results are presented as mean  $\pm$  SD of two independent experiments. Statistical significance estimated by two-tailed Student's *t*-test for mean comparison was as follows: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  significantly different from untreated cells; #  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$  significantly different from  $IC_{50}$  treated cells



increased cell death was observed in treated cells, as well as alterations in cell morphology, including opaque cytoplasm, prominent nuclei with abnormal morphology and blebbing characteristic of apoptotic cells. This phenotype was more pronounced in cells treated with 3-BP at  $2 \times IC_{50}$ .

To clarify the type of cell death induced by 3-BP, TUNEL assay was performed. 3-BP treatment induced apoptosis in all cell lines analyzed (Fig. 2a and b). The cell line ZR-75-1 showed a similar number of apoptotic cells when treated with 3-BP for both concentrations used. However, for the other two cell lines, the number of apoptotic cells increased with 3-BP concentration (Fig. 2b). In all cases, the percentage of

apoptotic cells for 3-BP  $IC_{50}$  was less than 50%, whereas the viability was around 50%, as evaluated by the trypan blue assay. The inhibitory effect of 3-BP could be also associated with other types of cell death, namely necrosis or autophagy, as suggested by the high vacuolization observed (see the representative observations shown in Fig. 2a for the SK-BR-3 treated cells).

3-BP affects cell metabolism and lactic acid production

3-BP inhibits glycolysis and depletes cell ATP, that causes cell death (Ko et al. 2004). As a consequence, we expected a

change in the levels of lactate exported by the cells treated with 3-BP. The extracellular lactic acid concentration was measured in the three cell lines untreated and treated with 3-BP  $IC_{50}$  (Table 2). All cell lines showed a decrease in lactate production, in concordance with 3-BP's effect on glycolysis. The more resistant cell line SK-BR-3 was less affected, compared with the more sensitive cell lines ZR-75-1 and MCF-7.

#### Breast cancer cells do not recover from 3-BP treatment

In order to analyze whether cells treated with 3-BP recover after its removal from the medium, cells were washed and incubated further 48 h in drug-free medium and cell viability was assessed by the MTT assay (Fig. 3). Cells treated with 3-BP concentrations lower than the  $IC_{50}$  were able to recover and divide similarly to untreated cells. For concentrations closer to, or higher than, the  $IC_{50}$ , the effect was irreversible and cells did not recover from the 3-BP effect. It is important to notice that the most sensitive cell line, ZR-75-1, retained the least ability to recover (Fig. 3).

#### 3-BP does not alter immunocytochemical expression of MCTs and CD147 in breast cancer cells

3-BP, being a pyruvate derivative, most probably uses the same plasma membrane transporters as other monocarboxylates like pyruvate, lactate, butyrate or acetate, MCT isoforms 1 to 4. MCT1, MCT2, MCT4 and CD147 proteins expression was assessed by immunocytochemistry in cells treated or not treated with 3-BP. Figure 4 shows the basal expression of these proteins in the three cell lines. It is worth noticing that MCT2 has never been detected for all conditions used, including cells treated with 3-BP (data not shown). MCT1, MCT4 and CD147 were expressed in all cell lines. Concerning cells treated with 3-BP, no differences

**Table 2** Extracellular lactic acid concentration in the breast cancer cell lines ZR-75-1, MCF-7 and SK-BR-3 incubated for 16 h in the absence or in the presence of 3-BP  $IC_{50}$ . The results were normalized for total cell biomass, dividing the total lactic acid by the optical density determined in the SRB assay. Statistical significance estimated by two-tailed Student's *t*-test for mean comparison was as follows: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.005$ , significantly different from untreated cells

Cell line	Lactic acid concentration ( $\mu\text{g}$ lactic acid/total biomass)	
	Non-treated cells	3-BP treated cells ( $IC_{50}$ )
ZR-75-1	30.0 $\pm$ 4.0	22.4 $\pm$ 0.9 **
MCF-7	19.0 $\pm$ 0.3	11.1 $\pm$ 0.8 ***
SK-BR-3	19.2 $\pm$ 0.9	16.4 $\pm$ 1.0 *

in the protein expression pattern have been detected (data not shown).

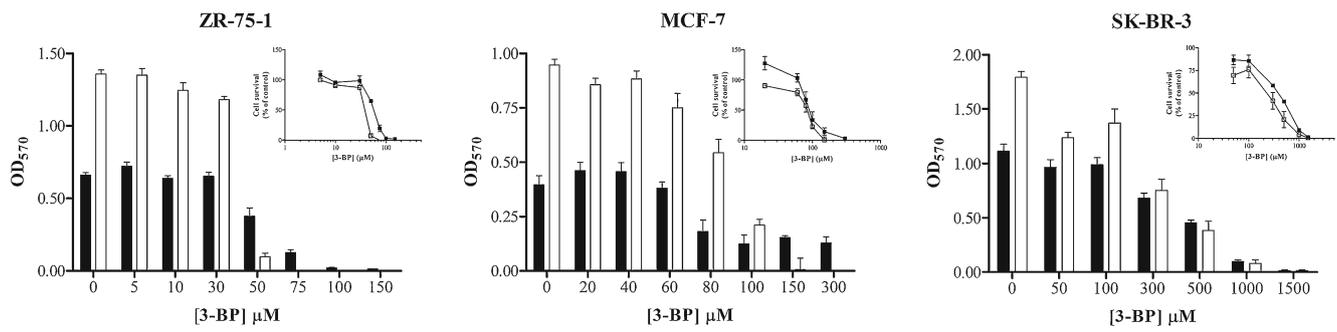
#### Butyrate enhances 3-BP cytotoxicity

To assess the influence of metabolic carboxylic acids on 3-BP cytotoxicity, cells were pre-incubated with different acids before 3-BP treatment. The viability of the cells treated with lactate or butyrate alone or in combination with 3-BP  $IC_{50}$  was evaluated by the MTT assay (Fig. 5). Lactate concentrations ranging from 50 to 10,000  $\mu\text{M}$ , alone or in combination with 3-BP, did not affect cell viability significantly (Fig. 5a). A different behavior was found for butyrate treated cells, where a decrease in cell viability was observed with increasing acid concentrations (Fig. 5b, black bars). The cytotoxic effect of 3-BP increased in a dose-dependent manner by pre-incubating the cells with butyrate (Fig. 5b, white bars). This phenotype was more pronounced for the most resistant cells, the SK-BR-3, in which the  $IC_{50}$  for 3-BP without and with butyrate 500  $\mu\text{M}$  pre-treatment decreased from 423.9 $\pm$ 3.5  $\mu\text{M}$  to 199.3 $\pm$ 10.3  $\mu\text{M}$ .

Similar experiments have been conducted with pyruvate and acetate in the same range of concentrations and culture conditions. The results were comparable to lactate treatment: neither loss of cell viability for the incubation with the acids alone, nor significant enhancement in 3-BP cytotoxicity (data not shown). The increase in 3-BP cytotoxicity seems to be specific for butyrate, which is more pronounced in the more resistant cell line SK-BR-3.

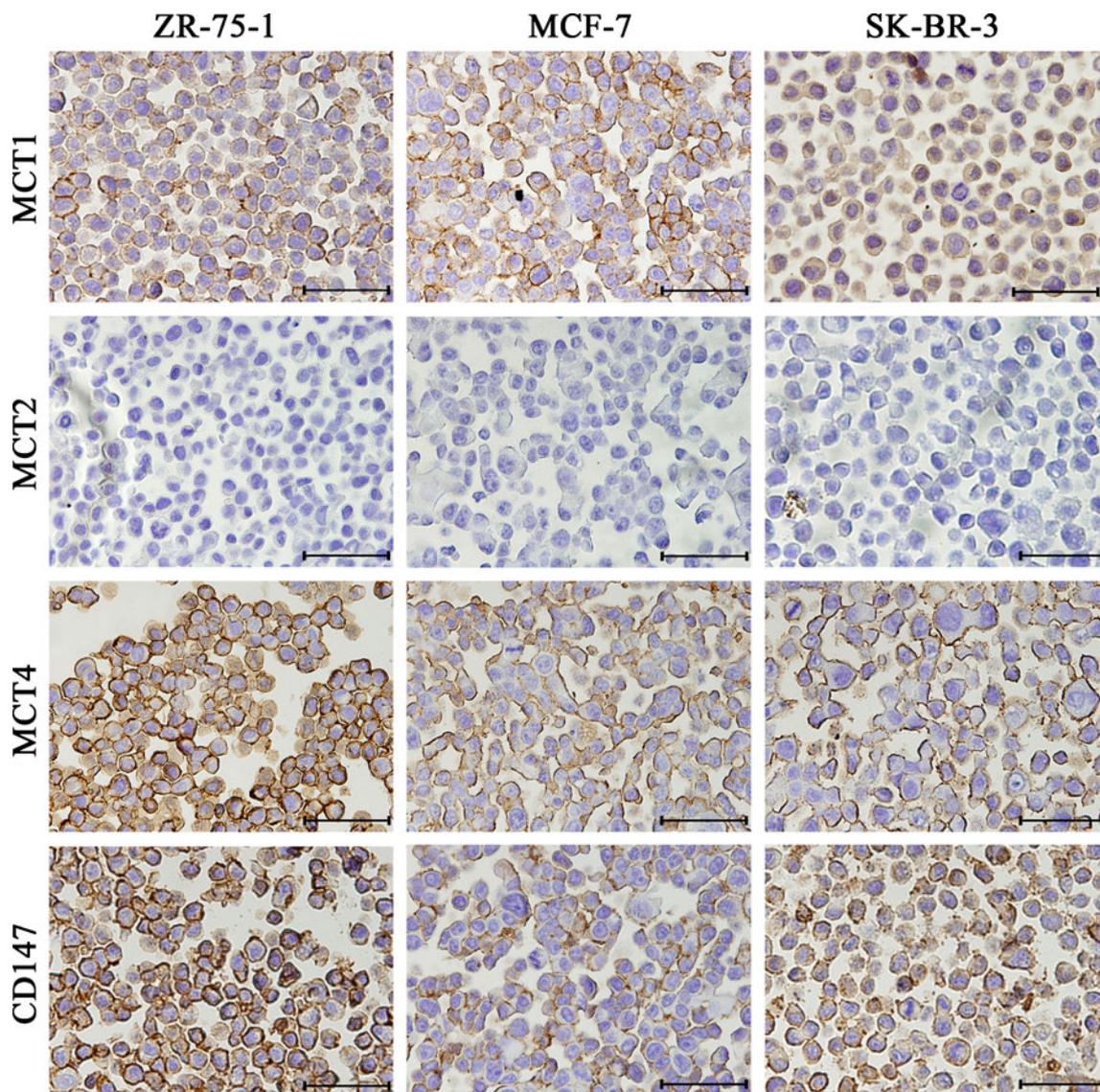
#### Butyrate but not lactate increases MCT4 and CD147 expression in SK-BR-3 cells

As the breast cancer cell line SK-BR-3 showed the largest response to 3-BP upon the butyrate pre-treatment, the expression of MCT1, MCT2, MCT4 and CD147 was assessed in this cell line by immunocytochemistry for the effect of butyrate and lactate at the concentrations of 500, 2,000 and 10,000  $\mu\text{M}$  (Fig. 6). Concerning MCT1, no considerable differences in the overall expression were observed, although a discrete increase in the plasma membrane staining was visualized, especially in butyrate treated cells. No significant expression of MCT2 was observed for all cases (data not shown). In cells treated with butyrate, a higher staining level of MCT4 and CD147 was detected at the plasma membrane. To confirm this result, western-blot analysis was performed in cells treated with butyrate, using untreated cells as reference. As shown in Fig. 7, an increase in MCT4 expression was detected with increasing concentrations of butyrate, consistent with the immunocytochemistry observations. Furthermore, the MCT1 level of expression did not change with acid treatment. Regarding the expression of CD147, although detected, it was not

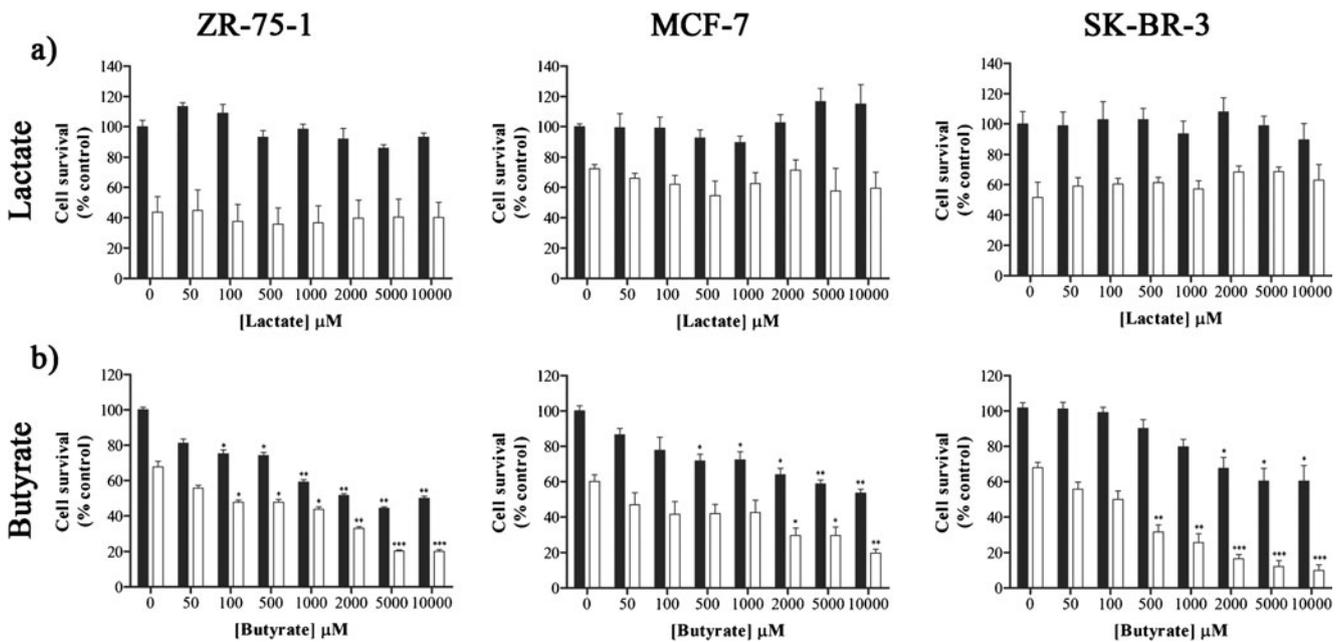


**Fig. 3** Recovery capacity of breast cancer cells from 3-BP effect, evaluated by the MTT assay. Bars represent the reduced-MTT, evaluated by OD<sub>570</sub>, as a function of 3-BP concentration before (*black bars*) and after (*white bars*) a recovery period of 48 h in drug-free medium.

The inset in each graph represents cell viability, normalized for control, both for recovered (*white squares*) and non-recovered (*black squares*) cells. Results are the means ± SD of triplicates of at least three independent experiments



**Fig. 4** Immunocytochemical expression of MCT1, MCT4 and CD147 in the breast cancer cell lines ZR-75-1, MCF-7 and SK-BR-3. The scale bar corresponds to 50 μm



**Fig. 5** Cell viability, evaluated by the MTT assay, of cells incubated during 24 h in medium containing lactate (a) or butyrate (b) in a range of concentrations (up to 10 mM), followed by 16 h incubation in medium with (white bars) or without 3-BP (black bars) using the  $IC_{50}$  for each cell line. Results are the mean  $\pm$  SD of triplicates of at

least three independent experiments. Statistical significance estimated by two-tailed Student's *t*-test for mean comparison was as follows: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.005$ , significantly different from the respective untreated cells

quantified due to the presence of several bands associated with the glycosylation patterns of the protein, which makes quantification unreliable (data not shown).

## Discussion

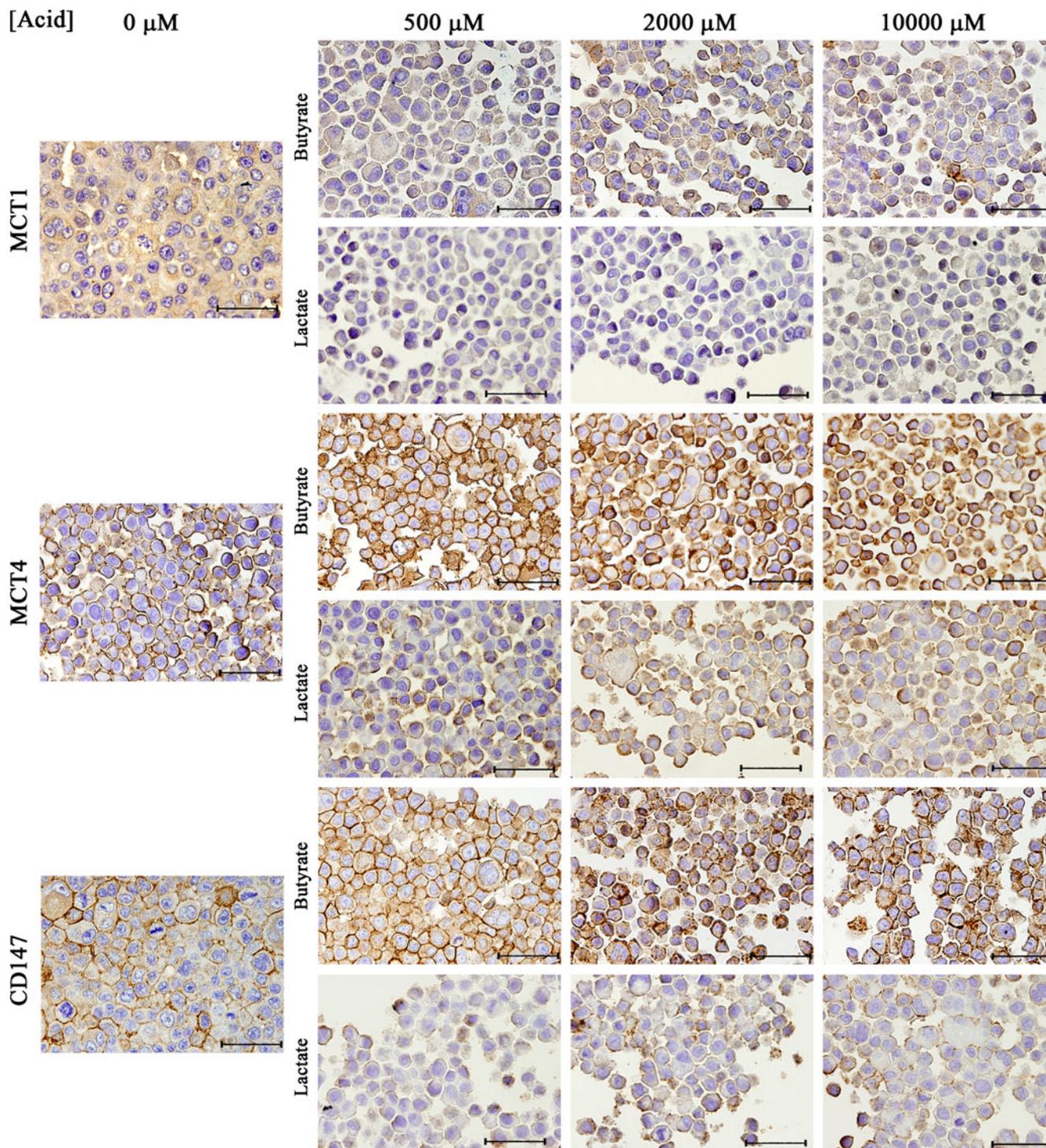
Most cancer cells display a remarkable metabolic alteration in bioenergetics, by switching to a glycolytic phenotype, even in aerobic conditions. 3-BP is a chemotherapeutic drug that impairs glucose metabolism and energy production in cancer cells. 3-BP cytotoxic effect has already been described in different cancer cell types, such as pancreatic cancer, melanoma or hepatocellular carcinoma (Bhardwaj et al. 2010; Qin et al. 2010; Pereira da Silva 2009). Breast cancer is one of the most common malignancies worldwide and the major cause of cancer-related death in women. In this study, we evaluated 3-BP cytotoxicity in three breast cancer cell lines, two estrogen-dependent ER (+), MCF-7 and ZR-75-1 and one estrogen-independent ER (-), SK-BR-3. In all cells, 3-BP exhibited a dose-dependent cytotoxicity, inducing apoptosis and changes in cell morphology. Additionally, 3-BP treatment led to a decrease in lactic acid production corroborating its role as an antiglycolytic agent.

The three cell lines presented different sensitivities to 3-BP. Interestingly, the ER (-) cell line SK-BR-3

was the most resistant, followed by MCF-7 and ZR-75-1, both ER (+). Our unpublished data showed that an ER (-) breast cancer cell line (MDA-MB-231) presents also a higher resistance to 3-BP, with an  $IC_{50}$  of around 200  $\mu$ M. Exploitation of the correlation between the ER (-) phenotype and 3-BP resistance needs further research, an objective beyond the scope of this work.

It is well stated that the ER (-) breast cancers are more aggressive and display a worse prognosis, therefore sensitizing these cells to chemotherapeutic drugs is of major importance in breast cancer therapy. In this work we showed that the treatment with the carboxylic acid butyrate sensitized cells to 3-BP, particularly the ER (-) cells. This effect was specific for butyrate, since none of the remaining metabolic monocarboxylic acids tested (lactate, pyruvate or acetate) were able to enhance 3-BP cytotoxicity.

It has been reported that butyrate, a substrate of MCTs, can induce MCT1 expression in human colonocytes, in the colon cancer cell line Caco-2 and in the colonic epithelial cell line AA/C1 (Borthakur et al. 2008; Cuff et al. 2002). Our results show for the first time that in breast cancer cells, butyrate is able to increase MCT4 but not MCT1 expression, although it changes MCT1 localization. Butyrate seems to play a role in the upregulation of MCT4 and the CD147 (chaperone), as it induces the



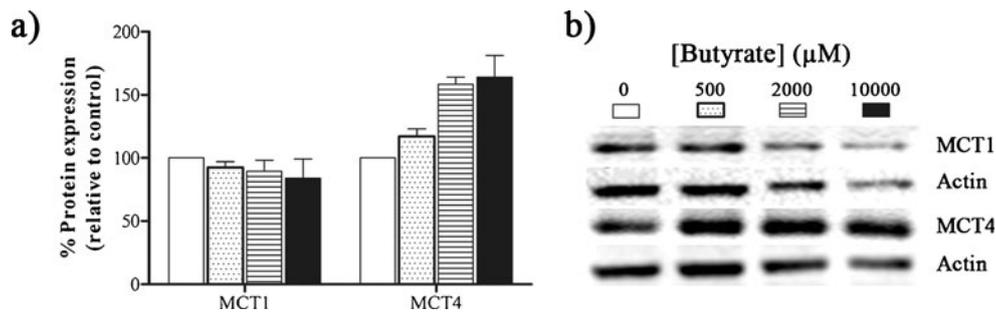
**Fig. 6** Immunocytochemical expression of MCT1, MCT4 and CD147 in the SK-BR-3 cell line treated with butyrate or lactate in different concentrations. Untreated cells were used as control and the expression

of the same proteins was assessed in these cells. The scale bar corresponds to 50  $\mu\text{m}$

strongest membrane staining of those proteins in ZR-75-1, the most sensitive cells to 3-BP. Under the same experimental conditions, lactate did not induce significant alterations of the patterns of MCT1, MCT2, MCT4 and CD147 expression. We therefore can speculate that

MCT4 and its ancillary protein CD147 are positive effectors of 3-BP response and likely to be involved in the uptake of the drug by the cancer cells.

Proton-linked influx and efflux of monocarboxylates are mediated by MCT isoforms 1 to 4, the direction of the



**Fig. 7** MCT1 and MCT4 expression, assessed by Western-blot analysis, in SK-BR-3 cells treated with butyrate at different concentrations. (a) Levels of protein expression relative to the control cells. The results

are presented as mean  $\pm$  SD of two independent experiments. (b) Representative results of MCT1 and MCT4 protein expression

transport being defined by the proton and the anionic form of the acid gradient concentration across the plasma membrane (Halestrap and Wilson 2011; Halestrap 2011). MCT1-4 transports a wide variety of monocarboxylates, according to their tissue localization and substrate affinities. We have detected MCT1 and MCT4 expression in breast cancer cells, but we could not detect significant MCT2 expression. MCT3 expression was not evaluated since its localization is reported to be confined to the retinal pigment epithelium RPE and choroid plexus epithelia (Halestrap and Wilson 2011; Morris and Felmler 2008). MCT1 is a transporter with a broader range of substrates, when compared to other MCT members, being involved both in lactate uptake and efflux. MCT4 major's physiological role has been attributed to the efflux of lactate from glycolytic cells, displaying a high  $K_m$  for all substrates studied (Halestrap and Wilson 2011; Semenza 2008; Sonveaux et al. 2008; Dimmer et al. 2000; Manning Fox et al. 2000). Although MCT4 is involved in lactate efflux due to the low affinity for the acid, its possible role in the uptake of monocarboxylates cannot be excluded. In fact, Lecona and collaborators reported that MCT1 transports butyrate with high-affinity and hypothesized the role of MCT4 as a low affinity transporter for this acid (Lecona et al. 2008). According to our results, we can raise the hypothesis that butyrate enters the cells by both MCT1 and MCT4, and induces the expression of the later, in breast cancer cells. At first glance, one could expect that 3-BP, in the range of concentrations used ( $\mu\text{M}$ ), should be taken up by the cell via the higher affinity transporter MCT1. Since butyrate induces MCT1 plasma membrane localization as well as MCT4 overexpression, we believe that the overall capacity of the cell to transport 3-BP was stimulated. However, this hypothesis needs further confirmation by kinetic analysis of 3-BP transport through the plasma membrane.

The conditions used in our experiments ( $\text{pH} > 7.0$ ) assure the anionic form prevalence of the acids, so specific transport systems such as MCT1 and MCT4 have to be present to mediate their uptake. Our results demonstrated that butyrate induces MCT4 expression, probably enhancing 3-BP

uptake. The role of MCT1 in mediating butyrate action, needs further investigation.

It has been reported that butyrate itself can inhibit proliferation and induce cell death, in colon adenocarcinoma derived cells (Hague and Paraskeva 1995; Hinnebusch et al. 2002; Cuff et al. 2005). Our study showed that butyrate can also induce *per se* loss of viability in breast cancer cells. Butyrate production occurs naturally from colonic microbial fermentation being the main carbon source of colonocytes (MacFarlane and Cummings 1991). Although most of the studies have been performed in colon cancer, where its role in colon cancer prevention is known, inhibiting cell proliferation and inducing apoptosis (Lupton 2004), it was not surprising that we have also seen loss of viability in the breast cancer cells, induced by butyrate.

The present study brings further insights to 3-BP's mechanism of action. Our results show that in breast cancer cells, 3-BP decreased glycolytic activity and induced cell death, namely by apoptosis. The effect of 3-BP appears to be cytotoxic rather than cytostatic, as cells do not recover from 3-BP treatment, being directed to cell death. We show that butyrate, which is itself an anti-proliferative agent, enhances the effect of 3-BP, especially in resistant cells. Although the process by which 3-BP enters the cell is not completely clarified, our study suggests that MCT1/4 and CD147 might be key players in 3-BP uptake by the cell.

Summing up, to the best of our knowledge, we show for the first time that butyrate potentiates the effect of 3-BP in breast cancer cells, through the increased expression of MCT4 and CD147. Further, we put forward the possibility of the potential use of butyrate as an adjuvant for 3-BP in breast cancer treatment, namely in more resistant types of tumors such as the ER (-).

**Acknowledgements** The authors are deeply grateful to Professor André Goffeau (Université Catholique de Louvain-la-Neuve, Belgium) for his contagious vision, valuable discussions at the Conference on 3-BP held in Brussels, 29 October–2 November, 2011 and critical reviewing of the manuscript. The authors also thank Dr. Rita Reis for her technical support in microscopy and image analysis. This work was financed by

Fundos FEDER, Programa Operacional Fatores de Competitividade – COMPETE and by Portuguese National Funds, FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia, in the scope of the project PEst-C/BIA/UI4050/2011. PLP was supported in part by NIH grant CA 10951.

**Conflict of interest statement** The authors declare no conflict of interest

## References

- Bhardwaj V et al (2010) Glycolytic enzyme inhibitors affect pancreatic cancer survival by modulating its signaling and energetics. *Anti-cancer Res* 30(3):743–749
- Borthakur A et al (2008) Regulation of monocarboxylate transporter 1 (MCT1) promoter by butyrate in human intestinal epithelial cells: involvement of NF-kappaB pathway. *J Cell Biochem* 103(5):1452–1463
- Brizel DM et al (2001) Elevated tumor lactate concentrations predict for an increased risk of metastases in head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 51(2):349–353
- Brooks GA (2000) Intra- and extra-cellular lactate shuttles. *Med Sci Sports Exerc* 32(4):790–799
- Bustamante E, Pedersen PL (1977) High aerobic glycolysis of rat hepatoma cells in culture: role of mitochondrial hexokinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(9):3735–3739
- Bustamante E, Morris HP, Pedersen PL (1981) Energy metabolism of tumor cells. Requirement for a form of hexokinase with a propensity for mitochondrial binding. *J Biol Chem* 256(16):8699–8704
- Chen Z et al (2009) Role of mitochondria-associated hexokinase II in cancer cell death induced by 3-bromopyruvate. *Biochim Biophys Acta* 1787(5):553–560
- Cuff MA, Lambert DW, Shirazi-Beechey SP (2002) Substrate-induced regulation of the human colonic monocarboxylate transporter, MCT1. *J Physiol* 539(Pt 2):361–371
- Cuff M et al (2005) The human colonic monocarboxylate transporter Isoform 1: its potential importance to colonic tissue homeostasis. *Gastroenterology* 128(3):676–686
- Dimmer KS et al (2000) The low-affinity monocarboxylate transporter MCT4 is adapted to the export of lactate in highly glycolytic cells. *Biochem J* 350(Pt 1):219–227
- Draoui N, Feron O (2011) Lactate shuttles at a glance: from physiological paradigms to anti-cancer treatments. *Dis Model Mech* 4(6):727–732
- Fang J et al (2006) The H<sup>+</sup>-linked monocarboxylate transporter (MCT1/SLC16A1): a potential therapeutic target for high-risk neuroblastoma. *Mol Pharmacol* 70(6):2108–2115
- Fischer K et al (2007) Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood* 109(9):3812–3819
- Froberg MK et al (2001) Expression of monocarboxylate transporter MCT1 in normal and neoplastic human CNS tissues. *Neuroreport* 12(4):761–765
- Hague A, Paraskeva C (1995) The short-chain fatty acid butyrate induces apoptosis in colorectal tumour cell lines. *Eur J Cancer Prev* 4(5):359–364
- Halestrap AP (2011) The monocarboxylate transporter family-structure and functional characterization. *IUBMB Life*
- Halestrap AP, Meredith D (2004) The SLC16 gene family-from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers Arch* 447(5):619–628
- Halestrap AP, Price NT (1999) The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem J* 343(Pt 2):281–299
- Halestrap AP and Wilson MC (2011) The monocarboxylate transporter family-role and regulation. *IUBMB Life*
- Hinnebusch BF et al (2002) The effects of short-chain fatty acids on human colon cancer cell phenotype are associated with histone hyperacetylation. *J Nutr* 132(5):1012–1017
- Hussien R, Brooks GA (2011) Mitochondrial and plasma membrane lactate transporter and lactate dehydrogenase isoform expression in breast cancer cell lines. *Physiol Genomics* 43(5):255–264
- Izumi H et al (2003) Cellular pH regulators: potentially promising molecular targets for cancer chemotherapy. *Cancer Treat Rev* 29(6):541–549
- Kennedy KM, Dewhirst MW (2010) Tumor metabolism of lactate: the influence and therapeutic potential for MCT and CD147 regulation. *Future Oncol* 6(1):127–148
- Kirk P et al (2000) CD147 is tightly associated with lactate transporters MCT1 and MCT4 and facilitates their cell surface expression. *EMBO J* 19(15):3896–3904
- Ko YH, Pedersen PL, Geschwind JF (2001) Glucose catabolism in the rabbit VX2 tumor model for liver cancer: characterization and targeting hexokinase. *Cancer Lett* 173(1):83–91
- Ko YH et al (2004) Advanced cancers: eradication in all cases using 3-bromopyruvate therapy to deplete ATP. *Biochem Biophys Res Commun* 324(1):269–275
- Kroemer G, Pouyssegur J (2008) Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell* 13(6):472–482
- Lecona E et al (2008) Kinetic analysis of butyrate transport in human colon adenocarcinoma cells reveals two different carrier-mediated mechanisms. *Biochem J* 409(1):311–320
- Lupton JR (2004) Microbial degradation products influence colon cancer risk: the butyrate controversy. *J Nutr* 134(2):479–482
- MacFarlane GT, Cummings JH (1991) The colonic flora, fermentation and large bowel digestive function. In: SF Phillips, JH Pemberton and RG Shorter (eds) *The large intestine: physiology, pathophysiology and disease*. Raven Press Ltd, New York, pp 51–92
- Manning Fox JE, Meredith D, Halestrap AP (2000) Characterisation of human monocarboxylate transporter 4 substantiates its role in lactic acid efflux from skeletal muscle. *J Physiol* 529(Pt 2):285–293
- Mathupala SP, Ko YH, Pedersen PL (2006) Hexokinase II: cancer's double-edged sword acting as both facilitator and gatekeeper of malignancy when bound to mitochondria. *Oncogene* 25(34):4777–4786
- Morris ME, Felmlee MA (2008) 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. *AAPS J* 10(2):311–321
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65(1–2):55–63
- Nabeshima K et al (2006) Emmprin (basigin/CD147): matrix metalloproteinase modulator and multifunctional cell recognition molecule that plays a critical role in cancer progression. *Pathol Int* 56(7):359–367
- Nakashima RA, Scott LJ, Pedersen PL (1986) The role of mitochondrial hexokinase binding in the abnormal energy metabolism of tumor cell lines. *Ann N Y Acad Sci* 488:438–450
- Pedersen PL (2007) 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. *J Bioenerg Biomembr* 39(3):211–222
- Pereira da Silva AP (2009) Inhibition of energy-producing pathways of HepG2 cells by 3-bromopyruvate. *Biochem J* 417(3):717–726
- Pinheiro C et al (2008a) Increasing expression of monocarboxylate transporters 1 and 4 along progression to invasive cervical carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 27(4):568–574

- Pinheiro C et al (2008b) Increased expression of monocarboxylate transporters 1, 2, and 4 in colorectal carcinomas. *Virchows Arch* 452(2):139–146
- Pinheiro C et al (2010a) Expression of monocarboxylate transporters 1, 2, and 4 in human tumours and their association with CD147 and CD44. *J Biomed Biotechnol* 2010:427694
- Pinheiro C et al (2010b) Monocarboxylate transporter 1 is up-regulated in basal-like breast carcinoma. *Histopathology* 56(7):860–867
- Qin JZ, Xin H, Nickoloff BJ (2010) 3-Bromopyruvate induces necrotic cell death in sensitive melanoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 396(2):495–500
- Riethdorf S et al (2006) High incidence of EMMPRIN expression in human tumors. *Int J Cancer* 119(8):1800–1810
- Schwicker G et al (1995) Correlation of high lactate levels in human cervical cancer with incidence of metastasis. *Cancer Res* 55(21):4757–4759
- Semenza GL (2008) Tumor metabolism: cancer cells give and take lactate. *J Clin Invest* 118(12):3835–3837
- Sonveaux P et al (2008) Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J Clin Invest* 118(12):3930–3942
- Swietach P, Vaughan-Jones RD, Harris AL (2007) Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase 9. *Cancer Metastasis Rev* 26(2):299–310
- Vichai V, Kirtikara K (2006) Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc* 1(3):1112–1116
- Walenta S et al (1997) Correlation of high lactate levels in head and neck tumors with incidence of metastasis. *Am J Pathol* 150(2):409–415
- Walenta S et al (2000) High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers. *Cancer Res* 60(4):916–921
- Warburg O (1956) On the origin of cancer cells. *Science* 123(3191):309–314
- Wilson MC et al (2005) Basigin (CD147) is the target for organomercurial inhibition of monocarboxylate transporter isoforms 1 and 4: the ancillary protein for the insensitive MCT2 is EMBIGIN (gp70). *J Biol Chem* 280(29):27213–27221