

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Rafaela Radomski da Silva

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE INIBIDORES METABÓLICOS EM  
CÉLULAS PROLIFERATIVAS E DIFERENCIADAS NA LINHAGEM DE  
NEUROBLASTOMA HUMANO SH-SY5Y**

Porto Alegre

Junho/2015

Rafaela Radomski da Silva

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE INIBIDORES METABÓLICOS EM  
CÉLULAS PROLIFERATIVAS E DIFERENCIADAS NA LINHAGEM DE  
NEUROBLASTOMA HUMANO SH-SY5Y**

Trabalho de conclusão de curso de graduação  
apresentado à Comissão de Graduação do Curso de  
Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção  
do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Professor Ph.D. Fábio Klamt  
Co-orientadora: Sc. M. Ivi Juliana Bristot

Porto Alegre

Junho/2015

Rafaela Radomski da Silva

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE INIBIDORES METABÓLICOS EM  
CÉLULAS PROLIFERATIVAS E DIFERENCIADAS NA LINHAGEM DE  
NEUROBLASTOMA HUMANO SH-SY5Y**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado à Comissão de Graduação do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovado em: 22 de Junho de 2015.

BANCA EXAMINADORA

---

Professora Ph.D. Denise Cantarelli Machado - PUCRS

---

Dr. Leonardo Lisbôa da Motta - UFRGS

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de iniciar agradecendo ao meu orientador Professor Fábio Klamt por me acolher em seu grupo de pesquisa, por me oferecer a participação no presente trabalho e pelo cuidadoso processo de orientação durante o processo de produção dessa monografia.

Também gostaria de agradecer à minha co-orientadora, a doutoranda Ivi Juliana Bristot por me oferecer a participação em seu trabalho de mestrado e, principalmente, pela paciência e dedicação para me introduzir ao incrível mundo da bioquímica de câncer.

Aos colegas do laboratório 24 agradeço pela descontração e brilhantes contribuições científicas durante os longos experimentos.

Do mesmo modo, não poderia deixar de agradecer aos colegas do laboratório 16 da PUCRS que me “adotaram” como técnica e me agradeceram com valorosos conselhos durante a produção deste trabalho.

Obviamente, agradeço aos meus amigos Danielle Franco, Clívia Valle Machado, Etiele Senna, Patrícia Nunes, Silvana Leal, Gabrihel Viegas, João Paulo Santos, Felipe André Schütz e Breno Costa pelos conselhos, resumos ou simplesmente pelas boas risadas nos intervalos ou nos encontros da turma.

Aos meus familiares, avós, tios, tias e primos, agradeço por todo o carinho e apoio em tudo o que eu faço.

Agradeço ao meu irmão Ricky Roesler da Silva pelos conselhos e por trazer a minha vida duas pessoas maravilhosas, minha cunhada Tatielli Fermino e minha sobrinha Gabrielli. Taty, esse trabalho dedico a você! Pela tua força tenho certeza de que já terás vencido o câncer quando este trabalho estiver disponível.

Aos meus pais Oscar Leonel da Silva e Helena Radomski por terem aberto mão de seus sonhos para que eu pudesse viver o meu. Serei eternamente grata por isso e espero poder dar um pouco de orgulho como retribuição.

Ao meu amado Felipe, por me mostrar que posso sempre ir mais longe e fazer e ser melhor a cada dia. Meus familiares me ajudaram a chegar até aqui, mas foi você quem me manteve no foco, quem me inspirou e me apoiou mesmo quando o estresse e a fadiga pareciam vencer a batalha. Obrigada por estar ao meu lado!

E, principalmente, agradeço a Deus por ter me dado à oportunidade de conhecer e conviver com essas pessoas maravilhosas.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>5</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>6</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>7</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>8</b>
1.1. Características clínicas de células de câncer (“ <i>cancer hallmarks</i> ”).....	8
1.2. Metabolismo energético alterado de células de câncer: Efeito Warburg.....	9
1.3. Fármacos antimetabólicos.....	11
1.4. Células SH-SY5Y como modelo de estudo do metabolismo do câncer.....	12
1.5. Avaliação da citotoxicidade .....	14
<b>2. OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>16</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>17</b>
3.1. Cultivo celular.....	17
3.2. Diferenciação celular .....	17
3.3. Densidade de neuritos .....	17
3.4. Viabilidade celular .....	18
3.5. Análise estatística .....	19
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>20</b>
4.1. Caracterização Morfológica dos Fenótipos Tumoral e Neuronal da Linhagem de Neuroblastoma Humano SH-SY5Y.....	20
4.2. Citotoxicidade de Antimetabólicos.....	21
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>24</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>30</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>31</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

2-DG: 2-Desoxiglicose

3-BP: 3-Bromopiruvato

AA: Antimicina-A

AR: Ácido Retinóico

CHC: Ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico

DMEM: Meio de Eagle modificado por Dulbecco (Dulbecco Modified Eagle's Medium)

FT: Floretina

GADPH: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GLUTs: Transportadores de glicose

LC<sub>50</sub>: Valor de Concentração Letal 50

LD<sub>50</sub>: Valor de Dose Letal 50

MCT1: Transportador de Monocarboxilado do Tipo 1

MTT: Brometo de 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5 difeniltetrazólio

NADH: Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

OH: Grupos hidroxila

ROT: Rotenona

SFB: Soro Fetal Bovino

SH: Grupos tiol

## RESUMO

A reprogramação metabólica é uma das características essenciais na fisiologia de células neoplásicas invasivas. Essa modificação permite que as células de câncer, na presença de oxigênio, optem por consumir glicose avidamente de forma a aumentar a absorção e incorporação de nutrientes nos blocos de construção celular, tais como nucleotídeos, aminoácidos, e lipídeos que são necessários para as altas taxas de proliferação desse tipo celular. Com base nesse conceito, este trabalho teve como objetivo estabelecer o valor de concentração letal 50 (LC<sub>50</sub>) dos antimetabólicos inibidores de transportadores de membrana (floreтина e ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico), inibidores da via glicolítica (2-desoxiglicose e 3-bromopiruvato) e inibidores da fosforilação oxidativa (3-bromopiruvato, rotenona e antimicina-A) de forma a avaliar esses fármacos como possíveis estratégias de inibição do metabolismo energético de células de câncer, podendo ser esta uma forma economicamente viável e eficaz de terapia. O valor de LC<sub>50</sub> dos inibidores metabólicos foi avaliado em células diferenciadas e proliferativas da linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y através do ensaio MTT. Os resultados apresentaram pequena diferença entre o LC<sub>50</sub> de células diferenciadas e proliferativas. Portanto, os inibidores metabólicos analisados neste estudo atuaram amplamente nas culturas de células com fenótipos diferenciado e proliferativo. Esses resultados indicam que, provavelmente os dois fenótipos analisados compartilham as mesmas características metabólicas, pois os neurônios apresentam um metabolismo assumidamente glicolítico, e que também é observada em câncer.

**PALAVRAS-CHAVE:** Câncer; Reprogramação metabólica; Antimetabólicos; SH-SY5Y.

## ABSTRACT

The metabolic reprogramming is an essential feature in the physiology of invasive cancer cells. This modification allows cancer cells when in the presence of oxygen to avidly consume glucose in order to increase nutrient uptake and incorporation in to cellular building blocks, such as nucleotides, amino acids and lipids that are required for the high proliferation rates of this cell type. Based on this concept, this study aimed to establish the value of lethal concentration 50 (LC<sub>50</sub>) of inhibitors antimetabolites of membrane transporters (phloretin and  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid), glycolytic pathway inhibitors (2-deoxyglucose and 3-bromopyruvate) and oxidative phosphorylation inhibitors (3-bromopyruvate, rotenone and antimycin-A) in order to evaluate the drugs as a potential strategies to inhibit cancer cells energetic metabolism, thus emerging as effective and economical form of therapy. The LC<sub>50</sub> value of metabolic inhibitors was evaluated of human neuroblastoma SH-SY5Y cell line during differentiation and proliferation by MTT assay. The results showed little difference between the LC<sub>50</sub> of differentiated cells and proliferative. Therefore, the metabolic inhibitors analyzed in this study acted widely in cultures of differentiated and proliferative cell phenotypes. These results suggest that, probably, both phenotypes share the same metabolic characteristics, since neurons have an openly glycolytic metabolism, a feature that can also be observed in cancer cells.

**KEYWORDS:** Cancer; Metabolic reprogramming; Antimetabolites; SH-SY5Y.



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Características clínicas de células de câncer (“*cancer hallmarks*”)

O estudo dos cânceres permitiu uma evolução na compreensão da biologia celular e serviu para demonstrar que essa patologia é consequência de uma coleção de doenças heterogêneas com complexas estruturas clonais, genotípicas e fenotípicas que se modificam em escalas variáveis de tempo, ocupando diferentes habitats no interior do mesmo organismo (GREAVES; MALEY, 2012; KELLOFF; SIGMAN, 2012). Como por exemplo, a classificação dos tipos de câncer por órgão ou tecido no qual se originou o tumor, pode envolver subclassificações de acordo com a diversidade neoplásica tornando a população de células estudada uma amostra única. Essa característica implica na dificuldade do prognóstico e na elaboração de um tratamento adequado (CANTOR; SABATINI, 2012).

No entanto, uma série de características engloba amplamente a diversidade biológica observada nos diversos casos de câncer já estudados e que vêm a facilitar a compreensão do crescimento e desenvolvimento tumoral. Em seu trabalho publicado no ano 2000, Hanahan e Weinberg sugeriram que o vasto catálogo de genótipos cancerígenos é resultado da manifestação de seis alterações essenciais na fisiologia celular que determinam coletivamente o crescimento maligno: autossuficiência em sinais de crescimento, insensibilidade a inibidores de sinais de crescimento (anticrescimento), a evasão da morte celular programada (apoptose), potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada, e a invasão de tecidos e metástases. Em uma atualização de 2011 os autores propuseram mais quatro características, sendo estas: instabilidade do genoma e mutações, evitar destruição pelo sistema imune, inflamação promovida pelo tumor e metabolismo energético alterado (HANAHAN; WEINBERG, 2000, 2011).

O câncer é capaz de adquirir mudanças de traços fenotípicos, por vias mutacionais e epigenéticas, que torna as células capazes de realizar expansão territorial por proliferação e auto-renovação, migração e invasão. Entretanto, essas propriedades fazem parte integrante dos processos de desenvolvimento, fisiológicos e reparação de tecidos normais. (GREAVES; MALEY, 2012). Portanto, de acordo com o modelo Darwiniano, cada uma destas novas mudanças em capacidades fisiológicas adquiridas durante o desenvolvimento tumoral representam o rompimento bem sucedido dos pontos de controle do ciclo celular (HANAHAN; WEINBERG, 2000; GATENBY; GILLIES, 2004).

## 1.2. Metabolismo energético alterado de células de câncer: Efeito Warburg

A glicólise é o processo metabólico em que a glicose é convertida em piruvato, NADH e ATP. Na maioria das células normais, a glicólise é priorizada quando o suprimento de oxigênio é limitado. Quando o oxigênio está presente o piruvato entra no ciclo do ácido tricarboxílico para ser oxidado a  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ , onde o oxigênio é o último receptor de elétrons na cadeia transportadora de elétrons, e esse processo gera um gradiente eletroquímico (GAO; CHEN, 2015). Sendo essa última etapa a de maior contribuição para a produção de ATP (GATENBY; GILLIES, 2004). Em sua maioria, as células normais de mamíferos, na presença de oxigênio, apresentam um metabolismo onde a glicólise é mantida em um nível basal. Essa diminuição da glicólise é denominada de "efeito Pasteur", pois Louis Pasteur foi o primeiro a demonstrar que o fluxo de glicose foi reduzido pela presença de  $\text{O}_2$ . Esta versatilidade metabólica das células de mamíferos é essencial para a manutenção da produção de ATP ao longo de uma ampla gama de concentrações de oxigênio (GATENBY; GILLIES, 2004).

Em contradição a essa atividade metabólica normalmente observada, em 1930 o pesquisador Otto Warburg descreveu pela primeira vez uma característica anômala no metabolismo energético celular em câncer. Ele observou que mesmo na presença de oxigênio, as células de câncer reprogramavam seu metabolismo da glicose de modo a aumentar a glicólise e, conseqüentemente, levando a um estado que tem sido chamado de "glicólise aeróbica" ou o "Efeito Warburg". (HANAHAN; WEINBERG, 2011). As células derivadas de tumores mantêm tipicamente os seus fenótipos metabólicos em cultura em condições de normóxia, indicando que a glicólise aeróbica é estável e constitutivamente regulada através de modificação gênica ou epigênica (GATENBY; GILLIES, 2004).

Essa alteração no metabolismo glicolítico tem sido selecionada pelas células de câncer principalmente por seus benefícios em conferir substratos para a proliferação celular, evasão de controles citostáticos, sobrevivência em ambientes com baixa vascularização (resistência a hipóxia), formação de um microambiente acidificado e atenuação de apoptose (GATENBY; GILLIES, 2004; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Já foi demonstrado que a preferência das células neoplásicas pela glicólise para a síntese de ATP não é necessariamente um indicador de que a fosforilação oxidativa esteja comprometida nessas células. Visto que a glicólise é priorizada nesse tipo celular devido à

necessidade de altas taxas de biossíntese de macromoléculas e homeostase. Isso torna as células cancerígenas extremamente dependentes de glicose para a sua sobrevivência. Essa alteração metabólica característica em células tumorais malignas pode ser explorada para servir como uma base bioquímica para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para alvejar esta anormalidade metabólica (XU *et al.*, 2005).

A hipótese levantada por Potter em uma publicação de 1958 e recentemente revista por Vander Heiden em 2009, justifica o efeito Warburg observado em células de câncer (VANDER HEIDEN, M. G., CANTLEY, L.C., THOMPSON, 2009). Essa hipótese diz que o aumento da glicólise permite o desvio de intermediários glicolíticos para várias vias biossintéticas, incluindo agentes geradores de nucleotídeos e aminoácidos, facilitando a biossíntese de macromoléculas necessárias para manter as elevadas taxas de divisão celular (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

De forma a confirmar essa hipótese, o metabolismo Warburg-*like* parece estar presente em muitas células embrionárias e em tecidos que se dividem rapidamente. A glicólise anaeróbica pode estar priorizada em células normais que se encontram em altas taxas de proliferação, como por exemplo, em linfócitos T (EL MJIYAD *et al.*, 2011), ou ainda, quando a função das mitocôndrias foi danificada ou a célula se encontra sob condições de hipóxia, o piruvato é preferencialmente convertido em lactato (GAO; CHEN, 2015). Isso reforça o importante papel da glicólise no apoio a programas de biossíntese de grande escala que são necessários para ativar a proliferação celular (HANAHAN; WEINBERG, 2011; GAO; CHEN, 2015).

O rápido crescimento das células de câncer e rápida expansão da massa tumoral normalmente ultrapassa o tempo necessário para uma nova geração vascular, resultando num fornecimento insuficiente de sangue e, conseqüentemente, oxigênio para determinada área dos tecidos tumorais. Tal ambiente, com baixas taxas de oxigênio no interior da massa tumoral, limita a disponibilidade de oxigênio para utilização na respiração mitocondrial e síntese de ATP e obriga as células de câncer a utilizar a via glicolítica como a principal rota de produção de energia (XU *et al.*, 2005).

O aumento da produção de ácido láctico na glicólise gera um microambiente acidificado e que exige uma maior adaptação através da evolução de células somáticas de fenótipos resistentes à toxicidade induzida por esse meio. As populações de células que surgem a partir dessa sequência evolutiva têm uma poderosa vantagem de crescimento, uma vez que tornam o microambiente cada vez mais tóxico para outros fenótipos, mas inofensivo para si (GATENBY; GILLIES, 2004). A acidose ambiental também facilita a degradação da

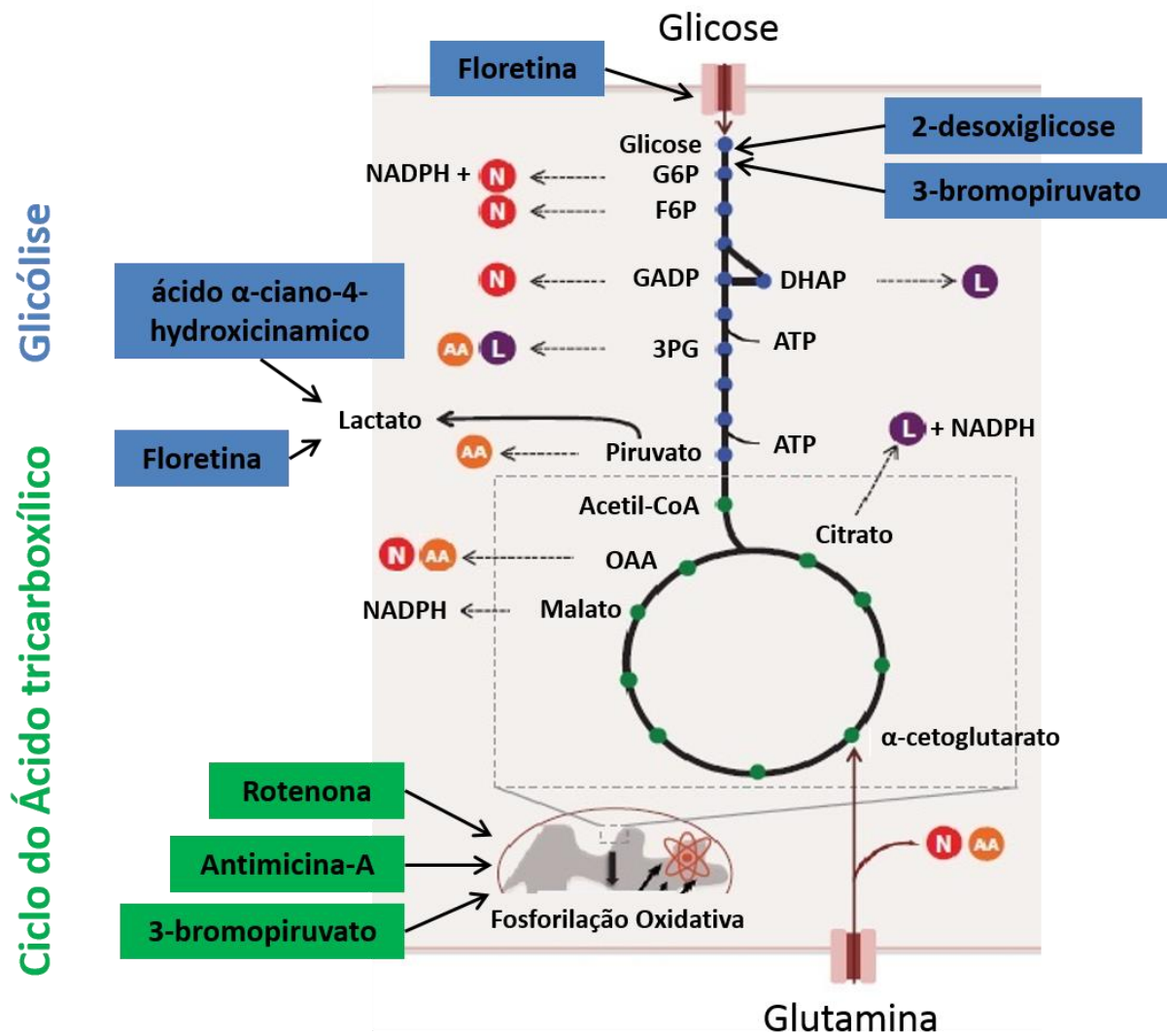
matriz extracelular e promoção de angiogênese (GATENBY; GILLIES, 2004; CANTOR; SABATINI, 2012). Portanto, propõe-se que o fenótipo glicolítico, além de conferir uma poderosa vantagem de crescimento, também é necessário para a evolução dos cânceres humanos invasivos (GATENBY; GILLIES, 2004).

Bonnet e seus colaboradores sugeriram que as células de câncer podem mudar o seu metabolismo para a glicólise, a fim de evitar a morte celular (BONNET *et al.* 2007). A evasão para esse processo ocorre pela superexpressão da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) impedindo a morte celular independente de caspases, presumivelmente através da estimulação da glicólise, aumentando os níveis de ATP celular, e promoção da autofagia (COLELL *et al.*, 2007).

### **1.3. Fármacos antimetabólicos**

Os tumores, de uma forma geral, apresentam modificações no metabolismo. Portanto, a inibição dos processos e das enzimas que participam do metabolismo alterado pode ter um efeito dramático sobre os tumores. Esse efeito pode ser devido não somente por uma limitação do fluxo bioenergético e reações anabólicas na célula cancerosa, mas também por meio da reversão do fenótipo neoplásico e, conseqüentemente, a interrupção do crescimento, induzindo a apoptose, e/ou bloqueando a angiogênese e invasão (KROEMER; POUYSSEGUR, 2008).

Assim sendo, a inibição do metabolismo, como o da glicólise, através da utilização dos diversos fármacos já existentes poderia reduzir os custos e potencializar tratamentos de quimioterapia e radioterapia quando utilizados em conjunto (MUÑOZ-PINEDO; EL MJIYAD; RICCI, 2012). Alguns exemplos de fármacos que atuam sobre o metabolismo são: 2-desoxiglicose (2-DG), 3-bromopiruvato (3-BP), ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (CHC), antimicina-A (AA), floretina (FT) e rotenona (ROT) (Figura 1).



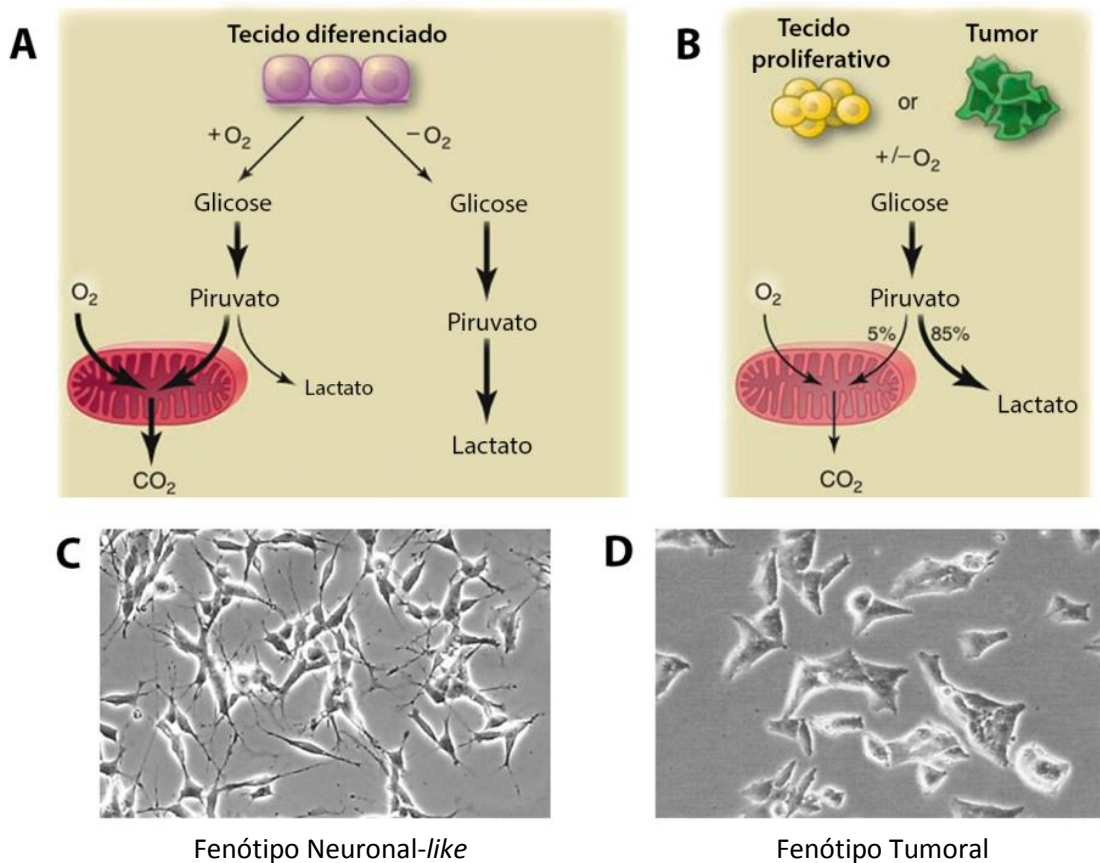
**Figura 1:** Diagrama esquemático da reprogramação metabólica em células de câncer. O esquema demonstra os passos da glicólise e intermediários utilizados na biossíntese de novas moléculas para sustentação das altas taxas de proliferação das células tumorais. Evidenciados os inibidores metabólicos em seus seguintes locais de ação: floretina (inibidor de GLUT e MCT1/4); 2-desoxiglicose (2-DG) (inibidor de hexoquinase); 3-bromopiruvato (3-BP) (inibidor da fosforilação oxidativa e da hexoquinase); ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (inibidor específico de MCT1); rotenona (inibidor de complexo I) e antimicina-A (inibidor de complexo III). Figura adaptada de CANTOR *et al.* 2012.

#### 1.4. Células SH-SY5Y como modelo de estudo do metabolismo do câncer

O neuroblastoma é uma doença originada no sistema nervoso simpático, o que possibilita que seus tumores possam se desenvolver em qualquer parte desse sistema

(MARIS, 2007). A linhagem celular SH-SY5Y é uma sub-linhagem estabelecida a partir de células SK-N-SH de uma biópsia de medula óssea de um paciente com neuroblastoma de origem ganglionar simpática adrenérgica no início da década de 70. A linhagem de células SK-N-SH contém células com três diferentes fenótipos: neuronal (tipo N), Schwanniano (tipo S) e intermediário (tipo I). Sendo que a linhagem de células SH-SY5Y é uma linhagem celular de neuroblastoma relativamente homogênea, correspondente predominantemente ao fenótipo do tipo N (HONG-RONG; HU; GUO-YI, 2010).

As células SH-SY5Y possuem a capacidade de proliferar em cultura por longos períodos sem contaminação e são facilmente induzidas para se diferenciarem em neurônios-*like* através de tratamentos com uma variedade de agentes como, por exemplo, o ácido retinóico (SINGH; KAUR, 2007; CHEUNG *et al.*, 2009; LOPES *et al.*, 2010). Por serem de origem humana, a linhagem de células SH-SY5Y apresenta características bioquímicas semelhantes às observadas em neurônios humanos. Deste modo, a linhagem celular SH-SY5Y tem sido amplamente utilizada em estudos experimentais neurológicos, incluindo análise de diferenciação neuronal, metabolismo, função relacionada com doenças neurodegenerativas e processos neuroadaptativos, neurotoxicidade e neuroproteção (MARIS *et al.*, 2007; HONG-RONG; HU; GUO-YI, 2010; LOPES *et al.*, 2010; SCHÖNHOFEN *et al.*, 2014). Assim, a linhagem de células SH-SY5Y diferenciadas com ácido retinóico é um modelo de fenótipo neuronal bem estabelecido na literatura com o mesmo genótipo que um modelo tumoral derivado de um neuroblastoma humano (Figura 2). Dessa forma, o estudo do metabolismo do câncer pode ser realizado sem o viés da diferença do genótipo entre a célula controle e a tumoral. Sendo assim, um bom modelo para a compreensão da ação de fármacos antimetabólicos como por exemplo, pela avaliação da citotoxicidade.



**Figura 2:** Diagramas esquemáticos e imagens representativas de contraste de fase de células com fenótipo neuronal e tumoral do neuroblastoma humano SH-SY5Y. A e B: Comparação do metabolismo de tecido diferenciado com um proliferativo. C e D: Comparação morfológica do fenótipo diferenciado e do tumoral da linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Adaptado de VANDER HEIDEN *et al.*, 2009 e LOPES *et al.*, 2010.

### 1.5. Avaliação da citotoxicidade

Ensaio para a avaliação da citotoxicidade permitem a análise dos efeitos tóxicos ou citostáticos em culturas celulares. A utilização de ensaios baseados em culturas de células para testes citotoxicidade de fármacos teve um aumento progressivo nos últimos anos. A simplificação dos métodos e a correlação com os dados de toxicidade *in vivo* têm contribuído para o aumento da utilização de ensaios baseados em células como forma alternativa para testes com animais em laboratórios de toxicologia. Existe uma variedade de formas de medir a viabilidade celular ou citotoxicidade *in vitro* no final de um tratamento experimental (RISS; NILES; MINOR, 2004).

O valor de dose letal 50 (LD<sub>50</sub>) foi estabelecido em 1927, por J.W. Trevan na tentativa de encontrar uma maneira de estimar a potência relativa de intoxicação por fármacos. O teste para a obtenção do LD<sub>50</sub>, como definido inicialmente por Trevan, era uma elegante aplicação de princípios estatísticos para ultrapassar a variabilidade inata de medições efetuadas pelo ensaio biológico de substâncias que não poderiam então ser analisadas quimicamente. Ele demonstrou que, para qualquer ponto final, a maior precisão de medição foi obtida por cálculo da dose à qual o efeito escolhido ocorreu em 50% da população de teste, sendo assim esse ponto foi denominado como a "dose letal 50" (DAYAN *et al.*, 1984). Atualmente este valor é utilizado para descrever a citotoxicidade de um novo fármaco.

Em cultura de células esse valor é expresso como sendo a concentração letal (LC<sub>50</sub>), sendo a concentração de um dado agente que é letal para 50% das células (DEPASS, 1989; ZHANG *et al.*, 2007). Assim sendo, o valor de concentração letal 50 (LC<sub>50</sub>) permite medir a citotoxicidade aguda de um material e também permite a comparação entre produtos químicos que envenenam o organismo de maneiras distintas.

Os resultados de testes de valor de concentração letal 50 (LC<sub>50</sub>) têm sido frequentemente utilizados para selecionar doses para estudos posteriores de toxicidade de dose repetida (DEPASS, 1989). Um teste de toxicidade bem conduzido pode fornecer informações úteis para a seleção da dose, como por exemplo, o nível de citotoxicidade do fármaco avaliado.



## **2. OBJETIVO GERAL**

Estabelecer o valor de concentração letal 50 (LC<sub>50</sub>) em células proliferativas e diferenciadas na linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y frente aos seguintes inibidores metabólicos: 2-desoxiglicose (2-DG), 3-bromopiruvato (3-BP), ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (CHC), antimicina-A (AA), floretina (FT) e rotenona (ROT).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Cultivo celular**

As culturas de células da linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y, foram obtidas da ATCC (Manassas, VA, EUA), e mantidas em meio de cultivo celular com concentração 1:1 dos meios comerciais HAM F12 e Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado com 10% Soro Fetal Bovino (SFB) inativado pelo calor, 1.000 U/mL de penicilina, 1.000 µg/mL de estreptomicina e 0,28 mg/mL de gentamicina, numa atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub> em ar a 37°C. O meio de cultivo celular foi substituído a cada três dias. As culturas de células foram sub-cultivadas quando a proliferação celular atingia a confluência de cerca de 80-90% (LOPES *et al.*, 2010).

#### **3.2. Diferenciação celular**

Após atingirem densidade inferior a 75% as culturas foram distribuídas em 30 poços de uma placa de 96 poços a uma densidade de  $2 \times 10^4$  células/poço. A indução da diferenciação celular ocorreu após 24 horas desse processo, período que permite o reestabelecimento e aderência das células. O meio de indução de diferenciação teve redução do SFB para 1% no meio de cultivo e suplementação deste com 10 mM de ácido retinóico (AR). Esse tratamento foi repetido a cada três dias pela substituição por meio de cultivo contendo ácido retinóico. No sétimo dia as células SH-SY5Y foram tratadas com os antimetabólicos. As células de fenótipo proliferativo foram adicionadas aos outros 30 poços da placa de 96 poços a uma densidade de  $2 \times 10^4$  células/poço no dia anterior ao tratamento (LOPES *et al.*, 2010).

#### **3.3. Densidade de neuritos**

A morfologia estrelada e a densidade de neuritos foram analisadas por imunofluorescência. As células de fenótipos proliferativo e diferenciado foram colocadas em placas de doze poços a uma densidade de  $10^5$  células/poço. As amostras foram lavadas com

PBS, fixadas com uma solução metanol/acetona (1:1) durante 20 minutos e permeabilizada com PBS/Tween 0,2%. Após esse período as células foram lavadas duas vezes com PBS, e o bloqueio foi realizado com uma solução de PBS/BSA a 1% por 1 h. Em seguida, as células foram incubadas durante a noite com o anticorpo anti-tubulina  $\beta$ III Alexa 488-conjugado (Abcam). Logo após, o corante nuclear Hoeschst 33258 (Molecular Probes) foi adicionado. Em seguida, cinco campos foram selecionados aleatoriamente e fotografados utilizando o microscópio invertido Olympus IX70 e os dados foram analisados com o software NIS-elements. A densidade de neuritos foi avaliada com o uso do software AutoQuant Neurites (versão demo), e expressa como unidades arbitrárias (U.A.).

### 3.4. Viabilidade celular

A citotoxicidade dos inibidores metabólicos foi avaliada em células diferenciadas e proliferativas da linhagem SH-SY5Y através do ensaio MTT (brometo de 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5 difeniltetrazólio). Este ensaio tem como objetivo geral avaliar a viabilidade celular, sendo utilizado para determinar a toxicidade de vários fármacos em diferentes concentrações.

As culturas de células da linhagem de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y de fenótipos proliferativo e diferenciado foram tratadas com os seguintes inibidores metabólicos: 2-DG (inibidor de hexoquinase); 3-BP (inibidor da hexoquinase e da fosforilação oxidativa); CHC (inibidor específico de MCT1); AA (inibidor de complexo III); FT (inibidor de GLUT e inibidor inespecífico de MCT1/4); ROT (inibidor de complexo I).

Após 24 horas de tratamento, as culturas foram observadas sob um microscópio invertido para identificar possíveis erros sistemáticos de semeadura e características de crescimento das culturas de células controle e células tratadas. Esses registros não foram utilizados como medida quantitativa de citotoxicidade. Após o exame das placas, o meio de cultivo foi cuidadosamente removido e as placas lavadas com PBS. Segundo as normas internacionais para ensaios de citotoxicidade *in vitro* publicadas em 2009 (ISO 10993-5), este passo é de fundamental importância, pois produtos químicos redutores do extrato podem também reduzir o MTT fazendo com que os resultados apresentem falsos negativos. Após a lavagem as culturas foram incubadas com 0,5 mg/mL de MTT por poço durante 1 hora a 37°C. O tetrazólio solúvel amarelo MTT é reduzido por células metabolicamente ativas, pela ação de enzimas desidrogenases para gerar equivalentes reduzidos, tais como NADH e

NADPH, resultando em cristais de formazan de coloração púrpura. Terminado o tempo de incubação, a solução de MTT foi cuidadosamente retirada e 100  $\mu$ L de DMSO foi adicionado em cada poço para a solubilização dos cristais de formazan. As placas foram gentilmente agitadas e subsequentemente transferidas para um leitor de placas para determinar a absorbância (SoftMax Pro, Molecular Devices, EUA) nos comprimentos de onda de 560 nm e 630 nm.

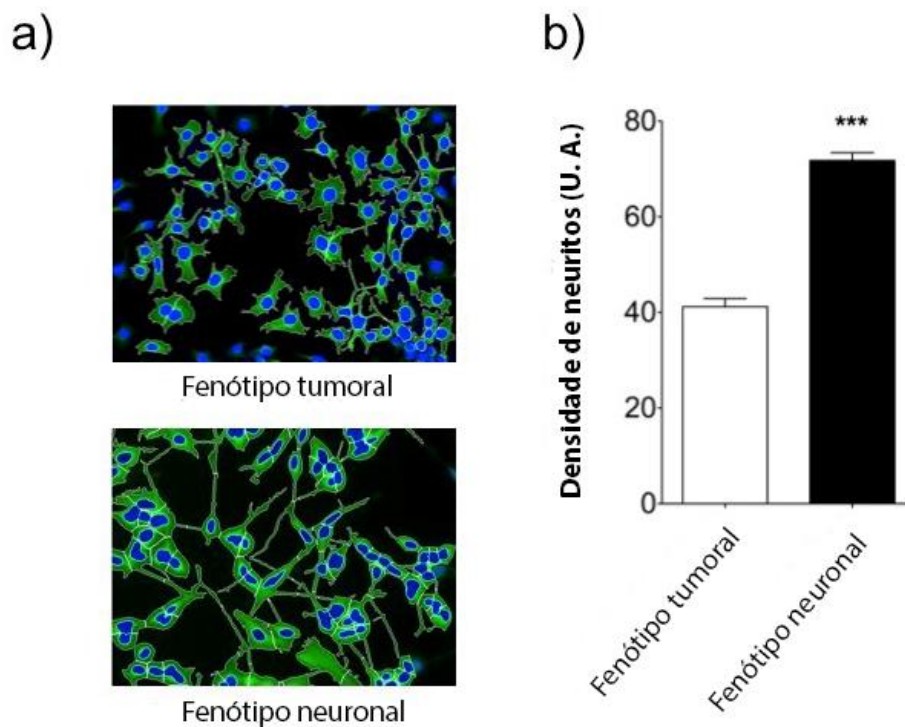
### **3.5. Análise estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Os dados foram analisados por teste t student. Diferenças foram consideradas significantes quando o  $p < 0.05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Caracterização Morfológica dos Fenótipos Tumoral e Neuronal da Linhagem de Neuroblastoma Humano SH-SY5Y

Na caracterização morfológica, os resultados demonstraram que as células com fenótipo neuronal apresentam visualmente mais neuritos em comparação com o fenótipo tumoral (Figura 3a). Esse resultado foi confirmado com as análises das imagens através da versão demo do software AutoQuant Neurites, onde as células com o fenótipo neuronal obtiveram aumento significativo na densidade de seus neuritos (Figura 3b).



**Figura 3:** Diferenças morfológicas na linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y nos fenótipos tumoral e neuronal. a) Imagens representativas de fluorescência em contraste de fase com núcleos corados com Hoeschst e citoesqueleto marcado com anti- $\beta$  III tubulin no fenótipo tumoral (não exposto ao AR) e no fenótipo neuronal. b) Quantificação da densidade de neuritos por corpo celular.

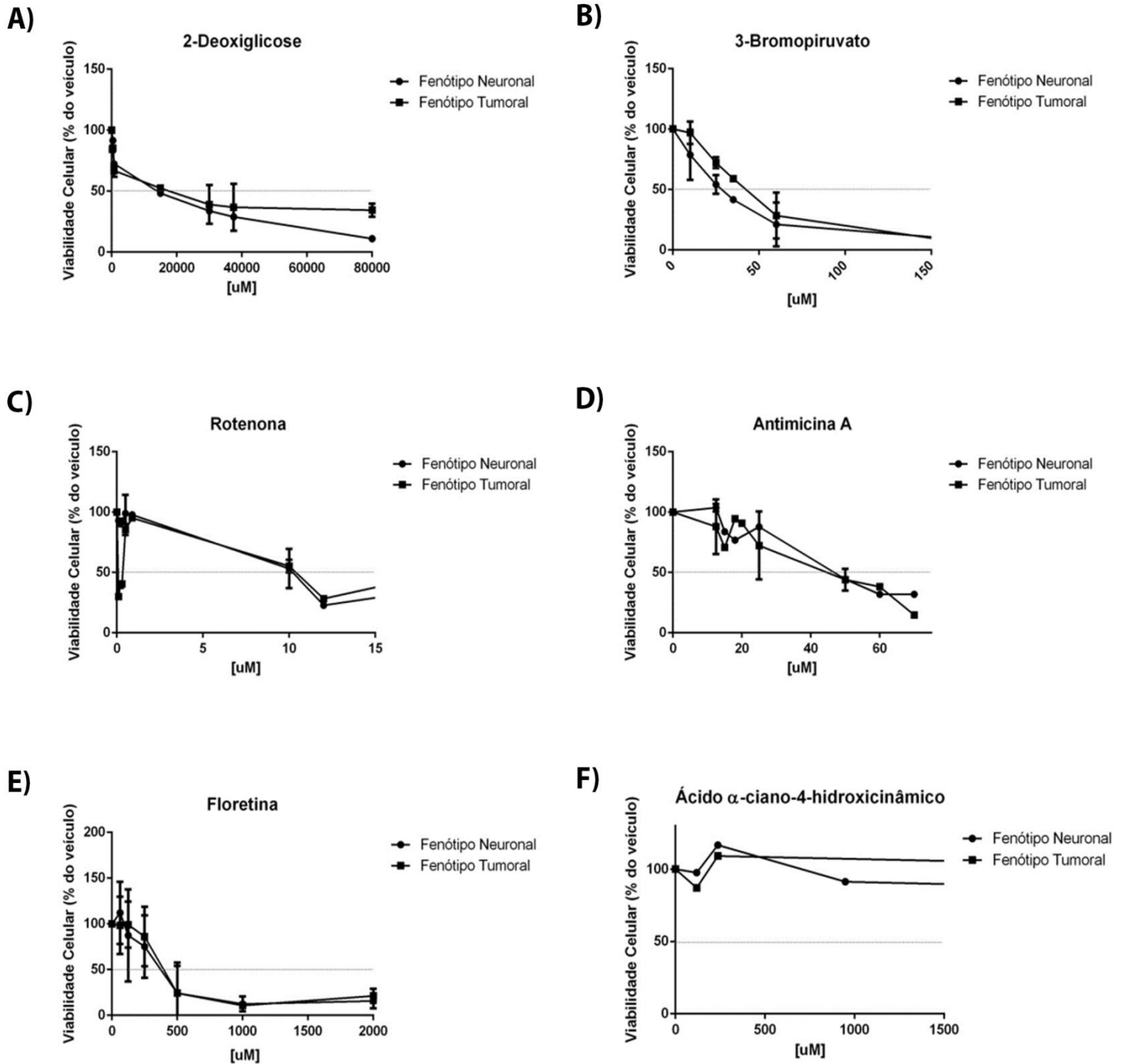
## 4.2. Citotoxicidade de Antimetabólicos

No ensaio de MTT, foi avaliada a citotoxicidade dos antimetabólicos em diferentes concentrações aplicadas como tratamentos nas culturas de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y nos fenótipos tumoral e neuronal, a fim de estabelecer a concentração que resulte no valor de concentração letal 50 (LC<sub>50</sub>). Como citado anteriormente, esse valor representa a concentração referente a 50% de mortalidade da população de células tratadas.

Analisando os dados apresentados nos gráficos da figura 4, podemos dizer que as células com ambos os fenótipos responderam a maioria dos tratamentos com os antimetabólicos observou-se uma diminuição da viabilidade celular de acordo com o aumento da concentração dos fármacos utilizados. Nas células tratadas com CHC não foi possível estabelecer o valor de concentração letal 50 (LC<sub>50</sub>) (Figura 4F).

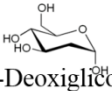
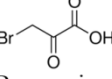
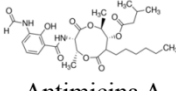
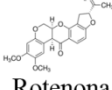
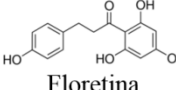
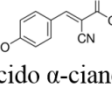
Entre os fármacos analisados, a ROT foi o antimetabólico que causou maior citotoxicidade, pois o LC<sub>50</sub> foi obtido com uma menor concentração quando comparado aos demais antimetabólicos (Figura 4C). O inibidor que causou menor citotoxicidade, dentre os seis analisados, foi o 2-desoxiglicose (2-DG) (Figura 4A).

Analisando os dados apresentados na tabela 1, podemos dizer que ocorreu diferença estatística no efeito da citotoxicidade do antimetabólico 3-bromopiruvato (3-BP) no fenótipo neuronal, enquanto que não ocorreu diferença estatística quando comparados os efeitos da citotoxicidade dos demais fármacos em ambos os fenótipos avaliados.



**Figura 4:** Citotoxicidade dos inibidores metabólicos avaliada pelo valor de concentração letal 50 (LC<sub>50</sub>). Curvas de citotoxicidade dos fármacos antimetabólicos no tratamento de 24h: A) 2-desoxiglicose (2-DG), B) 3-bromopiruvato (3-BP), C) rotenona (ROT), D) antimicina-a (AA), E) floretina (FT), F) ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (CHC).

**Tabela 1:** Citotoxicidade dos fármacos antimetabólicos nos fenótipos tumoral e diferenciado do neuroblastoma humano SH-SY5Y. Tabela contendo as estruturas químicas, o  $LC_{50}$  ( $\mu M$ ) e a diferença estatística.  $P < 0.05$  utilizado para três experimentos independentes em triplicata ( $n=3$ ).

Droga/Estrutura	$LC_{50}$ [ $\mu M$ ]		$P$ (teste t)
	Fenótipo Neuronal	Fenótipo Tumoral	
 2-Deoxiglicose	19250 $\pm$ 4922	32441 $\pm$ 8383	0,2463
 3-Bromopiruvato	25,32 $\pm$ 4,603	49,56 $\pm$ 5,467	0,0275*
 Antimicina A	47,28 $\pm$ 0,6145	45,76 $\pm$ 0,9600	0,2523
 Rotenona	16,23 $\pm$ 3,771	19,46 $\pm$ 0,5387	0,4439
 Floretina	330,0 $\pm$ 134,2	410,8 $\pm$ 105,8	0,6610
 Ácido $\alpha$ -ciano-4 hidroxicinâmico	-	-	-



## 5. DISCUSSÃO

Mesmo com o avanço das estratégias terapêuticas, a sobrevivência global entre os pacientes com câncer em estágio final manteve-se estável há mais de 40 anos. De fato, observa-se que a melhor chance de sobrevivência ao câncer depende de um diagnóstico precoce seguido por remoção cirúrgica (KIM, 2015). Entretanto, em muitos tipos tumorais os tratamentos atuais são altamente ineficientes, beneficiando apenas uma média de 25% dos pacientes (SPEAR; HEATH-CHIOZZI; HUFF, 2001). Globalmente, os gastos anuais nos medicamentos para o tratamento contra o câncer foram de aproximadamente 49.000 milhões dólares em 2011, dos quais, por inferência, cerca de 37.000 milhões dólares foram gastos para induzir efeitos adversos sem entregar benefícios ao paciente (KIM, 2015). E, embora tenhamos uma maior compreensão da biologia e da genética do câncer, a erradicação ou controle da doença ainda não foi alcançado.

Sabe-se que o processo de carcinogênese cria microambientes que levam a hipóxia, acidose e produção de espécies reativas de oxigênio, sendo que esse ambiente pode induzir a instabilidade genética, formando uma combinação que promove a heterogeneidade fenotípica do tumor (GILLIES; GATENBY, 2015). De fato, existem milhares de mutações pontuais, ampliações, translocações e deleções que podem contribuir para o desenvolvimento do câncer, e essas mutações podem variar mesmo entre tumores histopatologicamente idênticos (CANTOR; SABATINI, 2012).

Assim sendo, a tumorigênese em humanos é um processo que ocorre em várias etapas, as quais levam a alterações genéticas que conduzem a transformação progressiva de células humanas normais em derivados altamente malignos (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Uma das características essenciais na fisiologia de células de cânceres invasivos é a alteração metabólica, onde, mesmo na presença de oxigênio, as células de câncer consomem glicose avidamente de forma a aumentar a absorção e incorporação de nutrientes nos blocos de construção celular, tais como nucleotídeos, aminoácidos, e lipídeos que são necessários para as altas taxas de proliferação nesse tipo celular (DEBERARDINIS *et al.*, 2007; CANTOR; SABATINI, 2012).

Segundo Hanahan e Weinberg, a regulação metabólica está intrinsecamente ligada à progressão do câncer (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Portanto a administração de inibidores do metabolismo alterado no câncer pode ser a chave para eliminar células neoplásicas e evitar danos às células normais adjacentes. Logo, ao longo dos anos foram

desenvolvidos inibidores contra praticamente todas as etapas de glicólise que estão sendo testados extensivamente *in vitro*, *in vivo* e em ensaios clínicos. Alguns desses fármacos possuem baixo custo, e combinações com a quimioterapia podem ser interessantes de serem exploradas na clínica (MUÑOZ-PINEDO; EL MJIYAD; RICCI, 2012). Entretanto, em muitos casos, são necessários estudos adicionais para melhorar a aplicabilidade desses fármacos.

Por essa razão, é de suma importância elucidar os mecanismos de atuação da reprogramação metabólica e sua interação com antimetabólicos, assim com a relação desses antimetabólicos com células saudáveis. Estratégias terapêuticas como essa podem diminuir o risco de efeitos colaterais graves como a morte de células saudáveis e, somado a esse fator, sejam de custo reduzido.

Com base nessas informações, o presente estudo teve como objetivo a avaliação da citotoxicidade através do ensaio MTT para a análise do valor da concentração letal 50 (LC<sub>50</sub>) de seis inibidores metabólicos: 2-DG, 3-BP, CHC, AA, FT e ROT.

Para tal finalidade foram utilizadas as células proliferativas e diferenciadas da linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y já estabelecidas na literatura como modelo para pesquisas de neurotoxicidade (LOPES *et al.*, 2012; SCHÖNHOFEN *et al.*, 2014). A linhagem celular SH-SY5Y derivada de neuroblastoma foi escolhida para o desenvolvimento deste projeto por possuir a capacidade de proliferar em cultura por longos períodos e por ser facilmente induzida a se diferenciar novamente em neurônios através de tratamentos com uma variedade de agentes (LOPES *et al.*, 2010). Segundo LOPES *et al.*, 2010 a linhagem celular SH-SY5Y derivada de neuroblastoma humano quando tratada com ácido retinóico apresenta características morfológicas e bioquímicas de neurônios dopaminérgicos maduros.

Com base nessas informações analisamos a diferença morfológica entre os fenótipos. Como esperado, houve um aumento na densidade de neuritos nas células com fenótipo neuronal. Lopes e colaboradores estabeleceram em seu trabalho de 2010 a padronização dessa diferenciação, onde o aumento da densidade de neuritos no fenótipo neuronal acompanha um aumento do número de marcadores de neurônios maduros. Portanto, fazendo uso desse modelo de estudo é possível analisar células de origem humana de mesmo genótipo com a possibilidade de avaliar dois diferentes fenótipos: tumoral e neuronal-*like*.

O índice terapêutico de um fármaco é determinado pela sua capacidade de distinção entre uma célula normal e uma célula tumoral. Entretanto, apesar de já existirem fármacos antimetabólicos em estudo clínico, ainda existem poucos estudos sobre a caracterização do alvo terapêutico desses fármacos (KROEMER; POUYSSEGUR, 2008). Portanto, entender as

diferenças metabólicas desses fármacos entre essas células é fundamental para o desenvolvimento de um fármaco que seja citotóxico apenas para o fenótipo tumoral.

Como citado anteriormente, o valor de concentração letal 50 (LC<sub>50</sub>) tem como finalidade estimar a toxicidade dos fármacos. Uma avaliação geral dos resultados obtidos indicou uma diferença significativa entre as concentrações necessárias para atingir o valor de concentração letal 50 (LC<sub>50</sub>), identificando diferenças de citotoxicidade entre os fármacos avaliados. Entre os fármacos analisados, a ROT foi o antimetabólico que apresentou maior citotoxicidade, necessitando de uma menor concentração para atingir o LC<sub>50</sub> quando comparado aos demais antimetabólicos. A ROT atua na fosforilação oxidativa, pois esse antimetabólico inibe o complexo I da cadeia transportadora de elétrons, impedindo a passagem de elétrons do NADH para a enzima ubiquinona oxidoredutase. O bloqueio do complexo I gera uma drástica redução no consumo de oxigênio e, conseqüentemente, na produção de ATP (GAO; LIU; HONG, 2003; LI *et al.*, 2003). Já o tratamento com AA, que é um inibidor do complexo III da mitocôndria, não teve efeito na sensibilidade tão acentuado quanto à rotenona, possivelmente pelo fato desse fármaco não ter uma ação completa na inibição da transferência de elétrons da ubiquitina para o citocromo b na cadeia transportadora de elétrons (TEICHER; LINEHAN; HELMAN, 2012). Os dois fármacos não apresentaram diferença estatística na citotoxicidade entre os fenótipos. Esse resultado pode indicar que a fosforilação oxidativa pode exercer um papel semelhante em ambos os fenótipos.

No tratamento com CHC, não foi possível estabelecer o LC<sub>50</sub>, embora tenha sido evidenciado o efeito desse fármaco em ambos os fenótipos analisados. O CHC inibe de forma específica o transportador de monocarboxilado do tipo 1 (MCT1). Esse transportador está relacionado com a entrada de lactato no interior das células (FUJIWARA *et al.*, 2015). Com o bloqueio desta via, as células são forçadas a restringir seu catabolismo a outras duas moléculas abundantes no meio de cultivo nos quais se encontram: glicose e glutamato. Por essa razão, não foi possível evidenciar a citotoxicidade deste fármaco devido à plasticidade metabólica das células analisadas. Outro inibidor não específico dos transportadores do tipo MCT avaliado foi o fármaco FT. A FT atua como inibidor competitivo de transportadores de glicose (GLUTs) e inibidor inespecífico dos transportadores do tipo MCT1/4 (MANNING FOX, MEREDITH, HALESTRAP, 2000). Ensaios pré-clínicos com floretina demonstraram retardo no crescimento tumoral (PORPORATO *et al.*, 2011). De uma forma igualmente interessante, a FT é um flavonóide que atua como antioxidante na eliminação de peroxinitrito e na inibição da peroxidação lipídica. Em comparação com compostos estruturalmente relacionados, verificou-se que a atividade da FT é aumentada pelo grupo carbonila (COOH)

(REZK *et al.*, 2002). O tratamento com FT não apresentou diferença estatística na citotoxicidade entre os fenótipos.

O inibidor que causou menor citotoxicidade dentre os seis analisados foi o 2-DG. Ao mesmo passo que esse fármaco não apresentou diferença estatística na citotoxicidade entre os dois fenótipos. A 2-DG é convertida a 2-desoxiglicose fosforilada pela hexoquinase, tornando-se presa no interior da enzima ocasionando a inibição. Uma consequência direta desse efeito é a diminuição das concentrações de ATP, que em última instância a supressão da proliferação celular (ZHONG *et al.*, 2009). Esses dados podem indicar que a glicólise é importante em ambos os fenótipos. Entretanto, esse inibidor não foi o único a não apresentar diferença estatística entre os fenótipos. Os inibidores metabólicos ROT, a AA e a FT, do mesmo modo, não apresentaram diferenças estatísticas entre os fenótipos.

No metabolismo de células neuronais normais a glicose é uma fonte de energia essencial para o cérebro humano adulto, consumindo cerca de 25% da glicose produzida pelo organismo. No cérebro, a glicose não é apenas um excelente combustível energético, mas como discutido anteriormente também é um precursor versátil no fornecimento de intermediários para reações metabólicas de biossíntese. No cérebro, a maioria destes intermediários serve para sintetizar neurotransmissores e gliotransmissores, bem como outras moléculas de importância biológica (BELTRÁN *et al.*, 2007).

Medições quantitativas do metabolismo cerebral revelam que aproximadamente 10-12% da glicose total consumida por um cérebro normal adulto se dá na presença de oxigênio. Em condições normais, em um cérebro adulto acordado e descansado, o efluxo de lactato é provavelmente mais responsável por cerca de 20% desse excesso de consumo de glicose. Esse excesso no consumo de glicose no cérebro é referido como “glicólise aeróbica” sobre a base de um fenômeno similar, bem descrito encontrado em células de câncer (GOYAL *et al.*, 2014). Pesquisas recentes demonstram que a glicólise aeróbica aumenta durante a infância, precisamente quando o crescimento sináptico se encontra sobre taxas mais elevadas.

O LC<sub>50</sub> de células diferenciadas e proliferativas não apresentaram diferença estatística na citotoxicidade dos seguintes fármacos 2-DG, FL, ROT e AA. Isso se deve possivelmente ao fato de que ambos compartilham as mesmas características glicolíticas por serem derivados de células altamente glicolíticas durante situação fisiológica normal como os neurônios. O neuroblastoma é um tumor sólido derivado de neurônios da linhagem simpaticoadrenal da crista neural e, por conseguinte, suas características proliferativas e seu metabolismo possuem alta influência do metabolismo neuronal do qual deriva (MARIS *et al.*, 2007).

O antimetabólico 3-BP tem a capacidade de atuar como análogo de piruvato e lactato, também sendo capaz de reagir com grupos tiol (SH) e atuar na alquilação de grupos hidroxila (OH) de grupos de várias enzimas (PEREIRA DA SILVA *et al.*, 2009). Existem registros de que a morte de células de câncer induzida pelo tratamento com 3-bromopiruvato depende do esgotamento do estoque celular de ATP (CARDACI; DESIDERI; CIRIOLO, 2012). Esse esgotamento do ATP nas células se dá através da inibição da atividade da hexoquinase mitocondrial através da interação do 3-BP com o grupo tiol (SH) da enzima (PEREIRA DA SILVA *et al.*, 2009). Tentativas bem documentadas para curar o câncer, bloqueando o efeito Warburg ao nível da glicólise, foram amplamente discutidas por Antônio Galina que demonstrou que o 3-bromopiruvato não só atinge a glicólise, mas também interfere na fosforilação oxidativa (GALINA, 2014).

Esses resultados podem ter sido ocasionados por diferenças entre estudos *in vivo* e *in vitro*, visto que o sistema nervoso apresenta características exclusivas que não são mantidas nos estudos *in vitro*. Estudos *in vivo* demonstram que células neuronais são extremamente incorporadas em uma rede complexa com vários tipos celulares do sistema nervoso central e com células dos tecidos somáticos, onde qualquer processo que interrompa a integridade estrutural e funcional dessa rede inevitavelmente irá alterar o comportamento metabólico normal dessas células (BRADY; SIEGEL, 2012). Deste modo, as células com fenótipo diferenciado possuem uma quantidade menor de estímulos, enquanto que as células proliferativas mantêm diversas rotas metabólicas ativas para manter a homeostase necessária para a divisão e sobrevivência celular.

Este trabalho faz parte de um projeto de grande porte que visa esclarecer dúvidas sobre o comportamento metabólico de células neoplásicas utilizando como modelo as células com fenótipos tumoral e neuronal das células da linhagem SH-SY5Y. Para tal objetivo, primeiramente esse trabalho de conclusão de curso estabeleceu um padrão de dose-tratamento dos inibidores metabólicos para esse modelo. Posteriormente, esses dados serão utilizados para a realização de um co-tratamento de inibidores antimetabólicos e moduladores das taxas de consumo de oxigênio. Já foi demonstrado em células de *Arabidopsis thaliana* que a modulação metabólica ocasionou evidente realocação de enzimas glicolíticas (GRAHAM, *et al.*, 2007). Atualmente, sabe-se que as enzimas possuem um importante papel no metabolismo do câncer (XU *et al.*, 2005). Mas nunca foi demonstrado uma translocação dessas enzimas devido à modulação da respiração mitocondrial nas células neoplásicas.

Portanto, é de suma importância saber se as enzimas glicolíticas em células de câncer também possuem a sua localização alterada devido à modulação do consumo de oxigênio pela

mitocôndria para compreender a forma como essas células respondem aos tratamentos. Desse modo, poderemos compreender melhor a biologia desse tipo celular e, conseqüentemente, desenhar novas formas de tratamento para o câncer.

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho são parte integrante de uma dissertação de mestrado que visa avaliar o possível efeito da modulação da taxa respiratória na sensibilidade, frente a fármacos antimetabólicos, dos fenótipos tumoral e neuronal da linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y. O estudo nessa linhagem de neuroblastoma tem como objetivo final entender o papel da modulação da respiração mitocondrial quando exercido o co-tratamento com antimetabólicos nas células com fenótipos neuronal e tumoral. Assim, poderemos compreender melhor a biologia do câncer.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BELTRÁN, F. A.; ACUÑA, A. I.; MIRÓ, M. P.; CASTRO, M. A. Brain Energy Metabolism in Health and Disease. In CONTRERAS, C. M. (Ed.) **Neuroscience – Dealing with Frontiers**. Croácia: InTech, 2012. p. 331–362.

BONNET, S.; ARCHER, S. L.; ALLALUNIS-TURNER, J.; HAROMY, A.; BEAULIEU, C.; THOMPSON, R.; LEE, C. T.; LOPASCHUK, G. D.; PUTTAGUNTA, L.; BONNET, S.; HARRY, G.; HASHIMOTO, K.; PORTER, C. J.; ANDRADE, M. a.; THEBAUD, B.; MICHELAKIS, E. D. A Mitochondria-K<sup>+</sup> Channel Axis Is Suppressed in Cancer and Its Normalization Promotes Apoptosis and Inhibits Cancer Growth. **Cancer Cell**, v. 11, n. 1, p. 37–51, 2007.

CANTOR, J. R.; SABATINI, D. M. Cancer cell metabolism: One hallmark, many faces. **Cancer Discovery**, v. 2, n. 10, p. 881–898, 2012.

CARDACI, S.; DESIDERI, E.; CIRIOLO, M. R. Targeting aerobic glycolysis: 3-Bromopyruvate as a promising anticancer drug. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 44, n. 1, p. 17–29, 2012.

CHEUNG, Y.; LAU, W. K.; YU, M.; LAI, C. S.; YEUNG, S.; SO, K.; CHANG, R. C. Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research. **NeuroToxicology**, v. 30, p. 127–135, 2009.

COLELL, A.; RICCI, J. E.; TAIT, S.; MILASTA, S.; MAURER, U.; BOUCHIER-HAYES, L.; FITZGERALD, P.; GUIO-CARRION, A.; WATERHOUSE, N. J.; LI, C. W.; MARI, B.; BARBRY, P.; NEWMAYER, D. D.; BEERE, H. M.; GREEN, D. R. GAPDH and Autophagy Preserve Survival after Apoptotic Cytochrome c Release in the Absence of Caspase Activation. **Cell**, v. 129, n. 5, p. 983–997, 2007.

DAYAN, A. D.; JACKSON, M.; CLARK, B.; MORGAN, H. Role of the LD<sub>50</sub> test in the pharmaceutical industry. **The Lancet**, v. March, n. 10, p. 555–556, 1984.

DEBERARDINIS, R. J.; MANCUSO, A.; DAIKHIN, E.; NISSIM, I.; YUDKOFF, M.; WEHRLI, S.; THOMPSON, C. B. Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 49, p. 19345–19350, 2007.

DEPASS, L. R. Alternative approaches in median lethality (LD<sub>50</sub>) and acute toxicity testing. **Toxicology letters**, v. 49, n. 2-3, p. 159–170, 1989.

EL MJIYAD, N.; CARO-MALDONADO, a; RAMÍREZ-PEINADO, S.; MUÑOZ-PINEDO, C. Sugar-free approaches to cancer cell killing. **Oncogene**, v. 30, n. 3, p. 253–264, 2011.

FUJIWARA, S.; WADA, N.; KAWANO, Y.; OKUNO, Y.; KIKUKAWA, Y.; ENDO, S.; NISHIMURA, N.; UENO, N.; MITSUYA, H.; HATA, H. Lactate, a putative survival factor for myeloma cells, is incorporated by myeloma cells through monocarboxylate transporters 1. **Experimental Hematology & Oncology**, v. 4, n. 1, p. 1–8, 2015.



GALINA, A. Mitochondria: 3-bromopyruvate vs. mitochondria? A small molecule that attacks tumors by targeting their bioenergetic diversity. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 54, p. 266–271, 2014.

GAO, H.-M.; LIU, B.; HONG, J.-S. Critical role for microglial NADPH oxidase in rotenone-induced degeneration of dopaminergic neurons. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 23, n. 15, p. 6181–6187, 2003.

GAO, J.-L.; CHEN, Y.-G. Natural Compounds Regulate Glycolysis in Hypoxic Tumor Microenvironment. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–8, 2015.

GATENBY, R. a; GILLIES, R. J. Why do cancers have high aerobic glycolysis? **Nature reviews. Cancer**, v. 4, n. 11, p. 891–899, 2004.

GILLIES, R. J.; GATENBY, R. A. Metabolism and Its Sequelae in Cancer Evolution and Therapy. **The Cancer Journal**, v. 21, n. 2, p. 88–96, 2015.

GOYAL, M. S.; HAWRYLYCZ, M.; MILLER, J. a.; SNYDER, A. Z.; RAICHLER, M. E. Aerobic glycolysis in the human brain is associated with development and neotenus gene expression. **Cell Metabolism**, v. 19, n. 1, p. 49–57, 2014.

GRAHAM, J. W. A.; WILLIAMS, T. C. R.; MORGAN, M.; FERNIE, A. R.; RATCLIFFE, R. G.; SWEETLOVE, L. J. Glycolytic Enzymes Associate Dynamically with Mitochondria. **The Plant Cell**, v. 19, p. 3723–3738, 2007.

GREAVES, M.; MALEY, C. C. Clonal evolution in cancer. **Nature**, v. 481, n. 7381, p. 306–313, 2012.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. a. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, p. 57–70, 2000.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. a. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HONG-RONG, X.; HU, L.; GUO-YI, L. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. **Chinese Medical Journal**, v. 123, n. 8, p. 1086–1092, 2010.

KELLOFF, G. J.; SIGMAN, C. C. Cancer biomarkers: selecting the right drug for the right patient. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 11, n. 3, p. 201–214, 2012.

KIM, S. Cancer Metabolism : Strategic Diversion from Targeting Cancer Drivers to Targeting Cancer Suppliers. **Biomolecules ans Therapeutics**, v. 23, n. 2, p. 99–109, 2015.

KROEMER, G.; POUYSSEGUR, J. Tumor Cell Metabolism: Cancer's Achilles' Heel. **Cancer Cell**, v. 13, n. 6, p. 472–482, 2008.

LI, N.; RAGHEB, K.; LAWLER, G.; STURGIS, J.; RAJWA, B.; MELENDEZ, J. A.; ROBINSON, J. P. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 10, p. 8516–8525, 2003.

LOPES, F. M.; LONDERO, G. F.; DE MEDEIROS, L. M.; DA MOTTA, L. L.; BEHR, G. A.; DE OLIVEIRA, V. A.; IBRAHIM, M.; MOREIRA, J. C. F.; DE OLIVEIRA PORCIÚNCULA, L.; DA ROCHA, J. B. T.; KLAMT, F. Evaluation of the neurotoxic/neuroprotective role of organoselenides using differentiated human neuroblastoma SH-SY5Y cell line challenged with 6-hydroxydopamine. **Neurotoxicity Research**, v. 22, n. 2, p. 138–149, 2012.

LOPES, F. M.; SCHRÖDER, R.; JÚNIOR, M. L. C. D. F.; ZANOTTO-FILHO, A.; MÜLLER, C. B.; PIRES, A. S.; MEURER, R. T.; COLPO, G. D.; GELAIN, D. P.; KAPCZINSKI, F.; MOREIRA, J. C. F.; FERNANDES, M. D. C.; KLAMT, F. Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies. **Brain Research**, v. 1337, p. 85–94, 2010.

MANNING FOX, J. E.; MEREDITH, D.; HALESTRAP, A. P. Characterisation of human monocarboxylate transporter 4 substantiates its role in lactic acid efflux from skeletal muscle. **Journal of Physiology**, v. 529, n. 2, p. 285-293, 2000.

MARIS, J. M.; HOGARTY, M. D.; BAGATELL, R.; COHN, S. L. Neuroblastoma. **The Lancet**, v. 369, p. 2106–2120, 2007.

MUÑOZ-PINEDO, C.; EL MJIYAD, N.; RICCI, J.-E. Cancer metabolism: current perspectives and future directions. **Cell Death and Disease**, v. 3, n. 1, p. 248-258, 2012.

PEREIRA DA SILVA, A. P.; EL-BACHA, T.; KYAW, N.; DOS SANTOS, R. S.; DA-SILVA, W. S.; ALMEIDA, F. C. L.; DA POIAN, A. T.; GALINA, A. Inhibition of energy-producing pathways of HepG2 cells by 3-bromopyruvate. **The Biochemical journal**, v. 417, n. 3, p. 717–726, 2009.

PORPORATO, P. E.; DHUP, S.; DADHICH, R. K.; COPETTI, T.; SONVEAUX, P. Anticancer targets in the glycolytic metabolism of tumors: A comprehensive review. **Frontiers in Pharmacology**, v. august, p. 1–18, 2011.

REZK, B. M.; HAENEN, G. R. M. M.; VAN DER VIJGH, W. J. F.; BAST, A. The antioxidant activity of phloretin: The disclosure of a new antioxidant pharmacophore in flavonoids. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 295, n. 1, p. 9–13, 2002.

RISS, T. L.; NILES, A. L.; MINOR, L. Cell Viability Assays Assay Guidance Manual. **Assay Guidance Manual**, EUA: Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004. p. 1–23.

SCHÖNHOFEN, P.; DE MEDEIROS, L. M.; BRISTOT, I. J.; LOPES, F. M.; DE BASTIANI, M. a.; KAPCZINSKI, F.; CRIPPA, J. A. S.; CASTRO, M. A. a.; PARSONS, R. B.; KLAMT, F. Cannabidiol Exposure During Neuronal Differentiation Sensitizes Cells Against Redox-Active Neurotoxins. **Molecular neurobiology**, p. 1-12, 2014.

SINGH, J.; KAUR, G. Transcriptional regulation of polysialylated neural cell adhesion molecule expression by NMDA receptor activation in retinoic acid-differentiated SH-SY5Y neuroblastoma cultures. **Brain Research**, v. 1154, 8-21, 2007.

SPEAR, B. B.; HEATH-CHIOZZI, M.; HUFF, J. Clinical application of pharmacogenetics. **Trends in Molecular Medicine**, v. 7, n. 5, p. 201–204, 2001.

ISO (International Standardization Organization). **ISO 10993-5**: Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity, Geneva: International Organization for Standardization, v. 3, 2009.

TEICHER, B. a.; LINEHAN, W. M.; HELMAN, L. J. Targeting cancer metabolism. **Clinical Cancer Research**, v. 18, n. 20, p. 5537–5545, 2012.

VANDER HEIDEN, M. G.; CANTLEY, L. C.; THOMPSON, C. B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. **Science**, v. 324, n. 5930, p. 1029–1033, 2009.

XU, R.; PELICANO, H.; ZHOU, Y.; CAREW, J. S.; FENG, L.; BHALLA, K. N.; KEATING, M. J.; HUANG, P. Inhibition of Glycolysis in Cancer Cells : A Novel Strategy to Overcome Drug Resistance Associated with Mitochondrial Respiratory Defect and Hypoxia Inhibition of Glycolysis in Cancer Cells : A Novel Strategy to Overcome Drug Resistance Associated with Mi. **Cancer Research**, v. 65, n. 2, p. 613–621, 2005.

ZHANG, M.; AGUILERA, D.; DAS, C.; VASQUEZ, H.; ZAGE, P.; GOPALAKRISHNAN, V.; WOLFF, J. Measuring cytotoxicity: A new perspective on LC<sub>50</sub>. **Anticancer Research**, v. 27, n. 1 A, p. 35–38, 2007.

ZHONG, D.; XIONG, L.; LIU, T.; LIU, X.; LIU, X.; CHEN, J.; SUN, S. Y.; KHURI, F. R.; ZONG, Y.; ZHOU, Q.; ZHOU, W. The glycolytic inhibitor 2-deoxyglucose activates multiple prosurvival pathways through IGF1R. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 35, p. 23225–23233, 2009.