



Ana Margarida Coelho Abrantes

# HIPOXIA TUMORAL — METABONÓMICA E IMAGEM ESTUDO EXPERIMENTAL

Tese de Doutoramento apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra para  
obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde, área de especialização de Ciências Biomédicas.

2013



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



Ana Margarida Coelho Abrantes

**Hipoxia Tumoral – Metabonómica e Imagem**  
**Estudo Experimental**

Coimbra  
2013

Capa.  
Cell #1  
Angela Canada Hopkins, © 2011

Dissertação de Doutoramento apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra para obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde, ramo Ciências Biomédicas, especialização em Biofísica, sob a orientação da Professora Maria Filomena Botelho, da Professora Maria Elisa Serra e do Professor Rui de Albuquerque Carvalho.

A Faculdade de Medicina não aceita qualquer responsabilidade em relação à doutrina e à forma desta dissertação.

(Regimento da Faculdade de Medicina de Coimbra, 1931, Artigo 108, parágrafo único)

*"Cancer, above all other diseases, has countless secondary causes. But, even for cancer, there is only one prime cause, is the replacement of the respiration of oxygen in normal body cells by a fermentation of sugar."*

**Otto H. Warburg**



O trabalho experimental descrito nesta tese foi realizado:

- No Serviço de Biofísica – IBILI, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra
- No Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra
- No Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra
- No Serviço de Bioquímica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

O espectrómetro de RMN 600MHz usado nas experiências integra a rede Nacional de RMN e foi adquirido no quadro do Programa Nacional para Reequipamento Científico, contrato REDE/1517/RMN/2005 com financiamento do POCI 2010 (FEDER) e da Fundação para a Ciência e Tecnologia.



À Professora Doutora Maria Filomena Botelho  
À Professora Doutora Maria Elisa Serra  
Ao Professor Doutor Rui Albuquerque de Carvalho



Aos meus Pais e Irmã

Ao meu Irmão

Ao Emanuel



A todos os meus Mestres



Aos meus Amigos

Aos meus Colegas







## Prefácio

Existem factos de que a hipoxia constitui um factor condicionante na terapêutica dos tumores sólidos. À medida que estes tumores crescem, ocorre angiogénese, no entanto, o aporte sanguíneo às células que constituem as camadas mais internas diminui, ficando estas privadas de oxigénio e nutrientes. Tendo em conta este facto, a enorme necessidade de avaliar a extensão da hipoxia tumoral através de métodos minimamente invasivos e facilmente objectiváveis, como por exemplo através de uma imagem molecular obtida após administração de radiofármacos determinou o início deste projecto. O desenvolvimento de radiofármacos capazes de serem marcados com o radionuclídeo mais utilizado na Medicina Nuclear, o Tecnécio-99m, tornou-se um dos objectivos principais deste trabalho. No entanto, à medida que diferentes abordagens de síntese química foram efectuadas e que diferentes procedimentos de marcação e de avaliação foram desenvolvidos, muitas dúvidas surgiram. Estas dúvidas determinaram objectivos secundários que permitiram aprofundar o conhecimento sobre o microambiente em que o carcinoma colorrectal se desenvolve assim como a sua adaptação a ambientes com reduzida pressão parcial de oxigénio.

À Professora Doutora Maria Filomena Botelho, Directora do Serviço de Biofísica, Professora Catedrática da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, devo a orientação desta Dissertação, apoio, incentivo na procura de colaborações, disponibilidade, dedicação e empenho diários ao longo do seu desenvolvimento. Agradeço pelas críticas e conselhos na revisão do manuscrito e, em especial, pelo apoio incondicional, pela partilha de conhecimento e experiência científica, pelos ensinamentos, pela amizade, confiança e pelo exemplo sólido de rigor e conhecimento.

À Professora Doutora Maria Elisa Serra, Professora Auxiliar da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, agradeço a dedicação que mostrou na realização deste trabalho, pelo empenho e incentivo na concretização dos objetivos propostos relativamente à síntese de novas moléculas passíveis de serem radiomarcadas e, deste modo, poderem ser consideradas como verdadeiros agentes detectores de hipoxia *in vivo*.

Constituindo a imagem de Medicina Nuclear uma imagem iminentemente funcional através da qual um radiofármaco possibilita a

avaliação e/ou caracterização de diferentes vias metabólicas, permanece a dúvida se, para um mesmo tipo de tumor com características biológicas distintas, o comportamento do radiofármaco permanece semelhante. Assim tornou-se imprescindível o conhecimento profundo das características metabólicas das diferentes linhas celulares de cancro colorrectal utilizadas neste trabalho. Desta forma agradeço ao Professor Doutor Rui Albuquerque de Carvalho, Professor Auxiliar da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, a partilha de conhecimento na área do metabolismo pois sem a sua análise crítica e rigor, parte deste trabalho não seria possível. Agradeço pela constante disponibilidade, pela sua amizade e paciência numa temática tão complexa.

À Professora Doutora Manuela Grazina, Professora Auxiliar de Bioquímica, da Faculdade de Medicina de Coimbra, agradeço pela contribuição inestimável, disponibilidade e empenho que colocou na sua colaboração. Agradeço a partilha de conhecimentos pois, mesmo em assuntos tão áridos, a sua facilidade de comunicação fez com que a transmissão fosse simplificada.

Embora, pela sua finalidade académica esta dissertação constitua o culminar de trabalho individual, foi necessário o contributo e a competência científica de uma equipa multidisciplinar que inclui várias áreas. Por essa razão muitas foram as pessoas que, das mais variadas formas inspiraram, colaboraram, apoiaram, ensinaram e contribuíram directa e indirectamente para este trabalho. Assim gostaria de expressar os meus sinceros e especiais agradecimentos a algumas delas.

À Mestre Mafalda Laranjo, pelo seu apoio, incentivo e disponibilidade permanentes, por partilhar responsabilidades profissionais, mesmo quando isso implicou um acréscimo de trabalho, sem nunca esmorecer o sorriso.

À Mestre Salomé Pires a minha gratidão por todo o empenho, dedicação e profissionalismo que sempre reiterou a sua ajuda ao longo dos últimos meses nas várias vertentes deste projecto.

Ao Mestre Ludgero Tavares pelo seu incentivo e conhecimento que partilhou na área da ressonância magnética nuclear e pela sua colaboração inestimável na investigação experimental.

Ao Mestre João Casalta Lopes, pela sua amizade e total disponibilidade para realização dos cálculos e análise estatística.

À Mestre Cândida Mendes e à Mestre Marta Simões pela disponibilidade constante, paciência e rectidão demonstradas na realização das experiências.

A todos os alunos de Doutoramento do Serviço de Biofísica, em especial à Ana Brito, Catarina Mamede, Fernando Mendes, Maria João Carvalho, Sara Ferreira e Siri Paulo; e a todos os alunos de mestrado e licenciatura que ao longo destes anos têm passado pelo serviço, exemplos de alegria e descontração no trabalho de alguma forma contribuíram para a concretização desta obra.

À Cláudia Caridade, secretária do Serviço de Biofísica, por todo o apoio e incentivo e disponibilidade incondicional que em tanto ultrapassou a sua obrigação.

À Professora Doutora Ana Bela Sarmento Ribeiro, Professora Auxiliar da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, e à Mestre Ana Cristina Gonçalves pela disponibilidade e empenho sempre demonstrados, nomeadamente no auxílio prestado nos estudos de citometria de fluxo e pela partilha de conhecimento na interpretação dos resultados.

À Fundação Calouste Gulbenkian (Projecto nº 96317 - “Hipoxia tumoral”), e ao Centro de Investigação em Meio Ambiente Genética e Oncobiologia (CIMAGO), que permitiram através dos financiamentos disponibilizados a obtenção de parte dos resultados apresentados neste trabalho.

À Covidien (EUA) pela disponibilização gratuita do Isolink™, muito importante na obtenção dos resultados da marcação radioactiva.

Aos meus amigos pela paciência e incentivo e sobretudo pela vossa amizade que tornou a realização deste projecto mais fácil.

Aos meus pais, à minha irmã Rosa, ao Emanuel pela inspiração, pela dedicação, pelo estímulo e pela sensatez com que sempre me ajudaram. Apesar dos momentos de que foram privados, o companheirismo e o encorajamento foram constantes possuindo um papel fundamental para a concretização deste projecto.



# ÍNDICE

Resumo .....	1
Abstract.....	3

## Parte I Contextualização Teórica

Capítulo I - Introdução .....	7
Capítulo II - Tumores Sólidos e Hipoxia .....	11
Carcinoma Colorrectal.....	14
Hipoxia.....	21
Efeito de Warburg.....	25
Adaptação Metabólica da Célula Tumoral à Hipoxia .....	30
Glicólise .....	31
Ciclo de Krebs.....	37
Glutaminólise .....	40
Proteína p53 .....	45
Factor de Transcrição Hypoxia-Inducible Factor.....	47
Capítulo III - Imagem Funcional nos Tumores Sólidos .....	51
Radiofármacos Utilizados para Imagem por Emissão de Positrões .....	58
Radiofármacos Utilizados para Imagem por Emissão de Fóton Simples .....	62

## Parte II – Trabalho Experimental

Capítulo IV - Cinética de Radiofármacos em Hipoxia .....	73
Introdução .....	75
Síntese e Marcação de Ligandos para Detecção de Hipoxia.....	76
Material e Métodos.....	76
Resultados .....	88
Discussão.....	89
Cinética de Radiofármacos em Hipoxia.....	91
Material e Métodos.....	91
Resultados .....	95
Discussão.....	105
Capítulo V - Hipoxia na Célula de Cancro do Cólon.....	111
Introdução .....	113
Material e Métodos.....	113
Resultados .....	121

Discussão.....	136
Capítulo VI – Metabonomica da Hipoxia .....	143
Introdução .....	147
Métodos e Material.....	147
Resultados .....	157
Discussão.....	169
<b>Parte III - Referências .....</b>	<b>183</b>
<b>Parte IV - Símbolos, Abreviaturas e Expressões .....</b>	<b>177</b>
<b>Parte V - Anexos .....</b>	<b>215</b>

## RESUMO

Os tumores são organizações morfo-funcionais que, em geral, apresentam grande multiplicação celular. A elevada taxa de proliferação e o crescimento celular são características inerentes ao desenvolvimento de um tumor e que condicionam a resposta da célula tumoral no que diz respeito à sua capacidade de aumentar o aporte de oxigénio e de nutrientes.

Como resultado local do rápido crescimento no tumor surgem regiões mal vascularizadas, que reflectem áreas de hipoxia. A hipoxia, desta forma, emerge contribuindo para uma elevada heterogeneidade vascular o que vai proporcionar uma maior agressividade dos tumores. Assim, esta condição de reduzida oxigenação nos tecidos possui um efeito considerável na resposta às terapêuticas, em especial à quimio e à radioterapia.

Neste trabalho é proposto o estudo do efeito da hipóxia em três linhas de cancro do cólon ao nível da viabilidade, actividade metabólica, alteração do ciclo celular, produção de espécies reactivas de oxigénio e expressão das proteínas p53 e HIF-2 $\alpha$ . Possuindo a hipoxia efeitos a diferentes níveis na célula constitui objecto de estudo o metabolismo das linhas celulares de cancro do cólon em condições de hipoxia e de normoxia utilizando espectroscopia de ressonância magnética. Complementar a estes estudos houve a necessidade de avaliar a captação de  $^{18}\text{F}$ -FDG em linhas celulares de cancro do cólon em condições de hipoxia e de normoxia. Na Medicina Nuclear a necessidade de desenvolvimento de novos traçadores radioactivos com capacidade de detecção de hipoxia tumoral é uma realidade. Assim este trabalho tem como objectivo o desenvolvimento de novos radiofármacos com objectivo de serem radiomarcados com Tecnécio-99m.

Para a concretização dos objectivos propostos foram utilizadas diferentes metodologias desde a síntese química de ligandos até à sua marcação utilizando o Tecnécio-99m. Para os restantes estudos foram utilizadas técnicas de biologia celular como a espectrofotometria, *western blot*, citometria de fluxo e espectroscopia de ressonância magnética.

Relativamente ao efeito da hipóxia na célula de cancro do cólon observou-se que possui efeitos de inibição da actividade metabólica e da síntese proteica. A viabilidade celular, em geral, não é afectada por esta condição, no entanto, relativamente ao ciclo celular, ocorrem alterações com a diminuição da pressão

parcial de oxigénio na célula tumoral. As proteínas p53 e HIF-2 $\alpha$ , também demonstraram sofrer alterações na sua expressão, sendo que as alterações, diminuição ou aumento de expressão de cada proteína se relacionam. O estudo da metabonómica revelou que o efeito de Warburg constitui uma realidade nas três linhas celulares de cancro do cólon utilizadas neste trabalho. A hipóxia impõe alterações no metabolismo havendo, no entanto, uma resposta distinta entre as três linhas ao nível da concentração dos diferentes metabolitos que podem ser medidos por espectroscopia de ressonância magnética utilizando [U-<sup>13</sup>C]glicose. A alteração de metabolismo como resultado da hipóxia é também comprovada pelos resultados obtidos na captação de <sup>18</sup>F-FDG, que revelaram alterações na sua captação. A síntese de novos compostos, um dos objectivos deste trabalho, permitiu obter três novos radiotraçadores com elevada eficiência de marcação. Dos três complexos obtidos o complexo **21** foi o que apresentou os melhores resultados no que diz respeito à captação celular, estando estes resultados relacionados com as suas características físico-químicas.

Assim, com este trabalho foi possível a síntese e marcação de um ligando com características favoráveis como traçador de hipóxia. Os resultados obtidos com as diferentes linhas celulares de cancro do cólon com o <sup>18</sup>F-FDG revelaram que, apesar de ser considerado um radiofármaco de eleição para a detecção e o estadiamento de diferentes tumores, este radiofármaco apresenta alterações na sua captação que estão relacionadas com a hipoxia, uma característica relevante dos tumores sólidos. Relativamente à resposta da célula do cancro do cólon, esta é distinta, tendo em conta o período de tempo em que as células estão expostas à redução de oxigénio no microambiente e os diferentes parâmetros como a actividade metabólica, a síntese proteica, a viabilidade celular, as espécies reactivas de oxigénio e o ciclo celular podem estar alterados. A alteração de expressão de diferentes proteínas também constitui uma resposta às alterações do microambiente, o qual, por sua vez parece condicionar as funções exercidas pela célula em resposta às próprias alterações do microambiente tumoral. Com a espectroscopia de Ressonância Magnética confirmou-se a existência do efeito de Warburg nas linhas celulares estudadas, ou seja, as células optam por um metabolismo glicolítico em detrimento do metabolismo oxidativo. A hipoxia provou possuir um efeito distinto nas três linhas celulares de cancro de cólon usadas ao nível do metabolismo estudado por Ressonância Magnética Nuclear.

## ABSTRACT

Tumors are morpho-functional organizations that generally have large cell multiplication. The high rate of cellular proliferation and growth are inherent characteristics in the development of a tumor, which may affect the response of the tumor cell with respect to its ability to increase the supply of oxygen and nutrients. As a result of the rapid growth of the tumor some regions may appear poorly vascularized, reflecting hypoxic areas. Thus, hypoxia emerges, contributing to a high vascular heterogeneity which will result in more aggressive tumors. The condition of reduced tissue oxygenation has a considerable effect on the response to treatment, particularly with chemotherapy and radiotherapy.

This work describes the study of the effect of hypoxia on three lines of colon cancer concerning cell viability, metabolic activity, cell cycle alterations, production of reactive oxygen species and expression of p53 and HIF-2 $\alpha$ . Considering that hypoxia has different effects on the cellular level, the study of the metabolism of the cell lines of colon cancer under conditions of hypoxia and normoxia using magnetic resonance spectroscopy is one of the main objectives of our studies. Complementary to these studies it was necessary to evaluate the uptake of  $^{18}\text{F}$ -FDG in colon cancer cell lines under hypoxic and normoxic conditions. There is great demand in Nuclear Medicine for the development of radiopharmaceuticals which have good characteristics as hypoxia tracers. Thus, another objective of this work was the development of new radiopharmaceuticals with the aim of being radiolabeled with technetium-99m.

To achieve the proposed objectives, different methodologies were used, from the synthesis of ligands to their labelling using technetium-99m. For the remaining studies cell biology techniques such as spectrophotometry, western blot, flow cytometry and magnetic resonance spectroscopy were used. Regarding the effect of hypoxia on the colon cancer cells it was observed that there is a strong inhibition of metabolic activity and protein synthesis. Cell viability, in general, is not affected by this condition; however, changes occur in the cell cycle with decreasing oxygen partial pressure in the tumor cell. The p53 and HIF-2 $\alpha$  also demonstrated changes in their expression, these changes, downregulation or overexpression of each protein, being related. The metabolomics study revealed that the Warburg effect is a reality in the three colon cell lines used in this study.

Hypoxia imposes changes on metabolism, however, a different response between the three lines concerning the concentration of different metabolites that can be measured by magnetic resonance spectroscopy using [U-<sup>13</sup>C] glucose, is observed. The change in metabolism as a result of hypoxia is also proven by the results obtained in the uptake of <sup>18</sup>F-FDG, which showed changes in its uptake. The synthesis of new compounds, one of the objectives of this work, yielded three new radiotracers with high labeling efficiency. Of the three complexes obtained complex 21 showed the best results with respect to cellular uptake, results that are related with its physicochemical features.

Thus, with this work was possible the synthesis and labeling a ligand with favorable characteristics as a tracer of hypoxia. The results obtained with different cell lines of colon cancer with <sup>18</sup>F-FDG have shown that, despite being considered one radionuclide of choice for the detection and staging of different tumors, the alterations of radiopharmaceutical uptake are related to hypoxia, an important feature of solid tumors. Regarding the response of colon cancer cell, this is different, taking into account the time period in which the cells are exposed to oxygen depletion in the microenvironment and the different parameters such as metabolic activity, protein synthesis, cell viability, reactive oxygen species and cell cycle can be changed. The change of expression of different proteins is also a response to microenvironment alterations. With magnetic resonance spectroscopy was confirmed the existence of the Warburg effect in the cell lines studied, so cells opt for a glycolytic metabolism at the expense of oxidative metabolism. Hypoxia proved to have a distinct effect on the metabolism of the three cell lines of colon cancer used.

**PARTE I**  
**CONTEXTUALIZAÇÃO TEÓRICA**



# CAPÍTULO I

## INTRODUÇÃO



Os tumores são organizações morfo-funcionais que, em geral, apresentam grande multiplicação celular. Tendo em conta esta elevada taxa de proliferação o crescimento celular é grande pelo que é necessário desenvolver capacidade de aumentar o aporte de oxigénio e de nutrientes. De facto, os tumores, durante o seu crescimento, desenvolvem estratégias nesse sentido, nomeadamente através da secreção de factores de crescimento do endotélio vascular, suficiente para o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos. Porém é importante que a neovascularização seja funcional de modo a que o fornecimento de oxigénio seja adequado. Claro que esta vascularização para além do fornecimento de oxigénio e de outros nutrientes ao tumor, o que permite o crescimento da massa tumoral, vai simultaneamente servir como via de saída de células tumorais, com a consequente disseminação à distância. Como resultado local do rápido crescimento da massa tumoral surgem regiões intratumorais mal vascularizadas, que se traduzem por áreas de hipoxia. Os tumores que tenham grande heterogeneidade vascular apresentam uma maior agressividade, já que esta condição possui um efeito considerável na resposta às terapêuticas, em especial à quimio e à radioterapia.

Tumores de tipos e estadios semelhantes podem diferir na fracção de células em situação de hipoxia. Assim, esta característica tumoral constitui uma condicionante que deve ser considerada. Desta forma surge a necessidade de um método que permita quantificar e/ou caracterizar a hipoxia tumoral, de modo a melhor adequar as estratégias de tratamento.

A avaliação dos métodos disponíveis para a quantificação da hipoxia na biologia tumoral necessita do conhecimento e compreensão das técnicas envolvidas. De facto, existem diversos aspectos que devem ser considerados na forma de avaliar quantitativamente a hipoxia tumoral, pressuposto que está na base deste trabalho.

Neste trabalho é proposto o desenvolvimento de novos traçadores radioactivos com capacidade de detecção de hipoxia tumoral *in vivo*, por métodos minimamente invasivos. Na verdade, a Medicina Nuclear, através da utilização de radiofármacos, é capaz de avaliar e/ou caracterizar vias metabólicas através de imagens funcionais obtidas após administração de radiotraçadores. Tendo em consideração esta particularidade da Medicina Nuclear, a hipoxia constitui uma característica que pode ser estudada recorrendo a esta técnica.

Esta dissertação está dividida em cinco partes, sendo que cada parte se encontra dividida em capítulos. A primeira parte, inclui três capítulos. O primeiro capítulo explica as motivações que conduziram à concretização deste trabalho,

uma vez que tendo em conta o conhecimento existente acerca do efeito das baixas pressões parciais de oxigénio na célula tumoral, a realização deste trabalho poderá constituir uma mais-valia no aprofundamento deste assunto.

No Capítulo II é feita uma revisão sumária de alguns conceitos que estão na base da adaptação da célula tumoral à hipoxia. Sendo esta condição uma característica dos tumores sólidos, neste trabalho foram utilizadas linhas celulares de cancro do cólon. Assim, neste capítulo serão abordadas, de forma sucinta, algumas características epidemiológicas acerca desta patologia, para além do tratamento utilizado.

No Capítulo III são abordados os diferentes radiofármacos marcados com emissores de positrões e com emissores de fotão simples já sintetizados e que são utilizados como meio complementar de diagnóstico ou para estadiamento de tumores ou para avaliar a hipoxia através de imagem funcional.

Na segunda parte desta dissertação está descrito o trabalho experimental. O trabalho experimental inclui o Capítulo IV - Imagem funcional e Hipoxia, o capítulo V - Hipoxia na Célula de Cancro do Cólon e o capítulo VI - Metabonómica da célula tumoral em Hipoxia. Cada um destes capítulos possui uma introdução onde se encontram descritos os fundamentos metodológicos, os métodos e os materiais utilizados para atingir os objectivos, a apresentação dos resultados e a discussão dos mesmos. Nesta discussão é feito um levantamento das possíveis explicações para os resultados, dos problemas levantados e das limitações dos próprios métodos utilizados. O capítulo VII apresenta as conclusões e perspectivas do trabalho.

A Parte III inclui a bibliografia consultada para a realização deste trabalho.

A Parte IV deste trabalho inclui uma lista de símbolos, abreviaturas e expressões utilizadas neste trabalho.

A Parte V inclui os anexos, documentos que fornecem informação adicional com importância na compreensão do trabalho desenvolvido.

## CAPÍTULO II

# TUMORES SÓLIDOS E HIPOXIA



O cancro, caracterizado por um crescimento e divisão celular descontrolados, não constitui somente um conjunto de células em proliferação, mas antes um tecido complexo composto por múltiplos tipos distintos de células que interagem entre si. Os tumores têm origem num processo que ocorre dia após dia, ano após ano, em várias etapas, a envolver progressivamente várias vias metabólicas. Este desenvolvimento parece ser caracterizado maioritariamente por uma “evolução somática”, que se traduz no desenvolvimento de novos fenótipos que são continuamente gerados, quer por alterações na expressão, quer na função de determinados genes. Estas alterações genéticas e epigenéticas são constituintes fundamentais no desenvolvimento das características específicas das lesões pré-malignas (Gatenby & Gillies, 2007).

Estes eventos intracelulares constituem somente uma componente da dinâmica *Darwiniana*. A dinâmica *Darwiniana* tem como base a teoria de Darwin em que o efeito de cada alteração fenotípica na dinâmica populacional é dependente da sua interação com determinadas forças de selecção impostas pelo ambiente. Assim, a perda ou manutenção de cada traço genético é dependente da sua contribuição para a constituição global do genoma o que, por sua vez, é dependente das forças de selecção presentes no microambiente da célula em questão (Gatenby & Gillies, 2007).

Durante os últimos anos considerou-se o cancro como uma consequência de seis alterações *major* na fisiologia celular, as quais ditariam a evolução da célula normal até à célula tumoral. As alterações dizem respeito à auto-suficiência relativamente aos factores de crescimento, à insensibilidade a factores inibitórios, à evasão à morte celular programada denominada por apoptose, à invasão de tecidos e metastização, ao potencial replicativo ilimitado e à angiogénese sustentada. Posteriormente, e a bibliografia recente complementa esta visão, considera que os tumores são mais do que massas insulares de células em proliferação, formando um sistema complexo com uma variedade de diferentes tipos celulares. Desta forma, células recrutadas pelo tumor para constituírem o seu estroma, vão transformar-se em participantes activos na tumorigénese, em vez de espectadores passivos. Estas células do estroma contribuem, assim, para o desenvolvimento e expressão de determinadas características próprias do cancro. Assim, e partindo deste pressuposto a biologia do cancro já não pode

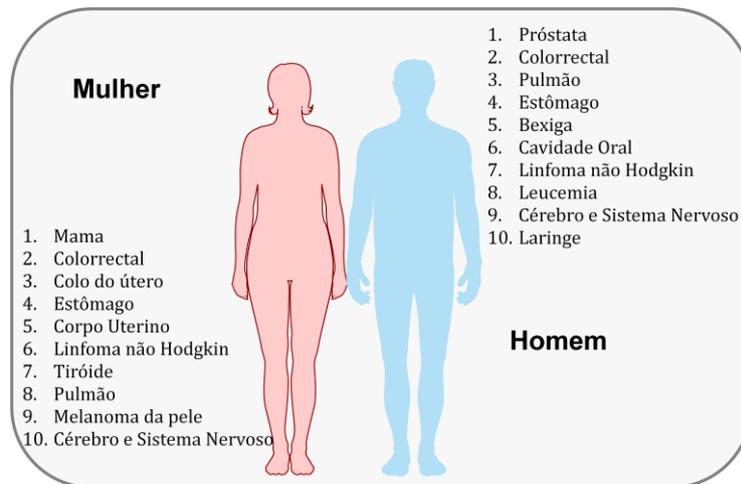
ser entendida simplesmente pela enumeração das características das células tumorais, mas deve englobar simultaneamente as contribuições do microambiente tumoral no processo da carcinogénese (Hanahan & Weinberg, 2000, 2011).

Assim, as seis características próprias do cancro inicialmente descritas, distintas mas complementares, que permitem ao tumor o seu crescimento e disseminação e que proporcionam uma base sólida para a compreensão da biologia do cancro, deram origem a mais características que devem ser consideradas, tais como: a capacidade que os tumores têm de modificar ou reprogramar o seu metabolismo com o objectivo de melhor suportar a proliferação tumoral e a capacidade de se evadirem à destruição imunológica. Para além destas características, também a instabilidade genómica e a consequente mutagenicidade associada permitem ao tumor alterações genéticas que facilitam a sua proliferação. O processo inflamatório associado pode ainda reforçar as restantes características até agora enumeradas, sendo que para além disso o sistema imunitário possui um papel importante no desenvolvimento/progressão de tumores (Hanahan & Weinberg, 2000, 2011).

### ***CARCINOMA COLORRECTAL***

O carcinoma colorrectal (CCR), de acordo com dados recentes de 2011, provenientes dos Estados Unidos da América, ocupa o terceiro lugar, em ambos os sexos, relativamente ao número de novos casos estimados, bem como relativamente ao número de mortes estimadas (Siegel et al., 2011; Siegel et al., 2012).

Em Portugal, de acordo com a Figura 1 é possível verificar que o CCR ocupa o segundo lugar da tabela da incidência dos tumores malignos mais frequentes no homem e na mulher (Ferlay, 2013).



**Figura 1** – Incidência dos tumores malignos por aparelhos, sistemas e órgãos, por sexo em Portugal.

Em Portugal a taxa de mortalidade por CCR tem aumentado desde a década de 80 do século passado. Estatísticas referem que em 2005, 14,6 % das mortes por cancro têm como causa o CCR, sendo que desde 1993 até 2005 a mortalidade por cancro aumentou para 15,8 %. Adicionalmente, este tipo de tumor constitui a segunda causa de morte entre todos os tipos de cancro, com uma taxa de 16,5 % no sexo masculino e de 14,6 % no sexo feminino, depois do cancro da próstata (21,6%) e do cancro da mama (30,4%) (Pinto *et al.*, 2010).

Este tumor é caracterizado por ser uma doença *multistep*, cujo desenvolvimento é influenciado por diversos factores ambientais (Arnold *et al.*, 2005). A dieta e o estilo de vida têm um forte impacto no risco do CCR. Populações que possuem uma dieta rica em gorduras, calorias, álcool e carne, mas pobre em cálcio e folato estão mais predispostas a este tipo de tumor. Além destes factores o tabaco constitui também um factor etiológico de relevo deste cancro (De la Chapelle, 2004).

O CCR pode surgir segundo duas formas: a forma esporádica e a forma hereditária ou familiar. A forma esporádica, não mostra qualquer predisposição familiar ou hereditária e constitui cerca de 70 % da incidência na população em geral. É comum em indivíduos com mais de 50 anos e, provavelmente, surge como consequência da idade e dos factores ambientais

(Calvert & Frucht, 2002). Segundo Fearon e Vogelstein (1990), esta forma de CCR pode resultar da activação mutacional de oncogenes, da inactivação de genes supressores tumorais, de mutações somáticas em pelo menos quatro ou cinco genes de uma célula e/ou da acumulação de múltiplas mutações genéticas que determinam o comportamento biológico do tumor (Fearon & Vogelstein, 1990; Calvert & Frucht, 2002).

Os genes implicados no CCR podem ser divididos em três categorias: genes supressores tumorais, proto-oncogenes e genes reparadores do ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês *Desoxyribonucleic acid*). As alterações descritas são sequenciais em genes chave reguladores do crescimento, tais como *adenomatous polyposis coli* (APC), *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog* (K-ras), TP53 e TP16, culminando com o desenvolvimento de um tumor maligno. Estas vias contribuem para o desenvolvimento de 85 % de tumores colorrectais que surgem a partir de pólipos adenomatosos pré-existentes. Quando os adenomas acumulam as combinações necessárias de mutações genéticas, de acordo com o modelo sugerido por etapas, o resultado final é o desenvolvimento do cancro (Fearon & Vogelstein, 1990; Agrawal, *et al.*, 2012).

Cerca de 10 % dos doentes possuem uma predisposição hereditária para o CCR. As síndromas hereditárias descritas incluem polipose adenomatosa familiar (FAP, do inglês *Familial Adenomatous Polyposis*) e as síndromas sem polipose predominante que incluem cancro colorrectal hereditário não polipóide (HNPCC, do inglês *Hereditary nonpolyposis colorectal cancer*) também designado como síndrome de Lynch I e o síndrome de Lynch II (que cursa com aumento de neoplasias do útero, mama e estômago). Cada uma destas síndromas resulta de mutações específicas ocorridas na linha germinativa. A FAP (responsável por cerca de 1% de todos os casos de CCR) está associada à mutação germinativa do gene APC no cromossoma 5q21.2,8,10. Caracteriza-se pelo desenvolvimento de múltiplos pólipos adenomatosos intestinais. O síndrome de Lynch resulta de mutações autossómicas dominantes do DNA (*mismatch repair genes* MSH2, MLH1, MSH6, PMS1, PMS2) e cerca de 90 % têm instabilidade de microssatélites (Calvert & Frucht, 2002).

O CCR familiar desenvolve-se demasiado frequentemente para ser considerado esporádico mas não de uma forma tão consistente que se adeque

a uma síndrome hereditária familiar comum. Mais de 25% dos casos de adenocarcinoma colorrectal identificam-se como pertencentes a esta categoria, estando associados na maioria das vezes, a uma mutação no gene APC localizado no cromossoma 5 (Calvert & Frucht, 2002). A genética é fundamental para o diagnóstico da predisposição para o CCR, assim como para a compreensão do seu desenvolvimento (De la Chapelle, 2004). Alguns estudos demonstram que numerosos erros que ocorrem nas vias que controlam a apoptose acontecem durante o desenvolvimento do CCR. Estas anomalias induzem mutações que tornam as células significativamente resistentes à morte por apoptose (Watson, 2006). Alguns autores demonstram que a taxa de apoptose na mucosa rectal se relaciona inversamente com a presença de adenomas, enquanto a resposta clínica destes ao tratamento com o inibidor da ciclooxigenase-2, o celecoxib, se correlaciona positivamente com a apoptose (Watson, 2006).

A patogénese do CCR é multifactorial e complexa. Para além das mutações genéticas que normalmente acompanham a alteração maligna, as vias epigenéticas possuem também um papel preponderante. O completo entendimento destas vias, que possuem definitivamente um papel preponderante no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, está ainda por alcançar (Harrison & Benziger, 2011). A alteração carcinogénica das células está associada à aquisição de autonomia de crescimento, ou seja possuindo insensibilidade a sinais inibitórios, passando a possuir um potencial replicativo praticamente ilimitado. Por outro lado, as células tumorais são capazes de produzir factores de crescimento, em especial o factor de crescimento endotelial, pelo que adquirem a capacidade de induzir a formação de novos vasos e, por conseguinte, de invasão e de metastização, escapando assim aos mecanismos naturais de controlo, os quais, em condições normais, conduziriam à morte da célula (Hanahan & Weinberg, 2000; Yu & Zhang, 2004). Assim, a total compreensão das alterações patogénicas dos mecanismos de morte celular programada e a sua relação com outros mecanismos moleculares é essencial para o desenvolvimento racional de estratégias de prevenção e de novas abordagens terapêuticas do CCR (Watson, 2006).

A abordagem terapêutica do CCR é baseada no estadiamento da doença e está, por isso, relacionado com a invasão da parede intestinal pelo

tumor, a existência de envolvimento de gânglios linfáticos regionais e a presença de metástases à distância. No caso do cancro colorrectal, para além do sistema TNM (acrónimo de *tumor, nodule and metastasis*, em inglês) (Anexo 1) também é frequente o estadiamento segundo a classificação de Dukes. As duas classificações encontram-se comparadas na Tabela 1.

O desenvolvimento deste carcinoma ocorre numa sequência de estadios, cuja caracterização se baseia no grau de invasão e/ou metastização que vão do estadio I, tumor confinado à parede do intestino, ao estadio IV, mestastização à distância (Watson, 2006).

**Tabela 1** - Tabela descritiva do estadiamento do cancro colorrectal segundo as classificações TNM, numérica e de Dukes.

Classificação			Descrição Anatómo-Patológica	Sobrevida aproximada aos 5 anos (%)
TNM	Numérico	Dukes		
T1N0M0	I	A	Limitado à mucosa e submucosa	>90
T2N0M0	II	B1	Até à muscular	85
T3N0M0	III	B2	Até ou através da serosa	70-80
TxN1M0	IV	C	Envolvimento de gânglios linfáticos regionais	35-65
TxNxM1	V	D	Metástases à distância (ex., fígado, pulmão)	5

(Adaptado de Harrison Internal Medicine, (Fauci *et al.*, 2008))

O CCR é normalmente tratado por cirurgia de ressecção se detectado em estadios precoces, e em associação com quimioterapia neo-adjuvante ou adjuvante se o diagnóstico ocorre em estadios mais tardios. Contudo no cancro do recto, em doentes estadiados como T3/ T4 ou N+, deverão realizar radioterapia pré-operatória.

Um estudo decorrido em Portugal aponta para que 71 % dos doentes com CCR são submetidos a quimioterapia, estando a prescrição do esquema de quimioterapia dependente do estadio da doença. Em situações de estadio I a quimioterapia não está preconizada como tratamento, no entanto em estadio II a combinação de 5-Fluoracilo (5-FU) com oxaliplatina (FOLFOX) é muitas vezes utilizada como terapêutica de primeira linha. Em estadios mais

avanzados (III/IV) a combinação de 5-fluoracilo com ácido folínico pode ser usado como terapia de segunda linha, sendo que o FOLFOX apresenta-se como associação de primeira linha. No entanto, em estadio IV outros esquemas terapêuticos podem ser adoptados como o 5-FU em combinação com o irinotecano ou oxaliplatina em combinação com a capecitabina para ambos os tratamentos de primeira e de segunda linha. Para além destas terapias também o bevacizumab, tratamento de primeira linha e o cetuximab em combinação com o irinotecan como associação de segunda linha são opções de tratamento do CCR (Pinto *et al.*, 2010).

Embora a cirurgia seja a modalidade de tratamento primária, a ressecção com intuito curativo não é possível em cerca de 25 % dos doentes e, mesmo quando é realizada ressecção radical, a recorrência intra-abdominal e à distância ocorre em mais de um terço dos casos (Aschele *et al.*, 2009). Assim, para erradicar possível doença micrometastática remanescente, a quimioterapia adjuvante apresenta-se vantajosa, permitindo reduzir o risco de recorrência (De Dosso, Sessa, & Saletti, 2009). De um modo geral, as estratégias quimioterapêuticas têm por objectivo induzir regressão tumoral ou parar a sua progressão (Kasibhatla & Tseng, 2003).

Desde 1957, o agente citostático 5-FU tornou-se disponível clinicamente, desempenhando um papel importante no tratamento de várias neoplasias, designadamente no CCR (Sugimoto *et al.*, 2009). A taxa de resposta no CCR é de 10-20 % após a administração única em bólus de 5-FU, aumentando para mais de 30 % pela associação do 5-FU modulado com o ácido folínico – vitamina leucovorina (LV) (Noordhuis *et al.*, 2004). Com vista a uma taxa de resposta superior, assim como maior sobrevida livre de doença, o actual paradigma terapêutico baseia-se na combinação do 5-FU/LV com o irinotecano e/ou com a oxaliplatina (FOLFOX, FOLFIRI ou FOLFIRINOX), o que aumentou a taxa de resposta para mais de 60 % (Noordhuis *et al.*, 2004; Hector & Prehn, 2009; Segal & Saltz, 2009).

Outro agente utilizado é a capecitabina, um pró-fármaco, administrado por via oral, que é convertido em 5-FU no tumor através da timidina fosforilase local. Este agente apresenta uma eficácia idêntica ao 5-FU combinado com a leucovorina (Segal & Saltz, 2009). A activação selectiva intra-tumoral parece melhorar a resposta terapêutica, tendo sido demonstrado que a capecitabina é uma alternativa efectiva ao 5-FU/LV na

terapêutica de primeira linha para as metástases de CCR. O regime XELOX é composto pela combinação de capecitabina e oxaliplatina (De Dosso *et al.*, 2009).

Para além dos regimes terapêuticos baseados na administração isolada de FOLFOX, FOLFIRI ou FOLFIRINOX, estes também podem ser combinados com anticorpos monoclonais, como o bevacizumab e o cetuximab, que são anticorpos dirigidos para o factor de crescimento do endotélio vascular e para o receptor do factor de crescimento epidérmico, respectivamente (Correale *et al.*, 2008).

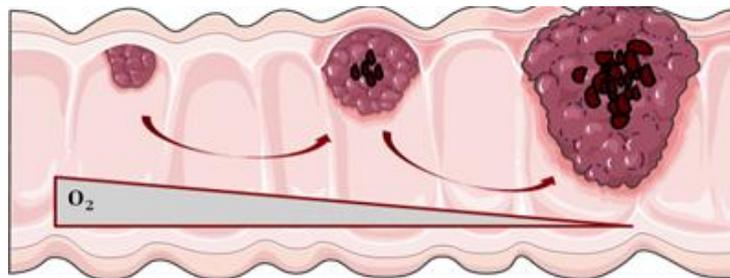
Apesar da constante preocupação no desenvolvimento de novos fármacos e na adequação de tratamentos isolados ou em combinação de diferentes modalidades, no cancro colorrectal, pelo facto de ser um tumor sólido, a hipoxia constitui uma característica constante e com repercussão no tratamento. Esta característica pode apresentar sérios problemas quando se equaciona a terapia com radiação, já que a radiosensibilidade é progressivamente limitada pela baixa pressão parcial de oxigénio presente no tecido tumoral. A resistência medicamentosa associada à terapia com radiação poder-se-á considerar multifactorial. Um dos factores importantes é a quantidade de oxigénio dentro da célula, já que esta molécula aumenta os danos causados no DNA através da formação de radicais livres e peróxido de hidrogénio, o que ocorre principalmente através da radiólise da água. Assim, por causa do efeito-oxigénio a dose de radiação necessária para atingir os mesmos efeitos biológicos é cerca de três vezes menor nos tecidos com níveis normais de oxigénio (Höckel & Vaupel, 2001; Vaupel & Harrison, 2004).

Para além disto, também a influência dos níveis de oxigénio intracelulares tem sido referida em relação aos agentes antineoplásicos como a ciclofosfamida, a carboplatina, doxorrubicina e 5-FU (Teicher *et al.*, 1981; Teicher *et al.*, 1990; Longley *et al.*, 2003; Yoshida *et al.*, 2009). É igualmente referido que na base da falha da acção destes fármacos, considerando a condição de hipoxia, estão envolvidos múltiplos mecanismos como a inibição da proliferação celular, a diminuição da produção de radicais livres, a diminuição dos danos ao DNA, a redução da citotoxicidade induzida pelos fármacos e a acidose tecidular que se verifica frequentemente em tumores em hipoxia com uma elevada taxa glicolítica (Harrison & Blackwell, 2004). Para além disso, a expressão de proteínas induzidas pelo stresse da hipoxia e

a perda de potencial apoptótico das células do tumor pode, em parte, aumentar a resistência dos tumores a inúmeros fármacos (Höckel & Vaupel, 2001).

## **HIPOXIA**

De acordo com Thomlinson e Gray (1955) nos tumores sólidos, durante a proliferação celular, as novas células formadas empurram as existentes para a periferia, expondo-as gradualmente a uma menor quantidade de nutrientes e oxigênio de acordo com o representado na figura 2 (Thomlinson & Gray, 1955).



**Figura 2** - Representação esquemática do crescimento tumoral e suas implicações na privação do oxigênio e nutrientes às células que constituem o tumor.

Para todos os organismos que precisam de oxigênio ( $O_2$ ), as alterações da sua pressão parcial representam um estímulo fisiológico importante. As pressões parciais intracelulares de oxigênio são mantidas num intervalo muito estreito de valores, no sentido de minimizar quer o risco de dano oxidativo por excesso de oxigênio (hiperoxia), quer o risco de falência metabólica por insuficiência de oxigênio (hipoxia) (Semenza *et al.*, 2001). Contudo, algumas alterações na pressão parcial de oxigênio ( $pO_2$ ) nos tecidos são compatíveis com a vida, como as que são observadas durante um exercício exagerado ou na exposição a altas altitudes (Hägg & Wennström, 2005).

A hipoxia define-se por uma reduzida  $pO_2$  e é uma característica de várias condições patofisiológicas como o enfarte do miocárdio, a doença vascular isquémica, o acidente vascular cerebral ou a insuficiência respiratória. Idêntica situação pode surgir em situações de crescimento acelerado dos tumores malignos e das respectivas metástases. Assim, no cancro, a hipoxia ocorre precocemente durante o desenvolvimento do tumor, ou seja mesmo quando tem dimensões na ordem de poucos milímetros, devido ao compromisso do aporte sanguíneo (Imahashi *et al.*, 2000; Kunz & Ibrahim, 2003; Papandreou *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2007). Mesmo após o aparecimento de neovasos o fornecimento de oxigénio diminui considerando as necessidades do tumor. Desta forma a hipoxia constitui uma característica constante e condicionante nos tumores sólidos.

A hipoxia tecidual resulta de um fornecimento inadequado de oxigénio capaz de comprometer as funções biológicas. O termo anoxia descreve o estado onde não é detectada qualquer pressão parcial de oxigénio nos tecidos (Höckel & Vaupel, 2001). Em termos bioquímicos a hipoxia é definida como um reduzido transporte de electrões limitado pelo  $O_2$ ; já a fisiologia e a clínica definem a hipoxia como um estado de reduzida disponibilidade de oxigénio ou diminuição das pressões parciais abaixo dos limites críticos, resultando, desta forma, um deficiente ou até mesmo ausente fornecimento deste gás aos órgãos, tecidos e células (Papandreou *et al.*, 2005).

O oxigénio é transportado no sangue pela hemoglobina, sendo a afinidade desta para o  $O_2$  influenciada por diversas variáveis fisiológicas. Destaca-se o aumento da pressão parcial de dióxido de carbono ( $pCO_2$ ) no sangue, diminuição do pH intracelular denominada de acidose metabólica, aumento da temperatura e aumento da concentração dos fosfatos orgânicos, nomeadamente o 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG, do inglês *2,3-Diphosphoglycerate*). Este ácido é um metabolito da glicose, na via glicolítica que compete com o oxigénio nos locais de ligação na hemoglobina o que, por sua vez, conduz a uma diminuição da afinidade da hemoglobina para o oxigénio, ao mesmo tempo que facilita a entrega deste gás aos tecidos (Shannon *et al.*, 2003).

A hipoxia pode ser causada por diversos factores, entre eles a reduzida pressão parcial de  $O_2$  no sangue arterial; a reduzida capacidade do sangue para transportar o oxigénio (como resultado de anemia, formação de

metahemoglobina ou envenenamento por monóxido de carbono); a redução perfusão, local ou generalizada, dos tecidos; e a deterioração da geometria de difusão. Estes factores estão, assim, relacionados com a perfusão, difusão de oxigénio e anemia, sendo possível distinguir quatro tipos de hipoxia: a hipoxia aguda, a hipoxia crónica, a hipoxia anémica e a hipoxia tóxica (Vaupel & Harrison, 2004).

A hipoxia aguda está relacionada com a perfusão e é causada pelo inadequado fluxo sanguíneo nos tecidos. A microcirculação tumoral é uma circulação de desenvolvimento anárquico, que frequentemente possui anomalias estruturais e funcionais, como desorganização da rede vascular, estases intermitentes, alterações nos vasos provocadas por alterações morfológicas como dilatações, formas alongadas e tortuosas dos mesmos, contornos difusos dos tumores, falta de receptores membranares e intracelulares fisiológicos e ausência na regulação do fluxo. Assim, este tipo de hipoxia pode desenvolver-se como resultado de espasmos dos vasos sanguíneos tumorais aberrantes ou por compressão dos mesmos, causada pelo aumento da pressão do fluido intersticial (Ballinger, 2001).

A hipoxia crónica é causada por um aumento nas distâncias de difusão, resultantes da expansão tumoral. Deste modo, o fornecimento de oxigénio às células tumorais mais afastadas dos vasos sanguíneos, que transportam os nutrientes, torna-se inadequado. Este tipo de hipoxia relacionado com a difusão, pode ter como causa a deterioração da geometria de difusão na rede da microcirculação tumoral (Vaupel & Harrison, 2004). Desta forma, a hipoxia crónica desenvolve-se à medida que o tumor aumenta em volume, de tal modo que o aporte sanguíneo deixa de permitir o adequado fornecimento de oxigénio a toda a massa tumoral. O oxigénio é consumido à medida que se difunde na massa tumoral e, por isso, é gerado um pequeno gradiente de pressão parcial de oxigénio a grandes distâncias dos vasos (Ballinger, 2001).

A hipoxia anémica é causada pela reduzida capacidade de transporte de oxigénio pelo sangue, subsequente à anemia associada ao tumor. Estudos experimentais demonstraram que quando a concentração de hemoglobina é inferior a 10-12 g/dL, o aporte de oxigénio está reduzido e a hipoxia aumentada. Isto é especialmente verdade quando a baixa capacidade de transporte de oxigénio coincide com baixa taxa de perfusão (Vaupel & Harrison, 2004). Alguns estudos pré-clínicos com animais demonstraram que

para além da anemia se correlacionar com a hipoxia, a correcção da anemia condiciona a melhoria da oxigenação tumoral (Vaupel, *et al.*, 2006). Condições semelhantes à hipoxia anémica podem ser causadas pela formação de carbo-hemoglobina nos fumadores crónicos, uma vez que a hemoglobina bloqueada pelo monóxido de carbono não pode transportar o oxigénio, o que resulta noutro tipo de hipoxia, a hipoxia tóxica. Adicionalmente, a microcirculação tumoral pode ser perfundida, pelo menos transitoriamente, somente por plasma, o que conduz a uma rápida indução da hipoxia, visto que nestas condições somente uma pequena quantidade de células, na zona terminal arterial, é oxigenada (Vaupel & Harrison, 2004).

Devido ao controlo apertado dos processos de regulação, os aumentos no consumo de oxigénio tecidual que estão frequentemente relacionados com um aumento do fluxo sanguíneo, não conduzem frequentemente à hipoxia, a menos que o sistema que regula o fluxo sanguíneo falhe perante a necessidade de oxigénio aumentada por parte dos tecidos em questão (Ballinger, 2001).

Esta condição de diminuída oxigenação possui um forte impacto a nível da biologia da célula tumoral. Em particular, a baixa concentração de oxigénio dos tecidos tumorais contribui para a progressão do tumor, o que faz a resposta da célula tumoral à hipoxia ser de extrema importância para a compreensão da progressão tumoral (Kunz & Ibrahim, 2003; Lee *et al.*, 2007). Na célula tumoral, a diminuição da concentração de oxigénio pode provocar paragem do ciclo celular, apoptose, diminuição do metabolismo anaeróbio, alterações nos contactos intercelulares, alteração na remodelação dos tecidos, alterações na eventual adaptação ao stresse, angiogénese tumoral, diferenciação celular e necrose (Papandreou *et al.*, 2005). Adicionalmente, a hipoxia pode induzir alterações proteómicas que permitem que as células tumorais se adaptem facilmente e sejam capazes de superar a privação de oxigénio e de nutrientes, sobrevivendo e escapando ao ambiente local hostil. Esta adaptação é acompanhada de angiogénese, aumento da glicólise, inibição de apoptose e sobre-regulação de factores de crescimento (Vaupel, 2004). A hipoxia representa assim, uma importante condição que promove a heterogeneidade das células tumorais e o desenvolvimento não só do estroma de suporte como também o desenvolvimento vascular dos tumores sólidos (Axelson *et al.*, 2005). Nas

células em hipoxia o fenótipo é drasticamente alterado e algumas evidências indicam que estas alterações contribuem significativamente para uma selecção clonal durante o crescimento tumoral (Axelson *et al.*, 2005). No entanto, estas mudanças de fenótipo, inicialmente, não têm uma causa genética. Tem sido demonstrado que a hipoxia provoca instabilidade genética preferencialmente por afetar a expressão de genes envolvidos nos mecanismos de reparação de DNA, mas também como consequência do aumento da produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*). Assim, a hipoxia pode afectar as células tumorais genética e epigeneticamente, contribuindo para a heterogeneidade do tumor e padrões de crescimento agressivos. Ao contrário das células normais, as células tumorais superam a dependência de factores de crescimento através da aquisição de alterações genéticas que modificam funcionalmente as vias de sinalização dependentes de receptores, influenciando e/ou permitindo a entrada e o metabolismo de nutrientes que promovem a sobrevivência celular e sustentam e/ou estimulam o crescimento celular (Axelson *et al.*, 2005; Vander Heiden *et al.*, 2009).

### ***EFEITO DE WARBURG***

As células tumorais, com o objectivo de proliferar, devem cumprir com a necessidade de energia imposta pelos processos vitais, entre eles a biossíntese de macromoléculas, a replicação do DNA e a manutenção de gradientes de concentração de iões. Em 1925, Warburg descreveu que fragmentos de tumores cultivados não só tinham uma maior taxa de produção de lactato que as células normais, mas também eram capazes de existir durante um certo período de tempo baseando exclusivamente a obtenção de energia, para a sobrevivência, na fermentação (Warburg, 1925). Para além disso, as massas tumorais mostravam um aporte de sangue insuficiente em glicose e oxigénio, sendo no entanto, a percentagem de glicose consumida mais elevada do que nos tecidos normais (Warburg, 1925; Warburg *et al.*, 1927). Este biólogo alemão, premiado com o Nobel de Fisiologia/Medicina em 1931, mudou a compreensão do metabolismo

energético tumoral, demonstrando que as células tumorais produzem lactato através da fermentação láctica mesmo na presença de condições aeróbicas, tendo o conceito ficado firmado com o seu nome - Efeito de Warburg (Busk *et al.*, 2008). Este conceito tem sido explorado clinicamente através da utilização do radiofármaco  $^{18}\text{F}$ -Fluordesoxiglicose ( $^{18}\text{F}$ -FDG) para a realização de estudos imagiológicos funcionais em situações tumorais, constituindo actualmente uma das características metabólicas mais importantes que caracterizam os tumores (Hsu & Sabatini, 2008).

Desde a formação inicial do tumor que este se expande e supera em crescimento os limites de difusão de oxigénio e nutrientes a partir dos vasos sanguíneos. Uma das características mais importantes que distingue as células normais das células tumorais é o seu metabolismo intermediário. Estas características bioenergéticas e metabólicas não permitem somente que as células tumorais sobrevivam em condições adversas, como é exemplo a hipoxia, como também permitem a sua proliferação, progressão, invasão e subsequente metastização. Por oposição às células normais, a transformação maligna preconiza um aumento da captação de glicose e está simultaneamente associada a uma elevada taxa de glicólise. Para além disso, o desenvolvimento de tumores é caracterizado por uma diminuída oxidação do piruvato, com concomitante produção elevada de ácido láctico. Para além disto, nas células tumorais também se pode verificar um aumento da gluconeogénese, aumento da glutaminólise, redução da oxidação de ácidos gordos, aumento da síntese *de novo* de ácidos gordos, aumento do *turnover* do glicerol, modificação do metabolismo dos aminoácidos e aumento da actividade da via das pentoses-fosfato.

A ideia pré-concebida de que células tumorais em crescimento necessitam de mais energia que as células normais, torna irónico constatar que, em contraste com as células normais, as células tumorais retornam à via metabólica mais primitiva, a glicólise, para gerar as quantidades necessárias de energia. Uma possível razão para esta alteração bioenergética poderá ser a necessidade de metabolitos intermediários para suportar o crescimento e a proliferação acelerados, em condições de diminuída pressão parcial de oxigénio, e a possível adaptação para evitar a morte em ambientes tóxicos ou devido aos efeitos dos fármacos citotóxicos (Nakajima & Van Houten, 2012).

Warburg foi capaz de conceber a hipótese de que a transformação neoplásica maligna tem como origem uma consequência dos danos irreversíveis na respiração mitocondrial. As características cruciais desta teoria são o consumo de glicose aumentado e a redução da fosforilação oxidativa, acompanhadas da produção de lactato (Hsu & Sabatini, 2008). Assim, as células tumorais são obrigadas a recorrer ao modo primitivo da síntese de adenosina trifosfato (ATP, do inglês *adenosine triphosphate*), a glicólise, em vez da respiração celular que produz substancialmente mais ATP por molécula de glicose. Assim, mais de 50% da energia da célula tumoral é gerada no citosol através da glicólise, sendo que a restante parte é produzida na fosforilação oxidativa. Esta dependência energética glicolítica por parte das células tumorais não é só devida à falta de oxigênio, já que esta característica bioenergética é uma constante, mesmo na presença de uma oxigenação adequada. A reduzida produção energética da glicólise implica que as células tumorais têm de adoptar um mecanismo de aumento da captação de glicose de forma a atender às necessidades energéticas celulares (Nakajima & Van Houten, 2012).

Parece pois que a glicólise aeróbia é um mecanismo adaptativo que envolve diversas vias metabólicas coordenadas, que mantêm as características fenotípicas das células tumorais, entre as quais a capacidade de sobreviver em condições de hipoxia, a capacidade de metastização e a evasão à morte por apoptose. Assim, é possível constatar que existem diversos factores, nomeadamente a alteração da expressão de diferentes proteínas e/ou genes, que influenciam todas estas alterações características do efeito de Warburg (Mathupala *et al.*, 2006; Matoba *et al.*, 2006; Kondoh *et al.*, 2007; Moro *et al.*, 2009).

O aumento da expressão da enzima hexocinase cuja função consiste na conversão da glicose em glicose-6-fosfato constitui uma das alterações das células tumorais. Para além disso, o factor de transcrição induzido pela hipoxia (HIF, do inglês *Hypoxia-inducible factor*) que se encontra estabilizado em condições de normoxia, em condições de hipoxia constitui um factor que aumenta a expressão de transportadores de glicose, para além de induzir a expressão de grande parte das enzimas glicolíticas. Este factor de transcrição em situação de hipoxia, condição característica dos tumores sólidos, fornece múltiplas soluções para o stresse característico das células tumorais. Assim,

como a reduzida dependência da respiração aeróbica constitui uma vantagem, o metabolismo de célula é deslocado para a glicólise através da expressão aumentada de enzimas glicolíticas, transportadores de glicose, e inibidores do metabolismo mitocondrial. Desta forma, as expressões de enzimas como a lactato desidrogenase (LDH, do inglês *Lactate dehydrogenase*) e transportadores do monocarboxilato 4 (MCT4, do inglês *monocarboxylate transporter-4*) são induzidas, com simultânea inibição de enzimas como a piruvato desidrogenase (PDH, do inglês *pyruvate dehydrogenase multienzyme complex*) através da activação da PDK1. Genes reguladores como o *v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog* (MYC) induzem a expressão de enzimas que possuem implicação na glicólise como a hexocinase II, a enolase, a LDH e a fosfofrutocinase contribuindo assim para o efeito de Warburg (Billin *et al.*, 2000; Osthus *et al.*, 2000; Sansome *et al.*, 2001; Sheta *et al.*, 2001; Mathupala *et al.*, 2006).

O gene que codifica a proteína p53 com características de proteína supressora tumoral nos tumores, altera a expressão das proteínas *TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator* (TIGAR) e *cytochrome c oxidase assembly protein* (SCO2). Relacionado com a via de sinalização de oncogenes a *phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K) e a *serine/threonine protein kinase Akt* (AKT) são proteínas que estão ativadas em células tumorais por diversos mecanismos incluindo as mutações do *phosphatase and tensin homolog* (PTEN) o que aumenta a atividade da hexocinase II e a expressão e armazenamento de transportadores de glicose (Bensaad *et al.*, 2006; Matoba *et al.*, 2006; Nakajima & Van Houten, 2012).

Além destas proteínas, a molécula sinalizadora *resistance to audiogenic seizures* (ras), um oncogene, que quando mutado promove a glicólise, é responsável pelo aumento de captação e utilização de glicose pela célula tumoral. Por outro lado esta molécula possui simultaneamente efeitos no factor de transcrição Myc, que por sua vez influencia a sobreexpressão de vários genes do metabolismo que podem interferir na glicólise, ou até mesmo no metabolismo dos aminoácidos e nucleótidos (Jones & Thompson, 2009).

No entanto, todas estas alterações descritas como resultado do efeito de Warburg que se verificam na célula tumoral, podem ser dependentes do contexto, em muito casos influenciadas pelas alterações genéticas e/ou pelo microambiente. Assim, e não obstante a totalidade dos mecanismos

envolvidos, é notável que todas as alterações resultantes confirmam um fenótipo com características vantajosas relativamente à proliferação e sobrevivência das células tumorais (Hsu & Sabatini, 2008).

O tecido tumoral é altamente heterogêneo e tendo em conta esta caracterização, tem vindo a ser discutido se o perfil metabólico das células tumorais é uma consequência funcional da heterogeneidade espacial da disponibilidade de oxigénio e nutrientes. Assim, as células do tumor mais oxigenadas adoptam o metabolismo oxidativo, em contraste com as células tumorais que estão mais distantes da rede vascular que seriam por isso mais glicolíticas. Um modelo alternativo enuncia que pode existir no parênquima tumoral uma relação metabólica de simbiose entre as células tumorais e entre as células normais. Exemplo desta relação de simbiose verifica-se no transporte do lactato que é produzido pelas células em hipoxia que é excretado e entregue às células do tumor adjacentes (Bensinger & Christofk, 2012). A absorção de lactato é mediada pelo transportador monocarboxilato 1 (MCT1, do inglês *monocarboxylate transporter -1*), que é subsequentemente conduzido para a fosforilação oxidativa através da conversão em piruvato pela enzima lactato desidrogenase B (LDHB, do inglês *Lactate dehidrogenase B*). Estes dados demonstram que os subprodutos de uma célula podem servir como uma fonte de carbono para o anabolismo e catabolismo energético das células tumorais vizinhas (Bensinger & Christofk, 2012). Resultados de outras experiências demonstraram que no microambiente de tumores epiteliais, os fibroblastos associados adquirem um programa metabólico único que inclui muitos elementos do fenótipo metabólico das células tumorais incluindo o efeito de Warburg (Martinez-Outschoorn *et al.*, 2010; Pavlides *et al.*, 2009). Neste modelo, as células tumorais são capazes de induzir stresse metabólico ou oxidativo nas células vizinhas resultando na aquisição de um fenótipo glicolítico. Como consequência, os fibroblastos que rodeiam o tumor são capazes de fornecer nutrientes (lactato ou piruvato) para as células tumorais, que direccionam o anabolismo para o crescimento celular (Bensinger & Christofk, 2012). Para além destes factos, estudos recentes sobre a doença metastática revelaram que as células tumorais das metástases recebem apoio energético dos adipócitos vizinhos através da transferência de ácidos gordos dos adipócitos normais para as células

tumorais, mediada pela proteína do adipócito 2 (AP2, do inglês *adipocyte protein 2*) (Bensinger & Christofk, 2012).

Assim, os programas catabólicos das células normais do interior do parênquima tumoral podem desempenhar um papel central no apoio ao programa anabólico do cancro. De fato, estudos recentes indicam que apesar dos tumores apresentarem robustos programas anabólicos, a adição de capacidade lipolítica aumenta de forma significativa a tumorigénese. Embora especulativo, a relação simbiótica entre células normais e células tumorais poderia ajudar a explicar a caquexia observada em indivíduos com cancro por condução de um programa catabólico generalizado (Bensinger & Christofk, 2012).

### ***ADAPTAÇÃO METABÓLICA DA CÉLULA TUMORAL À HIPOXIA***

Os tumores sólidos possuem populações heterogéneas de células devido, em parte, a um fornecimento de sangue limitado que proporciona concentrações de oxigénio diminuídas, condições ácidas e de avidez de glicose (Williams *et al.*, 2002). Estas alterações no microambiente tumoral representam sinais fisiológicos que podem activar a sobrevivência ou a morte celular por apoptose, ou seja, o equilíbrio entre o crescimento e a supressão tumoral. Embora os mecanismos através dos quais as células tumorais se adaptam ou morrem, na presença de níveis baixos de oxigénio, não estejam tão bem estudados como os factores de stresse celulares ou os danos no DNA ou até o choque térmico, sabe-se que a expressão de diversos factores de transcrição assim como a alteração das vias metabólicas interferem na resposta à falta de oxigénio pelas células tumorais (Achison & Hupp, 2003).

## Glicólise

O metabolismo, termo que deriva de uma palavra grega que quer dizer “troca de materiais”, da célula tumoral tem vindo a ser alvo de um interesse renovado não só pela função dos oncogenes e proto-oncogenes, considerados árbitros bioenergéticos, no crescimento e agressividade tumoral, mas também porque pode contribuir para a constituição de novos alvos terapêuticos (Dang, 2012; Ferreira, Hebrant *et al.*, 2012). Os tumores constituem entidades metabólicas que utilizam nutrientes da corrente sanguínea, consumindo-os através das vias bioquímicas e secretando os produtos que posteriormente se tornam substratos metabólicos em outras vias (DeBerardinis & Cheng, 2010).

Assim, existem muitas ocasiões em que a rápida e regulada divisão celular é necessária, como é exemplo o desenvolvimento embrionário, a cicatrização ou a resposta imunitária a antígenos específicos na qual a selecção clonal fornece um maior número de células com especificidade imunológica aumentada. As células tumorais partilham a maioria destes requisitos em termos energéticos, com utilização de substratos, como é exemplo a glicose, para o crescimento, divisão e controlo do potencial redox e das ROS na célula (Levine & Puzio-Kuter, 2010). O que todos estes processos têm em comum é que necessitam de sintetizar substratos para as membranas, ácidos nucleicos e proteínas, com o objectivo de aumentar a massa, o que significa não metabolizar toda a glicose até ao dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e água (H<sub>2</sub>O) mas, pelo contrário, fornecer os próprios intermediários para o crescimento celular (Levine & Puzio-Kuter, 2010).

As células dependem, na maioria, do metabolismo oxidativo para a obtenção de energia necessária para as suas funções e crescimento, convertendo a glicose em CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O (Stubbs & Griffiths, 2010). Darwin afirmava que toda a complexidade natural biológica surge por variação aleatória e selecção natural. O cancro parece crescer em conformidade com a teoria de Darwin. A "variação" que acontece nas células tumorais parece aleatória e estas células são com certeza "naturalmente seleccionadas", no sentido redundante que as células em divisão eventualmente superam as que não se encontram em divisão. No entanto, o inverso é também possível e pode até ter mais interesse na aplicação a esta patologia. A aplicação dos

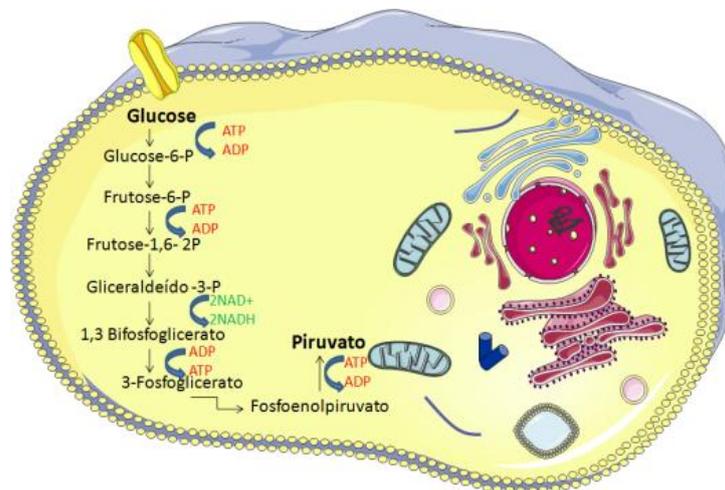
princípios de Darwin à evolução do fenótipo glicolítico sobre-regulado rendeu novas contribuições ao papel que possui na biologia tumoral (Gatenby & Gillies, 2007; Hanahan & Weinberg, 2011).

De acordo com Warburg as células tumorais consomem, de forma consistente, mais glicose e produzem mais ácido láctico comparativamente com as células normais. Enquanto parte desta alteração é uma adaptação à hipoxia intratumoral, tendo em conta a desorganizada angiogénese e fluxo sanguíneo, grande parte demonstra ser devido à glicólise aeróbia, ou seja, o uso contínuo da via metabólica glicolítica mesmo na presença adequada de oxigénio. Assim, verifica-se que as células tumorais captam mais glicose do que aquela que necessitam, de uma fonte tida como infinita, excretando de seguida lactato (Gatenby & Gillies, 2007; Stubbs & Griffiths, 2010).

O metabolismo celular descreve um conjunto de reacções químicas que convertem os nutrientes e as moléculas endógenas em energia e matéria (proteínas, ácidos nucleicos e lípidos) que sustentam a vida. O ATP, a principal molécula que está na base de todos os processos que envolvem energia na célula, é gerado através de duas vias principais, a glicólise e a fosforilação oxidativa. A glicólise constitui um conjunto de reacções de catabolismo que ocorre no citoplasma com o objectivo de obtenção de ATP e pode ser dividida em duas fases essenciais: a fase preparatória e a fase de retorno energético. A primeira fase é constituída por um conjunto de reacções endergónicas sendo que a glicose começa por ser fosforilada (no C6) originando-se a D-frutose-6-fosfato, seguida de isomerização a 6-fosfato de D-glicose que posteriormente é fosforilada (no C1) e dá origem 1,6-bifosfato de frutose. Este composto é posteriormente clivado dando origem a duas moléculas de três carbonos, denominadas de gliceraldeído-3-fosfato e a fosfato de di-hidroxiacetona que posteriormente são isomerizados. No conjunto de reacções descritas ocorre um gasto de duas moléculas de ATP, tal como representado na figura 3.

Seguidamente, na fase de retorno energético, cada molécula de 3-fosfato de gliceraldeído é oxidada e fosforilada pela incorporação de um fosfato inorgânico originando uma molécula de 1,3-bifosfoglicerato e duas moléculas de NADH (do inglês, *nicotinamide adenine dinucleotide reduced form*) e respectivos protões. A reacção seguinte consiste na produção da primeira molécula de ATP através da transferência de um grupo fosfato para a

molécula de adenosina difosfato (ADP, do inglês *adenosine diphosphate*), formando 3-fosfoglicerato. Existindo duas moléculas de 1,3-bifosfoglicerato ocorre a formação de duas moléculas de ATP. Posteriormente a molécula formada sofre isomerização dando origem à molécula 2-fosfoglicerato que posteriormente sofre desidratação dando origem ao fosfoenolpiruvato. Finalmente, o fosfoenolpiruvato transforma-se em piruvato transferindo o seu grupo fosfato para uma molécula de ADP. Desta forma, no final da fase de retorno energético geram-se 4 moléculas ATP, duas moléculas de NADH e dois prótons e duas moléculas de piruvato, tal como representado na figura 3 (Quintas *et al.*, 2008).



**Figura 3** – Esquema representativo das reacções que ocorrem na glicólise. Esta via divide-se em duas fases: a fase preparatória e a fase de retorno energético.

Quando os níveis de oxigénio são bastantes baixos, este conjunto de reacções inicia-se pela entrada de glicose através de transportadores na parede da célula ocorrendo posteriormente a fosforilação. A hexose fosfato é posteriormente fosforilada e dividida em moléculas de três carbonos que são convertidas em glicerol para a síntese de lípidos ou, sequencialmente, transformada em piruvato que é convertido posteriormente em lactato (Dang, 2012). Se a quantidade de oxigénio é normal o processo de fosforilação oxidativa ocorre sendo o piruvato direccionado para o ciclo de Krebs. No metabolismo tumoral, as células adquirem uma “postura de

desperdício” em comparação com as células normais, ou seja, as células tumorais utilizam uma troca desproporcionada de nutrientes com seu ambiente. Este “desperdício” é justificado parcialmente pelo facto das células tumorais metabolizarem glicose através da glicólise aeróbica, ou seja evitam a fosforilação oxidativa mesmo quando o oxigénio é abundante (Chi V Dang, 2012).

De acordo com as diferentes características biológicas da transformação maligna, a reprogramação da actividade metabólica é necessária para suportar o crescimento celular desregulado. O trabalho desenvolvido por Warburg em 1929 descreve que a alta taxa glicolítica que caracteriza o cancro (efeito de Warburg), constatação sustentada pelo facto da mitocôndria ter respiração comprometida, é compensada por uma contribuição anormalmente elevada da glicólise aeróbia para o *turnover* completo do ATP (Cheng *et al.*, 2011). Warburg explicou esta observação com a hipótese que a glicólise aeróbica seria uma manifestação de uma deficiência na respiração. No entanto, estudos mais aprofundados acerca do assunto claramente demonstraram que este facto não era verdadeiro (R. A. Gatenby & Gillies, 2007). De fato, a falha na hipótese de Warburg poderia ser rapidamente deduzida através da teoria de evolução, isto porque um fenótipo com “deficiência respiratória” teria associado uma diminuição do desempenho. A dinâmica de Darwin poderia resultar numa pressão de selecção negativa e extinção em vez do crescimento da população. À primeira vista a contribuição positiva da glicólise aeróbica para as células tumorais é decididamente obscura. A produção de energia, quase exclusivamente através da glicólise, aumenta a produção de lactato resultando numa acidificação extracelular do ambiente. Tudo isto pode ter como consequência uma toxicidade local incluindo morte celular e degradação da matriz extracelular causada pela libertação de enzimas proteolíticas (Gatenby & Gillies, 2007; Feron, 2009; Levine & Puzio-Kuter, 2010). No entanto, a ineficiente produção de ATP constitui um problema somente quando os recursos são escassos, o que não acontece com as células tumorais, já que estas se abastecem de forma contínua de glicose e de outros nutrientes a partir da corrente sanguínea. Esta capacidade está muitas vezes associada à expressão de proteínas pró-angiogénicas, o que favorece o crescimento e proliferação tumoral (Vander Heiden *et al.*, 2009).

As vias metabólicas e a sua regulação têm vindo a ser estudadas evidenciando que o ATP nunca poderá ser um factor limitante nestas células. As células que promovem a glicólise aeróbica exibem simultaneamente elevadas taxas de produção de ATP e de NADPH (do inglês, *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form*). Para além disto, mesmo pequenas perturbações na razão ADP/ATP podem prejudicar o crescimento celular. É sabido que células deficientes em ATP muitas vezes sofrem apoptose. As células normais que proliferam podem também sofrer paragem no ciclo celular e reactivação do metabolismo catabólico, quando a sua capacidade de produzir ATP a partir da glicose está comprometida, tendo as vias de sinalização como função detectar o estado energético. Este facto é sustentado pela existência da actividade de cinases adenilatos que funcionam como sistema tampão quando diminui a produção de ATP, através da conversão de dois ADPs em uma molécula de ATP e uma molécula de adenosina monofosfato (AMP, do inglês *adenosine monophosphate*). Esta conversão ajuda na manutenção da razão viável de ATP/ADP à medida que a produção de ATP diminui. No entanto, a acumulação de AMP activa a proteína cinase. Esta activação é dependente de uma proteína supressora tumoral, a LKB1 (do inglês, *liver kinase B1*) que conduz à fosforilação de alguns alvos para aumentar a carga de energia nas células (Vander Heiden *et al.*, 2009). Adicionalmente, as células em proliferação possuem requisitos metabólicos para além do ATP (Vander Heiden *et al.*, 2009).

O piruvato que é produzido na glicólise aeróbica é em parte convertido em lactato que é secretado e eliminado da “pool” mantendo a glicólise activa. O lactato excretado diminui o pH do ambiente intracelular e da matriz extracelular, o que pode influenciar a remodelação da matriz, permitindo a invasão de vasos sanguíneos em resposta aos factores angiogénicos produzidos pelo tumor. Para além disso, como consequência da glicólise, as massas tumorais podem tornar-se acídicas o que permite a selecção de células com motilidade (Levine & Puzio-Kuter, 2010).

Inicialmente existiram algumas razões pelas quais a teoria de Warburg não era bem aceite, entre elas o facto de a glicose metabolizada na glicólise para produzir piruvato e secretar lactato ser energeticamente ineficiente. De facto, a maioria do ATP gerado pelo catabolismo da glicose, por molécula, que ocorre durante o ciclo de Krebs não é o usado pelas células

tumorais. Em segundo lugar não estava bem esclarecido como este facto contribuía para o fenótipo do cancro. Em terceiro lugar os mecanismos possíveis implicados numa utilização mais eficiente do piruvato para produzir acetil-coenzima A (acetil-CoA) e prosseguir com o ciclo de Krebs encontravam-se pouco esclarecidos. Em último lugar, com a descoberta da activação mutacional de oncogenes e da inactivação de genes supressores tumorais como etapas causais do cancro, a relação entre estes genes mutados e a regulação metabólica é ainda incompreendida (Levine & Puzio-Kuter, 2010).

Estudos recentes revelam a activação de oncogenes como a possível explicação para o efeito de Warburg. Componentes da sinalização da PI3K podem estimular directamente elevados níveis de captação de glicose e do seu metabolismo que excedem a capacidade da célula para usar a glicose no suporte à síntese bioenergética e biossíntese (Wise & Thompson, 2010). Quando isto ocorre a célula tumoral secreta, em excesso, metabolitos glicolíticos na forma de lactato. Em alguns tumores este aparente metabolismo de glicose desperdiçador é reflectido por um metabolismo ineficiente da glutamina semelhante (Wise & Thompson, 2010). Algumas células tumorais, de facto, não conseguem sobreviver na ausência de glutamina exógena. Este aminoácido tem demonstrado constituir um substrato fundamental para o crescimento anabólico das células dos mamíferos (Wise & Thompson, 2010).

As células tumorais podem refazer caminhos metabólicos para explorar o microambiente tumoral e permitir o apoio às vias de sinalização específica dos tumores. Sem acesso à circulação central, é possível que a concentração de metabolitos no local possa atingir níveis superiores aos níveis sistémicos, permitindo que células tumorais possam usufruir da sinalização parácrina e autócrina mediada por metabolitos, o que não se verifica nos tecidos normais (Hsu & Sabatini, 2008).

Talvez a ideia mais estimulante seja que os metabolitos libertados pelo tumor na área do microambiente possam atuar como moléculas de sinalização parácrina. Tradicionalmente considerado com um produto do metabolismo, o lactato pode ser considerado como uma dessas moléculas, já que a inibição da enzima LDH pode bloquear o crescimento do tumor através de vários mecanismos. Transportado por inúmeros transportadores

monocarboxilados, este metabolito pode ser partilhado e metabolizado pelas células, no entanto a ideia mantém-se como algo controverso. A interconversão lactato-piruvato pode alterar a razão  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  nas células e a entrada e saída do lactato pode servir para coordenar o metabolismo de um grupo de células (Hsu & Sabatini, 2008; Vander Heiden *et al.*, 2009; Nakajima & Van Houten, 2012). A interacção tumor-estroma pode no entanto possuir uma componente metabólica. As células tumorais respondem de forma autónoma à hipoxia, iniciando a angiogénese. De facto, a acidose que pode ocorrer nas células precede a angiogénese e o lactato pode estimular a expressão do factor de transcrição HIF independentemente da hipoxia. Assim, as células através da sua participação de forma conjunta e coordenada podem agir como um pseudo-órgão (Hsu & Sabatini, 2008; Nakajima & Van Houten, 2012).

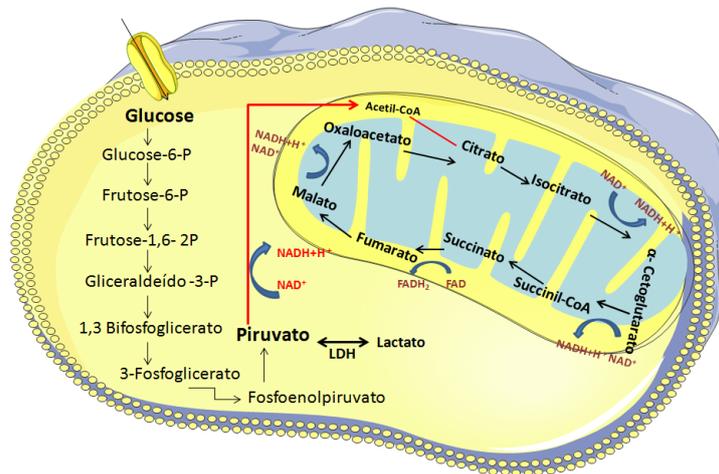
## Ciclo de Krebs

Aquando da descrição do efeito de Warburg muito pouco se sabia acerca da sinalização cruzada entre a respiração e a fermentação celulares (Feron, 2009; Ferreira *et al.*, 2012).

O piruvato localiza-se na intersecção entre duas das principais vias catabólicas da célula: a glicólise e o ciclo de Krebs, também denominado por ciclo dos ácidos tricarbóxicos ou por ciclo do ácido cítrico. Aquele metabolito é transportado para a matriz mitocondrial, a fim de ser convertido em acetil-CoA pela PDH e, depois, entra no ciclo de Krebs para produzir equivalentes redutores que serão utilizados pela cadeia respiratória para conduzir à fosforilação oxidativa (figura 4). Alternativamente, o piruvato pode permanecer no citosol e ser reduzido pela LDH (LDH, do inglês *lactate dehydrogenase*) (Diaz-Ruiz *et al.*, 2011).

O ciclo de Krebs foi pela primeira vez descrito por Krebs e Johnson nos anos 30 (Krebs & Johnson, 1937). Este ciclo de fosforilação oxidativa é responsável pela conversão da energia de macronutrientes em ATP através de um conjunto de reacções coordenadas e acopladas nas quais os macronutrientes são oxidados (são exemplos a glicose, os ácidos gordos e os

aminoácidos), o oxigénio é reduzido a água, e a adenosina difosfato é fosforilada e transformada em ATP (Lanza & Nair, 2010). O ciclo de Krebs constitui a via central do metabolismo respiratório oxidativo ou seja, a via final do catabolismo aeróbio dos glúcidos, ácidos gordos e aminoácidos. Este ciclo tem como objectivos gerar energia metabólica na forma de ATP e guanosina trifosfato (GTP, do inglês *guanosine-5'-triphosphate*), reduzir nucleótidos de adenina,  $\text{NAD}^+$  e  $\text{NADP}^+$  (do inglês, *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) utilizados como dadores de electrões e gerar precursores biossintéticos como o oxaloacetato, o succinil-coA e o  $\alpha$ -cetoglutarato, como representado na figura 4.



**Figura 4** - Esquema representativo do conjunto de reacções do ciclo de Krebs. O ciclo de Krebs é composto por duas fases: a primeira designada por descarboxilativa e a segunda por oxidativa.

Para explicar a glicólise aeróbica na célula tumoral, tem sido proposto que o piruvato não poderia ser metabolizado de forma eficiente pela mitocôndria, o que resultaria num desvio do fluxo metabólico para a produção de lactato. Este facto pode ser explicado por três possíveis razões: a restrição de transporte do piruvato para a matriz mitocondrial, a inibição da actividade da enzima PDH, e a sobre-activação da enzima LDH (Diaz-Ruiz *et al.*, 2011). O piruvato pode entrar para a matriz mitocondrial através de um transportador específico localizado na membrana interna deste organelo. Estudos revelaram que o transporte de piruvato se encontra diminuído em

mitocôndrias isoladas numa linha de células de hepatoma (Diaz-Ruiz *et al.*, 2011).

Um modelo alternativo para a inibição da actividade da PDH é a produção de um sub-produto, a acetoína a partir da descarboxilação não-oxidativa do piruvato. Este composto inibe a oxidação do piruvato em mitocôndrias isoladas (Baggetto & Lehninger, 1987a, 1987b). A acetoína é encontrada em quantidades significativas nos tumores, mas não em células normais, indicando uma restrição do fluxo de piruvato para o ciclo de Krebs, nas células tumorais. No entanto, a inibição da PDH mediada por acetoína pode ser completamente revertida *in vitro* por ADP e outros substratos respiratórios como o  $\alpha$ -cetoglutarato, o malato e o glutamato. Assim, uma vez que estes outros substratos estão normalmente presentes na célula tumoral, é improvável que a entrada de piruvato para o ciclo de Krebs possa ser completamente inibida pela acetoína. O piruvato é reduzido no citosol da célula pela lactato desidrogenase a fim de manter um fornecimento constante de NAD<sup>+</sup>, fornecimento esse que é necessário para conduzir a glicólise, tal como se encontra representado na figura 4. Esta enzima encontra-se também sobreexpressa numa variedade de linhas celulares de cancro sendo que as perturbações da sua expressão estimulam a respiração celular e diminuem a viabilidade das células do tumor em condições de hipoxia (Diaz-Ruiz *et al.*, 2011). Para além de tudo isto, em condições de hipoxia, o piruvato, em vez de ser convertido em acetil-CoA para entrar no ciclo de Krebs, pode ser transaminado e convertido em alanina (Dang, 2012).

Outra possibilidade para a explicação dos defeitos no ciclo de Krebs é o elevado efluxo de citrato que foi observado em mitocôndrias isoladas a partir de uma linha de células de hepatoma, o que se parece correlacionar com a falta do complexo III na cadeia respiratória nestas mitocôndrias (Diaz-Ruiz *et al.*, 2011; Smolková & Ježek, 2012). Como o citrato é oxidado pela isocitrato desidrogenase (IDH, do inglês *isocitrate dehydrogenase*) no citoplasma a fim de produzir NADPH, estes resultados podem ser interpretados como um desvio do fluxo de carbono para a síntese lipídica, como consequência de um ciclo de Krebs prejudicado (Diaz-Ruiz *et al.*, 2011; Smolková & Ježek, 2012). Esta característica parece ser limitada a esta linha de células, uma vez que um outro estudo que utilizou uma linha de células de hepatoma diferente não revelou nenhuma influência no efluxo de citrato.

Outra deficiência no ciclo de Krebs pode ser ao nível da succinato desidrogenase (SDH, do inglês *succinate dehydrogenase*), que também participa na cadeia respiratória mitocondrial, como complexo II (Diaz-Ruiz *et al.*, 2011). Mutações na SDH ocorrem comumente em feocromocitomas e paragangliomas. Uma diminuição da translocação de ADP para a matriz mitocondrial, bem como a inibição da produção de ATP na mitocôndria podem conduzir a uma diminuição da respiração celular tendo, conseqüentemente, a célula de permanecer num processo de produção de ATP derivado da glicólise. A redução do conteúdo e/ou actividade dos componentes da cadeia respiratória pode também ocorrer, existindo alguns estudos que demonstram a inibição dos complexos I, III e IV (Diaz-Ruiz *et al.*, 2011).

Tem sido demonstrado que alguns tipos de cancro, como o hepatoma, o glioma e cancro da mama, possuem mitocôndrias funcionais e que é possível a obtenção de ATP, principalmente, a partir da fosforilação oxidativa (Diaz-Ruiz *et al.*, 2011). Além disso, demonstrou-se que algumas células tumorais podem alternar, reversivelmente, entre a fermentação e o metabolismo oxidativo, dependendo da ausência ou da presença de glicose e das condições micro-ambientais (Diaz-Ruiz *et al.*, 2011). Curiosamente, um modelo recente propôs que células "glicolíticas" poderiam estabelecer uma simbiose com células "oxidativas" através da transferência de lactato. Esta hipótese aponta para o facto de que a plasticidade metabólica observada *in vitro* pode ter um impacto sobre a fisiologia do tumor *in vivo* (Diaz-Ruiz *et al.*, 2011).

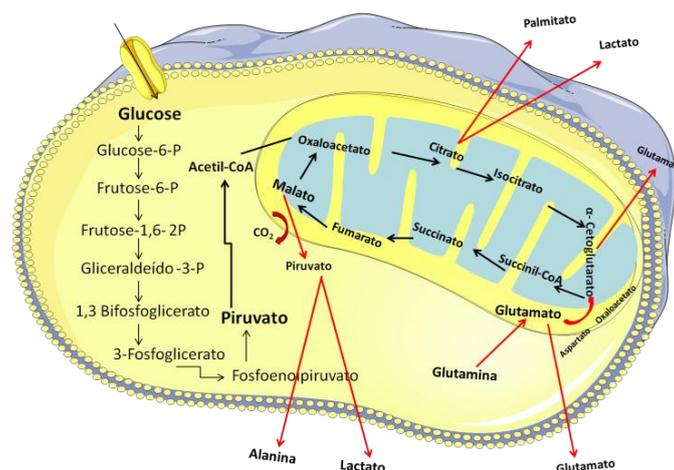
## Glutaminólise

O conceito de estudar o metabolismo da glicose e da glutamina no cancro, originalmente fundamentado pelas inúmeras vias em que estes dois nutrientes intervêm, tem sido reforçado pelos estudos mais recentes que demonstram que o metabolismo de ambos é regulado por oncogenes (Cheng *et al.*, 2011). A maioria das células depende maioritariamente do metabolismo oxidativo para obter a energia necessária para as suas funções e

crescimento. Através deste metabolismo, quando o oxigénio está presente, converte-se a glicose em dióxido de carbono e água, o que é denominado por Efeito de Pasteur. Na ausência de oxigénio, este metabolismo é alternado para a formação anaeróbia de lactato (Stubbs & Griffiths, 2010). As células normais podem realizar glicólise aeróbica e ineficiente quebra da glutamina quando são induzidas a proliferar. Mas se a oferta intracelular de nutrientes se tornar deficiente, as células adaptam-se com a reativação da fosforilação oxidativa e cessam a proliferação (Souba, 1993; Klimberg & McClellan, 1996; Kaelin & Thompson, 2010; Stubbs & Griffiths, 2010). A capacidade de se adaptar a uma fonte de nutrientes diminuída depende da integridade de um conjunto de proteínas supressoras tumorais. As células tumorais, que na maior parte não possuem estas proteínas, exibem dependência de glicose e/ou o consumo de glutamina (Kaelin & Thompson, 2010).

A glutamina, aminoácido mais abundante no corpo humano, constitui o maior veículo para a circulação da amónia na sua forma não-tóxica pelo que alguns autores defendem que o cancro se comporta como um “caçador” de glutamina (Souba, 1993; Klimberg & McClellan, 1996).

A glutaminólise consiste numa série de reacções bioquímicas, através das quais o aminoácido glutamina é degradado a glutamato, aspartato, dióxido de carbono, piruvato, alanina, lactato e citrato, tal como representado na figura 5.



**Figura 5** - Esquema representativo da glutaminólise. Conjunto de reacções através do qual a glutamina é degradada a glutamato, aspartato, piruvato, CO<sub>2</sub>, lactato, alanina e citrato.

Para a maioria das células as únicas moléculas catabolizadas em quantidades apreciáveis são a glicose e a glutamina, o que significa que a glicose e a glutamina fornecem a maioria dos carbonos, nitrogénios e energia livre e reduzem os equivalentes necessários para suportar o crescimento e a divisão celular (Vander Heiden *et al.*, 2009). Assim, a conversão de toda a glicose em dióxido de carbono pela via da fosforilação oxidativa na mitocôndria, com o objectivo de maximizar a produção de ATP, constitui a via mais eficiente (Vander Heiden *et al.*, 2009). Este facto pode explicar parte da vantagem selectiva fornecida pelo efeito de Warburg em que as células convertem glicose e glutamina em lactato e alanina (Vander Heiden *et al.*, 2009).

A transformação tumoral é acompanhada pelo aumento adaptado na síntese de proteínas e nucleótidos. As elevadas taxas de síntese proteica no crescimento rápido dos tumores requerem um fornecimento contínuo de aminoácidos essenciais e não essenciais (Medina & Owen, 2002). As características primárias das células tumorais são mantidas através da actividade metabólica intrinsecamente modificada, a qual é caracterizada por um fornecimento celular reforçado de nutrientes, para a produção de energia, e pela capacidade de sintetizar uma variedade de componentes macromoleculares, durante cada passagem pelo ciclo celular (Vander Heiden *et al.*, 2009; Dang, 2012). A glutamina pode ser sintetizada a partir de intermediários metabólicos, tais como  $\alpha$ -cetogluturato e oxaloacetato (OAA). No entanto, em condições catabólicas, como é o caso de patologias, este aminoácido torna-se essencial e tem de ser ingerido para atender às necessidades (Dang, 2012).

Alguns estudos referem que as células tumorais são capazes de realizar de forma eficiente o transporte de glutamina, constituindo este um dos seus combustíveis essenciais (Medina, 2001). As células tumorais são entre elas muito diferentes no que diz respeito às necessidades energéticas, e são consideradas sistemas de energia eficazes, uma vez que estão aptas a utilizar energia proveniente de diferentes fontes e sob diferentes condições. Porém, podem ser também consideradas como não eficientes já que desperdiçam a maior parte das fontes de energia sem benefício próprio (Medina, 2001). A glicólise pode funcionar para satisfazer as exigências de

energia da célula tumoral, especialmente em condições de hipoxia; no entanto, o metabolismo acelerado adaptativo de glutamina que se verifica nas células tumorais parece proporcionar substratos para aumentar a lipogénese e a biossíntese de ácidos nucleicos que, por sua vez, são críticos para sustentar o fenótipo proliferativo da célula tumoral (Seyfried & Shelton, 2010).

A glutamina actua como um intermediário no transporte de azoto quimicamente reduzido através da corrente sanguínea, já que para produzir nucleotídeos e aminoácidos não essenciais, as células tumorais precisam de uma fonte robusta de nitrogénio reduzido. Para além disto, a glutamina desempenha um papel crucial na captação de aminoácidos essenciais, para além de conseguir manter o ciclo de Krebs, quando os níveis de glicose são limitados e pode mesmo apoiar a produção de NADPH, que é necessário para a biossíntese de lipídios e nucleotídeos (DeBerardinis & Cheng, 2010; Kaelin & Thompson, 2010)

As células tumorais exibem aumento da captação de glutamina bem como do seu metabolismo, que excede em muito o seu papel como o dador de grupo amino para as vias biossintéticas, assim como o seu papel como precursor para a síntese de prolina, ornitina e arginina (Frezza & Gottlieb, 2009; DeBerardinis & Cheng, 2010; Kaelin & Thompson, 2010). A taxa de consumo de glutamina pelas células tumorais depende da presença ou ausência de substratos alternativos de energia, sendo que os ácidos gordos também influenciam o metabolismo da glutamina. Considerando que o metabolismo da glutamina ocorre na mitocôndria, este aminoácido tem que ser transferido do meio extracelular através de transportadores específicos localizados na membrana plasmática assim como na membrana interna da mitocôndria (Seyfried & Shelton, 2010). Na célula tumoral, 60 % da glutamina é usada para gerar lactato e alanina numa reacção que envolve as enzimas málicas e, conseqüentemente, a produção de NADPH, requisito essencial para a lipogénese. O metabolismo de glutamina também gera  $\alpha$ -cetoglutarato através de uma reacção anaplerótica em que ocorre degradação do oxaloacetato em aspartato e do piruvato em alanina através de transaminases (DeBerardinis *et al.*, 2007).

Nas células tumorais, o ciclo de Krebs é incompleto pelo que o citrato é exportado para o citosol através da actividade de proteínas de transporte de

citrato. Desta forma, para aumentar o transporte deste metabolito, a actividade destas proteínas de transporte está aumentada (DeBerardinis *et al.*, 2007; Wise *et al.*, 2008; Dang, 2012). O citrato presente no citosol é utilizado para lipogénese. Assim, o metabolismo da glutamina proporciona a produção de NADPH e citrato para a lipogénese que se encontra aumentada na célula tumoral (DeBerardinis *et al.*, 2007; Wise *et al.*, 2008; Dang, 2012). Deste modo, o bloqueio do metabolismo da glutamina também restringe a captação de glicose. A inibição pode ser eficaz em restringir o crescimento de células do cancro através da limitação da disponibilidade de um nutriente essencial para o crescimento celular. Como tal, a inibição combinada da glicólise e da glutaminólise pode ser especialmente eficaz à condução das células tumorais altamente glicolíticas para a apoptose (Dang, 2012).

A importância da glutamina no metabolismo tumoral deriva de características partilhadas com a glicose, pois ambos os nutrientes ajudam a colmatar duas necessidades importantes das células tumorais: a bioenergética (produção de ATP) e a provisão de intermediários para a síntese de macromoléculas (DeBerardinis & Cheng, 2010). Consequentemente, a glutaminólise é uma importante via obrigatória para a proliferação de células tumorais e pode ser um bom alvo terapêutico. Tem sido demonstrado que o metabolismo da glutamina pode ser manipulado utilizando o análogo da glutamina 6-diazo-5-oxo-L-norleucina (DON), mas devido à sua toxicidade pode ser um problema (Seyfried & Shelton, 2010; Rajagopalan & Deberardinis, 2011). Estudos recentes sugerem que o polifenol do chá verde poderá influenciar o metabolismo da glutamina através da inibição da enzima glutamato desidrogenase, inibindo-a em condições de hipoglicemia (Diaz-Ruiz *et al.*, 2011).

A glutamina está envolvida em numerosas vias anabólicas, tais como a dos ácidos nucleicos, e pode ser degradada no ciclo de Krebs gerando ATP através da fosforilação ao nível do substracto e fosforilação oxidativa. A glutaminólise pode gerar diferentes metabolitos: o malato, que, através da enzima málica, dá origem a NADPH que pode ser utilizado para alimentar a biossíntese de lípidos; e o OAA, que dá origem ao citrato e que é necessário para a biossíntese de lípidos (Diaz-Ruiz *et al.*, 2011). O OAA alimenta o ciclo do ácido tricarboxílico e é usado para produzir citrato tal como representado na figura 5. Esta actividade é necessária para manter o ciclo de Krebs em

funcionamento, quando as células utilizam o citrato como um precursor biossintético. A anaplerose é um indicador mais específico do crescimento do que a glicólise, porque esta última é também estimulada pela hipoxia e outras fontes de stresse, independentemente da actividade biossintética (Seyfried & Shelton, 2010; Dang, 2012).

## **Proteína p53**

A proteína p53 é um factor de transcrição associado a mais de 50% dos tumores humanos. Esta proteína é muitas vezes denominada de "guardião do genoma" já que possui como funções, auxiliar na prevenção e reparar os danos genéticos. Quando as células sofrem danos no DNA esta proteína pode induzir paragem do crescimento, muitas vezes na fase G1 e G2 do ciclo celular, conduzindo as células à apoptose (Achison & Hupp, 2003).

Quando a proteína p53 está funcional, a célula danificada é encaminhada para a reparação; no entanto, se a lesão for grave, a proteína pode forçá-la a cometer suicídio por apoptose em vez de crescer e proliferar com erros. Se a proteína p53 estiver inactivada ocorre instabilidade genética, que ao longo do tempo conduz à transformação maligna das células. Por outro lado, se a proteína p53 estiver mutada, o que acontece na maior parte dos tumores malignos, facilita a iniciação e a progressão tumoral, por um mecanismo de ganho de função (Gudkov & Komarova, 2003, 2010). Para além destas funções conhecidas, a manutenção da integridade do genoma, a paragem do ciclo celular e a promoção da apoptose, existem evidências que sugerem que a p53 também regula a respiração mitocondrial e a glicólise. Bensaad e colaboradores (2006) identificaram influência da p53 na proteína TIGAR. Nas células normais, a normal expressão de TIGAR diminui os níveis de frutose-2,6-bifosfato, o que suprime a glicólise, com desvio da glicose-6-fosfato para a via das pentoses fosfato. Desta forma, a activação da via das pentose fosfato aumenta os níveis de NADPH o que, por sua vez, aumenta os níveis de glutathiona reduzida para eliminar as ROS. De facto, nas células que expressam a proteína TIGAR verifica-se uma diminuição global das ROS. Assim, a perda de p53 e, conseqüentemente, a perda da expressão

de TIGAR, faz com que haja um aumento da glicólise à custa da via das pentoses fosfato, bem como o aumento da produção de ROS (Bensaad *et al.*, 2006).

Para além disto, a proteína p53 também regula directamente a expressão e a actividade da SCO2 (do inglês, synthesis of cytochrome c oxidase, factor 2) que é necessária para a formação do complexo mitocondrial da citocromo c oxidase (COX, do inglês *Cytochrome c oxidase*) que, por sua vez, está envolvido na cadeia de transporte de electrões da respiração mitocondrial. No entanto, em diversos tumores verifica-se frequentemente a mutação ou a ausência desta proteína de forma a assegurar o seu potencial replicativo. Assim, as células tumorais em que se verifique uma diminuição da expressão da SCO2 podem contribuir directamente para o efeito de Warburg, através da compensação aeróbica glicolítica acompanhada pelo aumento da produção de ácido láctico (Chiche *et al.*, 2010). Esta proteína exerce ainda acção sobre a fosfoglicerato mutase (PGM, do inglês *phosphoglycerate mutase*), uma enzima glicolítica que catalisa a conversão de 3-fosfoglicerato em 2-fosfoglicerato (Kondoh *et al.*, 2007). A actividade da PGM encontrou-se elevada em tumores do pulmão, fígado e cólon. Kondoh *et al.* (2007) demonstraram que a p53 suprime a expressão de PGM. Assim, a ausência de expressão da proteína p53 em células tumorais pode conduzir à actividade aumentada da PGM e, desta forma a um aumento da glicólise (Kondoh *et al.*, 2007)

Inerente ao facto dos tumores sólidos serem caracterizados por populações heterogéneas de células, é o limitado suprimento de sangue que conduz à diminuição das concentrações de oxigénio, proporcionando as condições acídicas do meio. As diferenças na fosforilação da proteína p53, sob condições de hipoxia ou anóxia, sugerem uma heterogeneidade significativa na sua resposta, mesmo numa população homogénea de células tumorais, devido aos gradientes de oxigénio. Uma das questões centrais na progressão do cancro é a natureza das condições do microambiente para a produção de clones celulares com mutação de oncogenes e de genes supressores tumorais. Sabe-se que a hipoxia constitui um factor de pressão para a seleção lógica de mutação na p53 em células tumorais (Achison & Hupp, 2003). Graeber *et al.* demonstraram que as células expostas à hipoxia acumulavam proteína p53 (Graeber *et al.*, 1994). Esta acumulação aumentou

com o tempo de incubação das células em hipoxia e com a diminuição da  $pO_2$ . A maioria dos estudos mostraram que o aumento de proteína p53 durante a hipoxia é devido a uma estabilização que é dependente da presença de HIF-1 $\alpha$  (Sermeus & Michiels, 2011). No entanto, a sobreexpressão de HIF-1 $\alpha$  não é suficiente para a indução de p53. Diferentes hipóteses foram elaboradas para explicar o aumento da proteína p53 durante a hipoxia, mas ainda não está totalmente esclarecido (Sermeus & Michiels, 2011).

Sansome *et al.* (68) observaram que a proteína p53 induzida pela hipoxia é capaz de promover a apoptose, mas de forma diferente de quando é activada por danos no DNA. Assim, em condições de hipoxia, a transactivação da actividade de p53 está diminuída, provavelmente devido à falta de recrutamento do co-activador. Alguns genes alvo da p53 são, mesmo assim, transcritos principalmente se a proteína trabalhar em cooperação com outros fatores de transcrição induzidos pela condição de hipoxia (Sermeus & Michiels, 2011).

## **Factor de Transcrição Hypoxia-Inducible Factor**

A hipoxia pode promover um comportamento invasivo das células tumorais da mesma forma que pode alterar a resposta à intervenção terapêutica como resultado das modificações na expressão de muitos genes, incluindo genes que estão envolvidos no metabolismo intermediário (Weljie & Jirik, 2011).

A limitação nos níveis de oxigénio influencia variados processos celulares, o que tem impacto diferente nas células tumorais em relação às células normais. As células normais reagem à hipoxia com paragem de ciclo celular e o desencadear da morte por apoptose e necrose enquanto que as células tumorais se adaptam mais facilmente a ambientes hostis, desenvolvendo assim mecanismos de escape, o que por sua vez as torna mais resistentes às terapias (Green & Giaccia, 1998; Ferreira *et al.*, 2012).

À medida que o tumor vai crescendo as células tumorais e os diferentes tipos de células normais circundantes interagem entre si, dando origem a um nicho tumoral. Desta forma, as diferenças na disponibilidade de

nutrientes vão-se tornando cada vez mais acentuadas entre as células tumorais, ao longo da espessura do nicho tumoral (Ferreira *et al.*, 2012).

Toda a maquinaria celular sensível ao oxigénio permite que as células se adaptem à hipoxia. O HIF é um factor de transcrição, heterodímero, responsável por inúmeras acções que condicionam o metabolismo da célula tumoral.

O factor de transcrição HIF estimula diversos genes alvo de enzimas glicolíticas bloqueando, simultaneamente, o uso do piruvato pela enzima PDH, responsável pela conversão de piruvato em acetil-coA, molécula que entra directamente no ciclo de Krebs. Todos estes mecanismos produzem uma alteração da produção de ATP trocando a fosforilação oxidativa pela glicólise (Brahimi-Horn *et al.*, 2007; Icard *et al.*, 2012). Nas células normais o efeito de Pasteur é mediado pelo ATP e pelo citrato. Nas células em hipoxia, a completa oxidação da glicose está diminuída, resultando numa diminuição na produção de ATP e citrato pela mitocôndria. Por outro lado, a acção destas moléculas na fosfofrutocinase-1, a principal enzima reguladora da glicólise, está inibida. Desta forma, a glicólise é acelerada conduzindo a um aumento da produção de lactato (Brahimi-Horn *et al.*, 2007; Icard *et al.*, 2012).

O prejuízo da respiração mitocondrial resulta numa incompleta fosforilação oxidativa o que, por sua vez, contribui para a tumorigénese. No entanto, na maioria dos casos a desregulação do efeito de Pasteur aparece como não sendo devido a um defeito na respiração (Icard *et al.*, 2012).

O aumento da entrada de glicose devido à sobreexpressão de genes que codificam os transportadores de glicose (GLUT, do inglês *Glucose transporter*) e o aumento da expressão de enzimas glicolíticas e da LDH-A, uma isoforma da enzima LDH, são algumas das alterações proporcionadas pela proteína HIF. Também, como já referido anteriormente, esta proteína inibe a fosforilação oxidativa através da inibição da entrada do piruvato no ciclo de Krebs, via PDK-1, proteína que medeia a actividade da PDH (Brahimi-Horn *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2012; Icard *et al.*, 2012) Em condições de normoxia ambas as subunidades do HIF, a 1 $\alpha$  e a 1 $\beta$ , são continuamente sintetizadas, no entanto a degradação da sub-unidade 1 $\alpha$  é dependente da ubiquitina através da hidroxilação por uma família de prolil-hidroxilases (Brahimi-Horn *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2012). Assim, aquando da presença de ROS, causadas por inúmeros factores nomeadamente diminuição do aceitador final de

electrões da cadeia respiratória, na condição de hipoxia, ocorre inibição da actividade da prolil-hidroxilase resgatando o HIF-1 $\alpha$  (Brahimi-Horn *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2012). Para além disto, a proteína HIF possui efeitos na modulação de componentes implicados na cadeia transportadora de electrões. A energia livre que é necessária para produzir ATP na mitocôndria é obtida através do NADH e do FADH<sub>2</sub> (do inglês, *reduced flavin adenine dinucleotide*) na cadeia respiratória mitocondrial, através de uma série de complexos multi-enzimáticos nos quais os electrões são transferidos do mais baixo para o mais elevado potencial redutor. O oxigénio é o último aceitador de electrões que conduz à formação da água numa reacção catalizada pelo citocromo c oxidase, o complexo IV da cadeia transportadora de electrões. Tem vindo a ser discutido o facto de a proteína HIF condicionar a expressão de COX4-1 relativamente à COX4-2, com a consequência de se verificar uma optimização da actividade do complexo IV sob condições de hipoxia, uma vez que a COX4-2 é mais eficiente na transferência de electrões para o oxigénio. Está postulado que esta substituição protege as células do dano oxidativo em hipoxia. Esta abordagem surge da verificação de que existe uma sobrerregulação da expressão da proteína LON por parte da proteína HIF. Esta proteína é uma protease mitocondrial que degrada a proteína COX4-1 e ao mesmo tempo induz a expressão do gene da proteína COX4-2 (Brahimi-Horn *et al.*, 2007; Mucaj *et al.*, 2012).

O papel da proteína HIF não passa só pela alteração das vias de obtenção de energia, mas tem como função orquestrar diferentes estratégias que promovem a adaptação de tumores que iniciam o stresse metabólico. Em primeiro lugar provoca uma perda de E-caderina nas células tumorais, promovendo um programa biológico celular de transição conduzindo a alterações das células epiteliais a células pseudo-mesenquimatosas (Ferreira *et al.*, 2012).

Para além disto, este factor de transcrição influencia genes-alvo particularmente relevantes na codificação de factores angiogénicos, de proliferação e de sobrevivência celular, para além dos transportadores de glicose e das enzimas glicolíticas, aumentando a disponibilidade de oxigénio (Semenza, 2003; Lee *et al.*, 2004).

A actividade deste factor de transcrição é regulada por um mecanismo de modificação pós-transcricional do HIF, aumentando a estabilidade

proteica e a capacidade de trans-ativação. Na presença de oxigénio esta proteína sofre várias modificações de hidroxilação e acetilação. Quando os níveis de oxigénio celular diminuem, a modificação e degradação do HIF-1 $\alpha$  cessam havendo uma rápida acumulação da proteína no citoplasma e a sua translocação para o núcleo onde ocorre a sua dimerização com o HIF-1 $\beta$ , formando-se desta forma o complexo HIF-1 que se torna transcripcionalmente activo (Chan *et al.*, 2002; Freedman *et al.*, 2002).

A actividade de transcrição do HIF não só é aumentada em resposta ao stresse hipóxico, mas também como resultado da activação de oncogenes, incluindo o Ras, Raf, PI3K, Akt, mTOR, Myc ou a perda de genes supressores de tumor tais como p53, ING4, PTEN e BVS (Semenza, 2003; Hammond & Giaccia, 2005; Dang, 2007; Shafee *et al.*, 2009). Através da indução ou repressão de genes e proteínas correspondentes, este factor de transcrição auxilia as células em hipoxia a sobreviver e a adaptarem-se em ambiente com níveis de oxigénio diminuídos (Semenza, 2003; Dayan *et al.*, 2006). Os genes induzidos pela actividade do HIF estão envolvidos na detecção de oxigénio, respiração reduzida, eritropoiese, angiogénese, metabolismo glicolítico, homeostase do pH, autofagia, migração, entre outros. Assim, o HIF possui uma elevada influência no crescimento tumoral e de metástases promovendo um ambiente ácido drástico privado de oxigénio e nutrientes (Rajendran *et al.*, 2004; Chiche *et al.*, 2010).

## Capítulo III

# Imagem Funcional nos Tumores Sólidos



A hipoxia induz um fenótipo agressivo, aumentando o potencial metastático e promovendo a progressão tumoral, o que simultaneamente limita o efeito da radio e da quimioterapia. Estas características estão relacionadas com o aparecimento de um conjunto de alterações que incluem a angiogénese, a mutação do gene TP53, a regulação da proliferação celular e o metabolismo da glicose (Rajendran *et al.*, 2004).

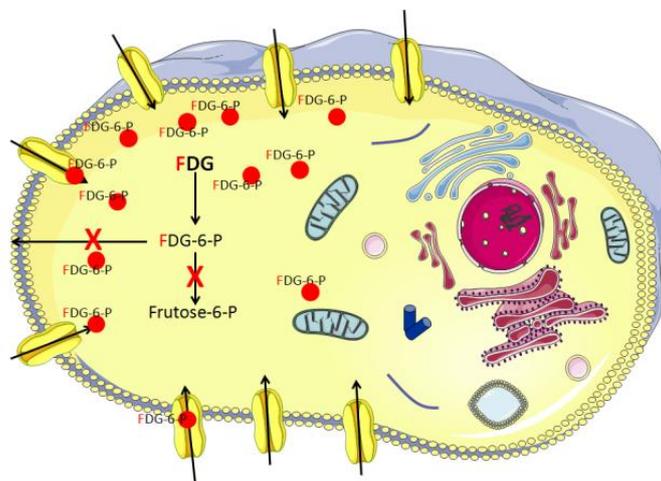
A Medicina Nuclear constitui um método que permite a obtenção de imagem funcional através da utilização de diferentes radiotraçadores. A componente de imagem funcional permite a detecção e a quantificação de uma função fisiológica ou fisiopatológica que depende do traçador administrado. Deste modo, podemos avaliar áreas de hipoxia de órgãos e/ou tecidos, recorrendo à utilização de radiofármacos específicos. Assim, e para a obtenção de imagem funcional de tumores, que constitui a segunda área de utilização da Medicina Nuclear, muitos têm sido os radiofármacos utilizados.

Actualmente a fluordesoxiglicose marcada com flúor-18 ( $^{18}\text{F}$ -FDG) e a fluorocolina marcada com o mesmo radionuclídeo ( $^{18}\text{F}$ -FCho) constituem os radiofármacos emissores de positrões com maior utilização na prática clínica para a obtenção de imagem funcional (molecular) de tumores. A  $^{18}\text{F}$ -Fluorocolina um traçador de replicação celular é preferencialmente utilizada para o estadiamento e seguimento dos doentes com cancro da próstata.

A notória utilização de  $^{18}\text{F}$ -FDG na avaliação de tumores prende-se com o facto de que as células tumorais demonstram, como já referido, elevadas taxas de metabolismo glicolítico, isto é, elevados consumos de glicose. Na verdade, o desenvolvimento deste radiofármaco tinha como objectivo inicial a detecção e estadiamento de tumores, com grande sensibilidade. No entanto, como avalia o metabolismo glicolítico, é também utilizado para estudos cerebrais e do miocárdio (Buerkle & Weber, 2008). O trabalho importante desenvolvido por Warburg, em especial, a verificação de que alguns tumores têm altos índices de captação de glicose em relação ao tecido normal, forneceu a base bioquímica para a utilização do  $^{18}\text{F}$ -FDG na tomografia por emissão de positrões (PET, do inglês *Positron emission tomography*), o radiofármaco mais usado em oncologia nuclear (Rajagopalan & DeBerardinis, 2011).

O princípio em que se baseia a sua utilização consiste na sua acumulação significativamente maior nas células tumorais relativamente às células normais circundantes. Assim, cada molécula de  $^{18}\text{F}$ -FDG, que entra na célula utiliza os mesmos mecanismos das moléculas de glicose, no entanto a metabolização das

duas moléculas, apesar de se iniciarem da mesma maneira, prosseguem por vias distintas. No interior da célula, tanto a molécula de glicose como a de  $^{18}\text{F}$ -FDG são fosforiladas pela hexocinase originando, respectivamente, a glicose-6-fosfato e a  $^{18}\text{F}$ -FDG-6-fosfato. Posteriormente a glicose-6-fosfato continua o seu processo metabólico formando a frutose-1,6-bifosfato e entra na glicólise, ao contrário da  $^{18}\text{F}$ -FDG-6-fosfato que não pode ser metabolizada na via glicolítica, uma vez que o átomo de flúor na posição C2 impede a degradação da molécula (Buerkle & Weber, 2008; Pauwels *et al.*, 1998). Desta forma, e sendo a membrana celular impermeável à transferência da molécula de  $^{18}\text{F}$ -FDG fosforilado, resulta a sua retenção de modo estável no interior da célula tumoral metabolicamente activa de acordo com a figura 6 (Buerkle & Weber, 2008). Em termos de excreção, ao contrário da glicose, a  $^{18}\text{F}$ -FDG não é um substrato para os transportadores de glicose dependentes de sódio, que se encontram presentes no sistema tubular renal. Consequentemente, este radiofármaco não é reabsorvido após a filtração glomerular, mas excretado pela urina, o que contribui para uma rápida libertação de  $^{18}\text{F}$ -FDG do fluxo sanguíneo, importante para a obtenção de imagens com elevada razão alvo/fundo (Buck, *et al.* 2004; Mavi *et al.*, 2007; Buerkle & Weber, 2008; Zytoon *et al.*, 2009).



**Figura 6** – Representação do metabolismo da  $^{18}\text{F}$ -FDG na célula tumoral. Após a entrada de  $^{18}\text{F}$ -FDG pelos transportadores de glicose, o radiofármaco é reconhecido na via da glicólise até ser fosforilado pela enzima hexocinase.

Assim, apesar deste radiofármaco sofrer apenas as duas primeiras etapas de metabolismo da glicose, como o representado na figura 6 (transporte e fosforilação pela hexocinase), as taxas de captação de  $^{18}\text{F}$ -FDG reflectem a

utilização de glicose exógena pelas células tumorais. Assim, a taxa de captação de  $^{18}\text{F}$ -FDG não é apenas dependente da actividade dos transportadores de glicose e da hexocinase, mas também da actividade de outras enzimas intervenientes no processo, como a fosfofrutocinase e a piruvato cinase, duas importantes enzimas reguladoras da actividade glicolítica (Buck *et al.*, 2004; Mavi *et al.*, 2007; Buerkle & Weber, 2008; Zytoon *et al.*, 2009).

Nas células de tumores sólidos, onde a hipoxia é comum, verifica-se alteração da captação deste radiofármaco, já que o microambiente tumoral se encontra modificado, o que condiciona alterações das vias metabólicas. É exemplo a inibição do processo mitocondrial da fosforilação oxidativa, dependente de oxigénio, o que se traduz por compromisso da formação de ATP, e maior utilização da glicólise como fonte de energia. Um aumento da glicólise fornece um modo rápido de gerar ATP, não obstante o enorme consumo de glicose, que se repercute no aumento dos níveis de ácido láctico (Weljie & Jirik, 2011). Este aumento de ácido láctico, em combinação com a diminuição da capacidade da mitocôndria para utilizar protões na formação de ATP, leva a uma acidose intratumoral (Weljie & Jirik, 2011).

Assim, a utilização do  $^{18}\text{F}$ -FDG em oncologia nuclear parece controversa. De facto, o metabolismo da glicose é influenciado por uma variedade de processos para além da hipoxia como, por exemplo, a proliferação celular e a manutenção dos gradientes de iões. Estas circunstâncias, por sua vez, contribuem para um elevado metabolismo da glicose, mesmo na ausência de hipoxia, o que constitui a glicólise aeróbica. Para além disso, a diminuição do fornecimento de sangue pode conduzir a uma crónica e significativa redução de nutrientes, como a glicose e, assim, condicionar uma diminuição da sua captação. Na verdade, a captação de  $^{18}\text{F}$ -FDG constitui um processo influenciado por diversos factores, entre eles a microvascularização, o número de GLUTs, a expressão da enzima hexocinase e a taxa de proliferação celular. Para além disso a captação deste radiofármaco tem vindo a ser correlacionada com a agressividade tumoral e demonstrou ser um indicador de mau prognóstico em diferentes tipos de tumores. A tolerância à hipoxia crónica é uma característica dos organismos superiores no esforço de se adaptarem ao fornecimento insuficiente de oxigénio e de glicose. As adaptações bioenergéticas podem variar nas células tumorais expostas à depleção crónica de oxigénio. Estudos indicam que pode existir uma alteração na relação entre a hipoxia e o metabolismo energético, um facto que deve ser considerado na caracterização da biologia tumoral em termos clínicos, mas também quando se

pretende obter uma imagem ou realizar um tratamento. A presença de heterogeneidade tumoral poderá indicar que a hipoxia se distribui por diferentes zonas no tumor o que se traduz por uma resposta à hipoxia igualmente dispersa e que pode variar (Rajendran *et al.*, 2004).

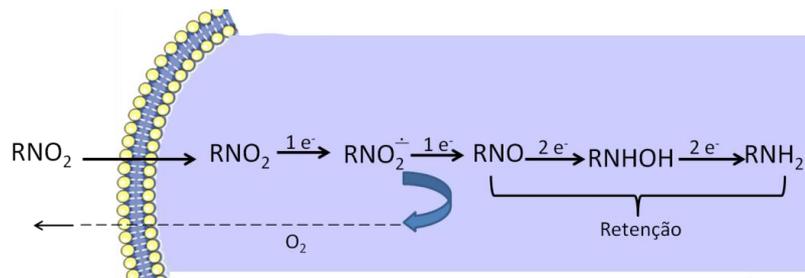
Desta forma, e tendo em conta que baixos níveis de oxigenação possuem uma influência notória no metabolismo celular, é possível a utilização de radiofármacos específicos para a detecção e quantificação de áreas de hipoxia (Kinya *et al.*, 2002).

A Medicina Nuclear, através da marcação radioactiva de algumas moléculas envolvidas nas vias intracelulares influenciadas pela hipoxia ou com impacto em outras vias metabólicas, pode fornecer-nos informações sobre a concentração de oxigénio *in vivo* no tumor (Britz-Cunningham & Adelstein, 2003; Gagel *et al.*, 2006; Holland *et al.*, 2009). Vários radiotraçadores têm vindo a ser desenvolvidos e outros estão em fase de desenvolvimento com o objectivo de serem utilizados na avaliação não invasiva do microambiente do tumor, em particular da hipoxia, característica dos tumores sólidos e considerada um factor determinante na resistência ao tratamento e progressão da doença (Kumar *et al.*, 2002; Krohn *et al.*, 2008; Imam, 2010).

Assim, na Medicina Nuclear, ao longo dos anos têm vindo a ser desenvolvidas algumas moléculas passíveis de serem marcadas com emissores de positrões ou emissores de fotão simples para a detecção de hipoxia tumoral *in vivo*, através de uma imagem funcional. Moléculas com capacidade de serem biorreduzidas, como o misonidazol, que contêm um grupo imidazol, podem ser captadas pelas células em hipoxia. Estas moléculas, na sua maioria, têm a capacidade de aceitar um electrão, com a consequente produção de um radical livre que, subsquentemente, é incorporado nos constituintes da célula, em condições de hipoxia. Por conseguinte, a quantidade de moléculas biorredutivas captadas pelas células em hipoxia pode ser vista como um sensor directo da pressão parcial de oxigénio nos tecidos (McKeown *et al.*, 2007).

A característica principal que determina a penetração intracelular das moléculas que possuem um grupo imidazol, como é o caso dos derivados do nitroimidazol (RNO<sub>2</sub>) é a lipofilicidade. Uma vez no compartimento intracelular ocorre a redução do grupo nitro (-NO<sub>2</sub>) por um conjunto de etapas sucessivas, mediadas por enzimas, que envolve transferência de electrões através do anião radical livre , passando pelo estágio de hidroxilamina (-NHOH) e terminando na amina (-NH<sub>2</sub>). As espécies reduzidas formadas possuem maior

afinidade para com as células em hipoxia e, por isso, a sua retenção é favorecida. Pelo contrário, nas células normais, em presença de oxigénio, verifica-se uma rápida re-oxidação das espécies reduzidas a  $\text{RNO}_2$  favorecendo a saída da célula, como representado na figura 7 (Abrantes *et al.*, 2009).



**Figura 7** – Representação da redução do grupo nitro no interior da célula permitindo a sua retenção.

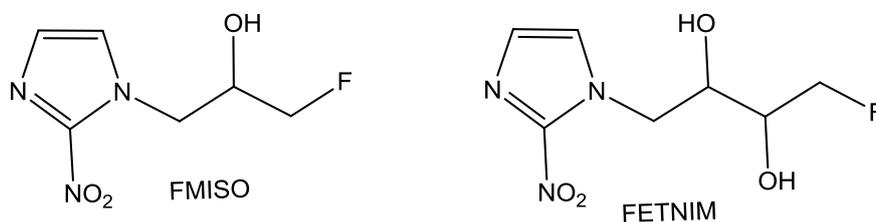
A avaliação da fracção de células hipóxicas no volume tumoral é o objectivo principal dos radiofármacos utilizados para obtenção da imagem da hipoxia. Por outro lado, os efeitos biológicos e bioquímicos da radiação dependem fortemente da interacção entre o oxigénio e os radicais livres produzidos durante a radiólise da água. Esta natureza complexa da hipoxia, que se distribui de forma heterogénea e difere grandemente entre os tumores mesmo os aparentemente idênticos, é a principal razão para a ausência de um radiofármaco ideal (Das *et al.*, 2003). Nenhum dos marcadores de hipoxia sintetizado até agora reúne as características óptimas. Estas incluem a facilidade e baixo custo de preparação, uma cinética adequada, ou seja, a acumulação rápida e tempo suficiente de retenção no tecido tumoral, e a simultânea depuração rápida nos outros tecidos, para proporcionar uma melhor razão alvo/fundo (Kumar *et al.*, 2002; Krohn *et al.*, 2008; Imam, 2010).

### **RADIOFÁRMACOS UTILIZADOS PARA IMAGEM POR EMISSÃO DE POSITRÕES**

Existem diferentes radiotraçadores emissores de positrões passíveis de serem utilizados na detecção de hipoxia. A maioria destes traçadores é derivada do misonidazol. O seu mecanismo de captação é influenciado pela redução que sofrem no interior da célula que, desta forma, não são extrusados.

O radiofármaco mais utilizado na Medicina Nuclear por emissão de positrões é o  $^{18}\text{F}$ -FDG que entra nas células devido ao aumento de transportadores de glicose (GLUT, do inglês *Glucose transporter*) e também pela sobreexpressão de enzimas glicolíticas responsáveis pela degradação da fluorodesoxiglicose (Christian *et al.*, 2010). Desta forma, a imagem obtida com  $^{18}\text{F}$ -FDG traduz o metabolismo glicolítico. A utilidade da fluorodesoxiglicose é agora amplamente reconhecida no estadiamento tumoral e na monitorização da eficácia do tratamento (Ben-Haim & Ell, 2009; Pauwels *et al.*, 2000; Pugachev *et al.*, 2005; Mavi *et al.*, 2007; Riedl *et al.*, 2007; Buerkle & Weber, 2008).

As primeiras moléculas desenvolvidas e marcadas com radionuclídeos emissores de positrões, com o objectivo de serem utilizadas como agentes de imagem, foram o fluoromisonidazol (FMISO) e o fluoroeritronitroimidazol (FETNIM), ambos possuindo um átomo de flúor, como representado na figura 8. A presença deste átomo de flúor significa que permite a sua marcação com  $^{18}\text{F}$ , dando origem aos compostos  $^{18}\text{F}$ -FMISO e  $^{18}\text{F}$ -FETNIM, respectivamente (Buscombe & Bombardieri, 2005; Gagel *et al.*, 2006).



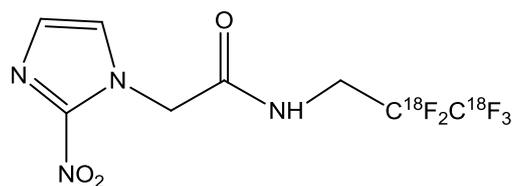
**Figura 8** – Estrutura química dos agentes de imagem FMISO e FETNIM.

O  $^{18}\text{F}$ -FMISO, apesar de ainda não se encontrar aprovado para utilização humana, é o radiofármaco com maior número de ensaios clínicos. A captação deste

radiofármaco revela-se homogénea na maior parte dos tecidos normais, reflexo do seu elevado coeficiente de partição *n*-octanol/água. A distribuição inicial deste radiofármaco é dependente do fluxo sanguíneo, no entanto, a pressão parcial de oxigénio local constitui o factor determinante na sua retenção. A acumulação do <sup>18</sup>F-FMISO está relacionada com a sua ligação intracelular a macromoléculas quando a pressão parcial de oxigénio é inferior a 10 mmHg. A sua captação é sensível unicamente à situação de hipoxia nas células viáveis, não sendo captado por células em necrose, visto que nestas células a cadeia transportadora de electrões que reduz o nitroimidazol a um agente alquilante biorreduzido não se encontra activa (Padhani, 2006). Este radiofármaco é capaz de monitorizar as alterações no estado de hipoxia tumoral durante a terapia com radiação. Estudos em sarcomas e em cancros da cabeça e pescoço demonstraram a correlação entre a captação de FMISO e o diminuído resultado da quimio e da radioterapia (Padhani, 2006).

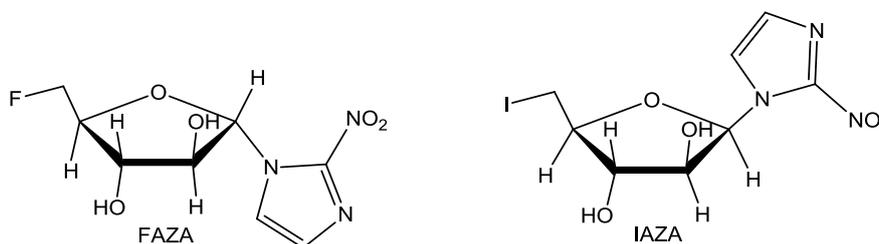
O fluoroeritronitroimidazol marcado com flúor-18, um radiofármaco mais recente, apresentou, em experiências em que foi utilizado um modelo murino de cancro da mama, uma razão tumor/músculo superior à observada com o <sup>18</sup>F-FMISO. Diferentes estudos revelaram que a captação deste radiofármaco com características mais hidrofílicas, quando comparada com o FMISO, era superior. Para além disto, o processo de síntese do FETNIM é mais simples do que o do FMISO, o que constitui uma característica favorável adicional (Couturier *et al.*, 2004).

Para além do FMISO e do FETNIM outros foram os radiofármacos sintetizados para a detecção de hipoxia também derivados do nitroimidazol, nomeadamente, o 2-(2-nitro-1[H]-imidazol-1-il)-*N*-(2,2,3,3,3-pentafluoropropilo)-acetamida) (<sup>18</sup>F-EF5), representado na figura 9. Este radiofármaco apresenta elevada lipofilicidade, fazendo dele um radiofármaco com características favoráveis para a detecção não só da hipoxia tumoral mas também de outros tecidos ou órgãos, em especial, o sistema nervoso central. Em termos estruturais, a presença da cadeia *N*-pentafluoropropilo confere-lhe características de elevada estabilidade química e bioquímica. Até agora já foram realizados alguns estudos clínicos, tendo os resultados obtidos sido satisfatórios na detecção de hipoxia tumoral em doentes com gliomas e cancro da cabeça e pescoço (Imam, 2010; Eskola *et al.*, 2012).



**Figura 9** – Estrutura química do radiofármaco  $^{18}\text{F}$ -EF5.

Com o mesmo objectivo, outras moléculas que contêm um grupo nitroimidazol têm vindo a ser estudadas, incluindo os arabinosídeos iodoazomicina (IAZA) e a fluoroazomicina (FAZA) que constituem a segunda geração de traçadores de hipoxia, representados na figura 10. A marcação destas moléculas com radionuclídeos diferentes resulta em radiofármacos, também eles, com características diferentes (Yutani *et al.*, 1999; Reischl *et al.*, 2007).



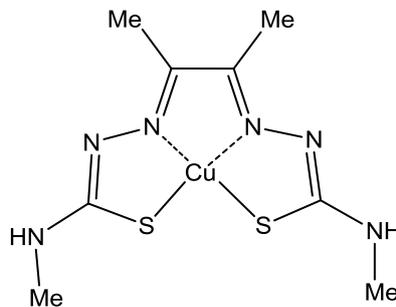
**Figura 10** – Estrutura química dos ligandos FAZA e IAZA.

O  $^{18}\text{F}$ -FAZA, marcado com flúor-18, é um radiofármaco que possui uma unidade estrutural de um hidrato de carbono, conferindo-lhe assim um carácter menos lipofílico do que o FMISO e, possivelmente, mais fácil de eliminar do tecido em hipoxia (Busk *et al.*, 2008). Comparativamente com o FMISO, o  $^{18}\text{F}$ -FAZA apresenta uma captação mais rápida que estabiliza após 60 minutos, enquanto a captação do FMISO aumenta ao longo do tempo, verificando-se que 180 minutos após a administração não existe qualquer diferença na captação dos dois radiotraçadores. Para além disso, o  $^{18}\text{F}$ -FAZA possui uma biocinética mais favorável, já que a eliminação deste radiofármaco ocorre até três horas após a administração. Alguns estudos revelaram que entre as duas e as quatro horas após

a administração do radiofármaco, se verificava uma diminuição da sua concentração no interior da célula, indicando reversibilidade da reacção de redução que ocorre dentro da célula (Imam, 2010).

A utilização de radioisótopos do cobre emissores de positrões apresenta algumas vantagens relativamente a outros radionuclídeos mais utilizados na Medicina Nuclear, como é o caso do Tecnécio-99m. Essas vantagens são consequência do cobre apresentar dois estados de oxidação principais (+1 e +2), uma química de coordenação relativamente simples e possuir processos de redução bem documentados. Adicionalmente, sendo o cobre ubíquo na natureza, a sua bioquímica e o seu metabolismo no Homem estão bem estabelecidos. A crescente disponibilidade e utilização destes isótopos emissores de positrões tornou-se assim uma opção atractiva na qual poderia ser baseado o desenvolvimento de novos radiotraçadores para hipoxia (Vãvere & Lewis, 2007; Abrantes *et al.*, 2009; Botelho & Abrantes, 2012).

O complexo de cobre de uma tiosemicarbazona, Cobre (II)-diacetil-bis(N<sub>4</sub>-metiltiosemicarbazona (Cu-ATSM), figura 11, possui uma pequena massa molecular e uma elevada permeabilidade membranar, o que permite a sua difusão fácil da corrente sanguínea para as células circundantes (Imam, 2010).



**Figura 11**– Estrutura química do ligando Cu-ATSM

Alguns estudos referem que constitui um traçador com boas características para avaliar células tumorais em hipoxia mas viáveis. Embora existam estudos realizados em diferentes tipos de tumores como o colorrectal e o cancro do cólon do útero, o seu uso parece estar reduzido apenas ao cancro da próstata (Imam, 2010).

O Cu-ATSM acumula-se rapidamente nas células em hipoxia mas também é

eliminado rapidamente pelas células em normoxia, criando uma elevada razão alvo/fundo. Muitos são os radioisótopos do cobre que podem ser utilizados para marcar estas moléculas, possuindo períodos de semi-desintegração ( $T_{1/2}$ ) entre os 9,6 minutos e as 12,7 horas, sendo o cobre-64 ( $T_{1/2}=12,7$  h) o mais utilizado pois possui características adequadas nomeadamente o período de semi-desintegração que é maior relativamente aos restantes isótopos (Imam, 2010).

### ***RADIOFÁRMACOS UTILIZADOS PARA IMAGEM POR EMISSÃO DE FOTÃO SIMPLES***

A hipoxia tumoral é caracterizada por uma diminuição na pressão parcial de oxigénio nos tecidos, o que constitui um aspecto de extrema relevância no desenvolvimento de tumores sólidos. Para além desta característica constituir um entrave à eficácia da radio e da quimioterapia, sabe-se que a hipoxia também induz a angiogénese o que, por sua vez, contribui para a invasão do cancro e constituição de metástases, o que também está associado a um mau prognóstico (Höckel & Vaupel, 2001; Harrison & Blackwell, 2004; Zhou *et al.*, 2006; Chiche *et al.*, 2010;).

Na Medicina Nuclear, a imagem obtida utilizando radiofármacos marcados com emissores de fotão único (SPECT, do inglês *single photon emission computerized tomography*) possui vantagens sobre a PET devido à sua maior disponibilidade, menores custos e logística menos pesada (Ballinger, 2001).

Existem vários radiofármacos para detecção de hipoxia através da SPECT, a maioria deles marcados com Tecnécio-99m ( $^{99m}\text{Tc}$ ), o radionuclídeo mais utilizado em imagem na Medicina Nuclear por fotão simples. O Tecnécio-99m tem sido objecto de grande estudo desde 1970, devido à importância que este elemento adquiriu no diagnóstico em Medicina Nuclear, sendo usado em mais de 80% dos exames de diagnóstico. Contribuem para isto as suas características físicas favoráveis, nomeadamente, a emissão gama ( $E_{\gamma_1} = 140,5$  keV - 98,6% e  $E_{\gamma_2} = 142,6$  keV - 1,4%) apropriada para a utilização em SPECT e o período de semi-desintegração de 6,01 horas, ideal tanto para a preparação de grande número de radiofármacos como para minimizar a dose de radiação nos doentes (Pillai *et al.*, 1999).

O Tecnécio-99m é obtido através de um gerador de Molibdénio-99 ( $^{99}\text{Mo}$ )/ $^{99m}\text{Tc}$ , sistema que contém um radionuclídeo pai com um período de semi-desintegração longo ( $^{99}\text{Mo}$ ,  $T_{1/2}= 66,02$  horas) e que dá origem a um radionuclídeo

filho, o  $^{99m}\text{Tc}$  que tem um período de semi-desintegração curto ( $t_{1/2} = 6,01$  horas). No gerador, o  $^{99}\text{Mo}$  encontra-se adsorvido a uma coluna de alumina, obtendo-se o  $^{99m}\text{Tc}$  sob a forma de pertecnetato de sódio ( $^{99m}\text{TcO}_4\text{Na}$ ) em solução aquosa estéril e apirogênica, por simples eluição com soro fisiológico. Quando este radionuclídeo é eluído do gerador, o metal encontra-se num estado de oxidação +7. Para haver complexação com os ligandos e se constituírem os radiofármacos, é necessário reduzir o metal a um estado de oxidação mais baixo. Para isso é necessário a presença de um agente redutor, sendo o cloreto estanhoso,  $\text{SnCl}_2$  é o mais frequentemente utilizado (Sharp *et al.*, 2005).

Nos últimos 15 anos têm surgido algumas inovações nas marcações com  $^{99m}\text{Tc}$ , nomeadamente o trabalho desenvolvido por Alberto *et al.* (Alberto *et al.*, 1994; Alberto *et al.*, 1998). A inovação consiste na utilização de um complexo de Tc-tricarbonilo,  $[\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ , como precursor do radiofármaco em vez de utilizar directamente o pertecnetato de sódio. O  $[\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$  pode ser preparado facilmente a partir de  $^{99m}\text{TcO}_4\text{Na}$  em meio alcalino, na presença de tartarato de sódio e/ou de potássio e de boro-hidreto de sódio como agente redutor e purgando o meio com CO. Em alternativa a este procedimento, existe um *kit* disponível comercialmente e denominado Isolink<sup>TM</sup> (Covidien, EUA), que permite uma preparação mais segura e reprodutível. Esta formulação contém tetraborato e carbonato de sódio para controlar o pH, tartarato de sódio para evitar a formação de  $^{99m}\text{TcO}_2$  e boranocarbonato de sódio como agente redutor e fonte de monóxido de carbono. Na presença de um ligando com átomos dadores apropriados, este complexa com o Tecnécio-99m deslocando as moléculas de água dando, assim, origem ao radiofármaco. Com diferentes ligandos formam-se complexos diferentes no que diz respeito à carga, tamanho e lipofilicidade e, conseqüentemente, com propriedades biológicas distintas. Para formação destes complexos, os ligandos devem ser, preferencialmente, tridentados ou bidentados. No primeiro caso, o ligando substitui as três moléculas de água, enquanto no segundo caso substitui duas e a terceira poderá ser substituída por um halogénio do meio (Alberto *et al.*, 1994; Alberto *et al.*, 1998). Apesar da variedade de estudos já realizados com o  $[\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$  para marcação de inúmeros fármacos, até ao momento ainda não existe nenhum já aprovado para utilizado na clínica (Alberto *et al.*, 1994; Alberto *et al.*, 1998;).

A utilidade clínica de complexos de Tecnécio-99m depende de vários fatores, entre eles, a elevada estabilidade, a capacidade de atravessar as membranas celulares rapidamente, o potencial redox adequado para permitir a

permanência dos complexos no interior das células em hipoxia e a eliminação rápida pelos tecidos normóxicos. É importante também considerar o custo e a facilidade de preparação dos complexos (Jurisson & Lydon, 1999; Mallia *et al.*, 2006).

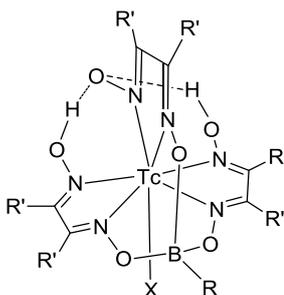
Para além do  $^{99m}\text{Tc}$  existem outros radionuclídeos que podem ser usados na marcação de moléculas para avaliação de hipoxia por SPECT, como o Gálio-67, o Índio-111, o Iodo-123, o Iodo-131 e o Tálcio-201 (Reichert *et al.*, 1999).

A obtenção de imagem com radionuclídeos emissores gama para detectar tecido em hipoxia foi sugerida pela primeira vez em 1979 por Chapman (Chapman, 1979). Desde então, diversos radiofármacos têm sido propostos para esta finalidade. A grande maioria dos ligandos que apareceram na literatura com este objectivo, embora com diversas estruturas gerais, tem uma característica estrutural comum: a existência de, pelo menos, um grupo nitroimidazol, sendo muito poucos os ligandos que não possuem uma unidade estrutural deste tipo. O estudo da marcação com Tecnécio-99m, de ligandos contendo um grupo nitroimidazol, foi iniciado devido à observação feita por Nakamura em 1955, de que a azomicina, um derivado do 5-nitroimidazol apresentava actividade contra alguns tipos de infecções associadas a condições com níveis baixos de oxigénio (Nakamura, 1955). Posteriormente, muitos outros análogos da azomicina têm sido sintetizados e têm encontrado aplicação como antibióticos, como por exemplo, o metronidazol, o tinidazol, o nimorazol e o ornidazol. Estes medicamentos são principalmente eficazes contra bactérias e protozoários que proliferam em ambientes hipóxicos. Foi este comportamento particular dos derivados do nitroimidazol, em ambientes com baixas concentrações de oxigénio, que levaram à investigação da sua aplicação na detecção de hipoxia, discussão que apesar de decorrer há mais de vinte anos, apenas tem aplicações práticas mais recentes (Raju *et al.*, 1992; Nunn *et al.*, 1995;).

A maioria das classes de organismos, como bactérias, fungos, protozoários, plantas e mamíferos pode metabolizar compostos nitro-aromáticos por meio de nitro-redutases, enzimas que reduzem grupos nitro. Este metabolismo, que ocorre nas células, é dependente de oxigénio e ocorre como uma série de reduções. Num meio rico em oxigénio, os intermediários formados reagem prontamente com este, revertendo a transformação para formar o nitroimidazol inicial. Num meio deficiente em oxigénio o processo de oxidação é menos favorável e o composto permanece mais tempo na forma reduzida (-NH<sub>2</sub>). Vemos assim que na forma de nitroimidazol o complexo sai prontamente da célula, enquanto na forma reduzida

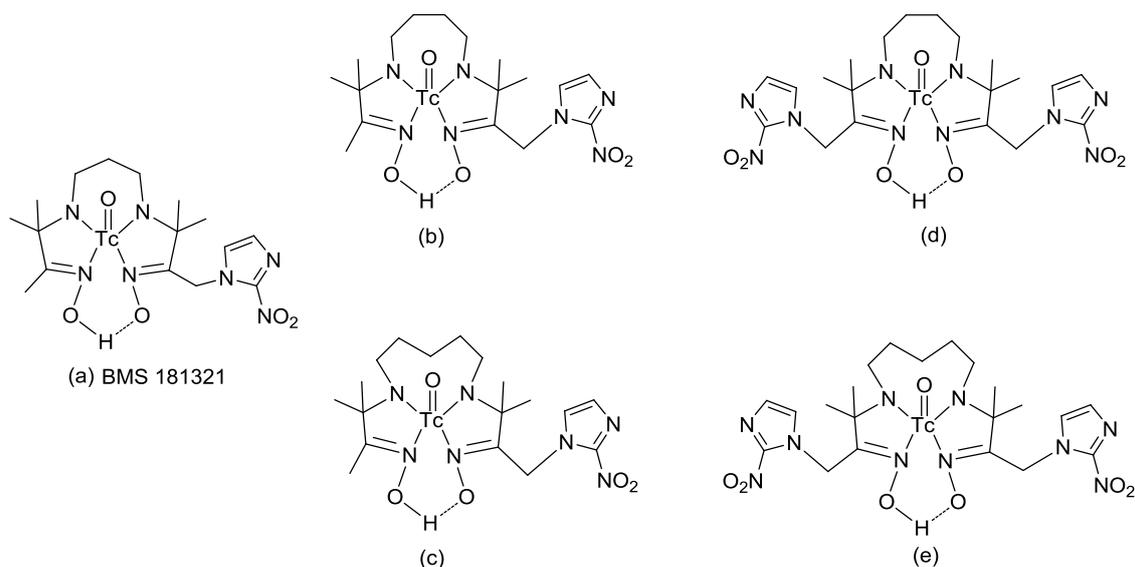
há uma maior afinidade entre o complexo e o interior da célula. É esta característica que determina um bom detector de hipoxia: permanecer mais tempo no interior da célula hipóxica, permitindo a sua localização (Nunn *et al.*, 1995; Hodgkiss, 1998; Rauth *et al.*, 1998; Takei *et al.*, 2004; Krohn *et al.*, 2008).

Os primeiros ligandos marcados com  $^{99m}\text{Tc}$  descritos na literatura e que foram testados para a detecção de hipoxia foram uma série de estruturas designadas como BATOs, figura 12 (Nunn *et al.*, 1987; Narra *et al.*, 1989; Treher *et al.*, 1989; Raju *et al.*, 1992; Linder *et al.*, 1993). Estes complexos foram ensaiados como agentes de imagem para isquémia do miocárdio, tendo apresentado boas características de biodistribuição, nomeadamente, excreção gastrointestinal e rápida eliminação do sangue (Chapman, 1979; Narra *et al.*, 1989).



**Figura 12**– Estrutura química do radiofármaco do tipo BATO.

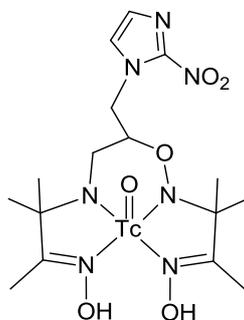
O primeiro composto que apresentou resultados verdadeiramente promissores para a detecção da hipoxia foi o BMS-181321, um complexo de uma diaminodioxima derivada da propilenodiamina contendo um grupo nitroimidazol com Tecnécio-99m, figura 13. (Linder *et al.*, 1994; Nunn *et al.*, 1995; Ballinger, 2001). Tanto em estudos *in vitro*, em que demonstrou uma captação elevada pelas células hipóxicas, como em estudos *in vivo*, em que se revelou uma eliminação lenta do sangue e uma excreção predominantemente pela via gastrointestinal, este radiofármaco mostrou ter boas características para um detector de hipoxia (Nunn *et al.*, 1995; Ballinger, 2001;)



**Figura 13** - Estrutura química das diaminodioximas contendo um ou mais grupos nitroimidazol: a) BMS181321 b) e c) derivados do 1,4-diaminobutano; d) e e) derivados do 1,5-diaminopentano.

Outros análogos deste, mostrados na figura 13 (b)-(e), foram também sintetizados e os seus complexos testados como detectores de hipoxia (Linder *et al.*, 1994; Ramalingam *et al.*, 1995), tendo demonstrado possuir elevadas razões hipoxia/normoxia em estudos de captação *in vitro* (Archer *et al.*, 1999; Linder *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2012).

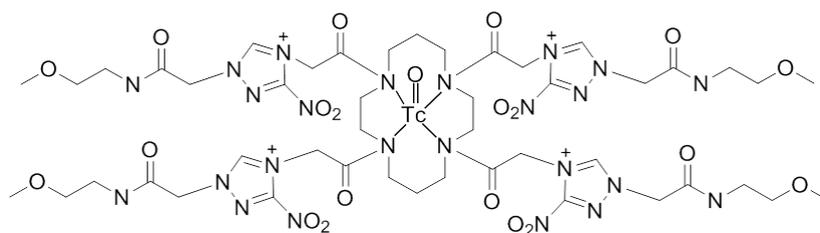
O BRU59-21 (anteriormente conhecido como BMS 194796) é um complexo de Tecnécio-99m de um derivado da oxopropilendiamina possuindo um grupo nitroimidazol como representado na figura 14. Este radiofármaco tem sido objecto de estudo intenso (Ramalingam *et al.*, 1994, 1995).



**Figura 14** - Estrutura do radiofármaco BRU 59-21

Com estrutura muito semelhante à dos anteriormente referidos, (Ramalingam *et al.*, 1994, 1995), o BRU59-21, radiofármaco de segunda geração, foi utilizado para avaliação de isquemia do miocárdio, tendo demonstrando uma elevada captação selectiva pelas células hipóxicas em estudos *in vitro*. O mecanismo implícito parece ser a difusão passiva. No que diz respeito a estudos *in vivo*, este radiofármaco mostrou rápida eliminação sanguínea e uma excreção predominantemente hepatobiliar, com apenas 10% do composto a ser eliminado por via urinária. Devido ao seu elevado coeficiente de partição, a captação de BRU59-21 é elevada. Em ratos com xenotransplantes, este marcador de hipoxia demonstrou razões tumor/músculo favoráveis (Melo *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2001). Estudos clínicos foram já realizados com este marcador, a fim de avaliar a detecção de hipoxia tumoral em doentes com cancro da cabeça e pescoço (Hoebers *et al.*, 2002).

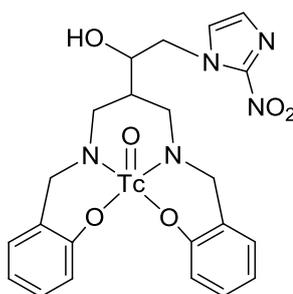
O cyclam AK 2123, outro ligando contendo o grupo nitroimidazol, figura 15, foi sintetizado, tendo o seu complexo de Tecnécio-99m sido submetido a testes pré-clínicos como marcador de hipoxia. Este complexo demonstrou possuir uma elevada razão tumor/músculo em diversos estudos. Os resultados positivos observados permitiram a sua utilização em ensaios clínicos de fase I para alguns tipos de cancro (Zhang *et al.*, 2001; Murugesan *et al.*, 2001; Liang & Sadler, 2004).



**Figura 15** - Estrutura química do radiofármaco  $^{99m}\text{Tc}$ -Cyclam AK 2123.

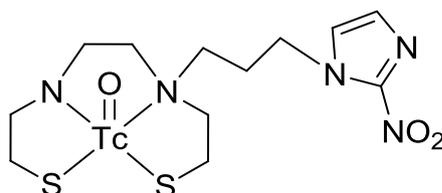
Adicionalmente, o AK 2123, por si só, pode ser usado como um radiosensibilizador (Murugesan *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001). Outros ligandos análogos ao cyclam AK 2123, com algumas variações estruturais, têm sido referidos na literatura mas, por enquanto, os resultados não são muito promissores (Riché *et al.*, 2001).

Complexos de tecnécio de ligandos do tipo salan têm também sido descritos como potenciais detectores hipoxia (Ramalingam *et al.*, 1994). O  $^{99m}\text{Tc}$ -BAPN é um exemplo desta classe de ligandos, com um grupo nitroimidazol como substituinte, figura 16.



**Figura 16** - Estrutura química do radiofármaco  $^{99m}\text{Tc}$ -BAPN.

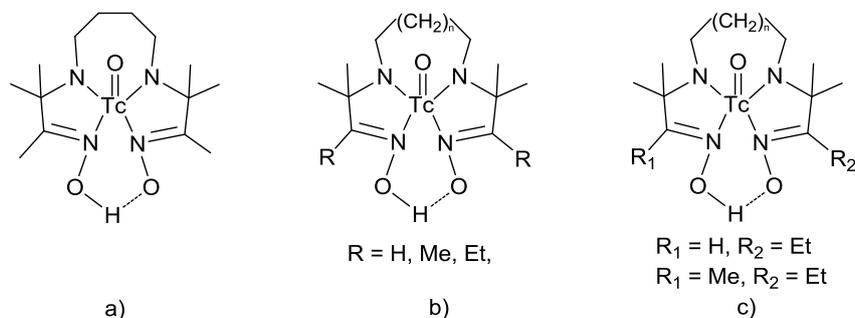
Outros complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  contendo enxofre têm sido apontados como potenciais marcadores de hipoxia (Jurisson & Lydon, 1999; Linder *et al.*, 2005). Um dos poucos avaliados em ensaios clínicos até agora foi o  $^{99m}\text{Tc}$ -NIM-BAT, representado na figura 17 (Bormans *et al.*, 2003).



**Figura 17** - Estrutura química do radiofármaco  $^{99m}\text{Tc}$ -NIM-BAT.

No decurso de estudos sobre a síntese e avaliação de complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  contendo grupos nitroimidazol como agentes eficientes para estudos de imagiologia para a detecção de hipoxia, foi constatado que algumas estruturas sem unidades estruturais do tipo nitroimidazol também podiam ser eficientes como detectores de hipoxia para imagiologia por SPECT. Assim, alguns complexos deste tipo, embora não muitos, têm sido apresentados na literatura recente. É possível

observar as estruturas químicas de alguns destes complexos na figura 18 (Sun *et al.*, 2010; Hsia *et al.*, 2010; Mirković *et al.*, 2012).



**Figura 18** – Esquema representativo da estrutura química do  $^{99m}\text{Tc}$ -HL-91 (a) e radiomarcadores de estrutura análoga, sem grupos nitroimidazol: b) exemplos de estruturas simétricas e c) exemplos de estruturas não-simétricas.

Desta série de ligandos, o  $^{99m}\text{Tc}$ -HL-91, também conhecido como  $^{99m}\text{Tc}$ -BnAO ou Prognox, tem sido o mais estudado (figura 18 - a)). Apesar deste ligando já ter sido sintetizado em 1984, foi só no início dos anos 90 que estudos realizados demonstraram a sua capacidade de detectar células em hipoxia, apesar de não conter na sua estrutura um grupo nitroimidazol. Este radiofármaco, assim como outros com estruturas semelhantes, (figura 18 - b), - c)), possuem características que permitem que sejam biorreduzidos no interior da célula, levando à sua retenção. Não é, até agora, conhecido o mecanismo pelo qual este tipo de radiotraçadores se mantém no interior das células hipóxicas (Abrantes *et al.*, 2009, 2010, 2012).



**Parte II**  
**Trabalho Experimental**



## CAPÍTULO IV

# CINÉTICA DE RADIOFÁRMACOS EM HIPOXIA



## Introdução

A imagem molecular do cancro, utilizando a Medicina Nuclear, tem o potencial de avaliar, de forma não invasiva, propriedades biológicas de um tumor, a fim de melhor adequar o tratamento e, assim, melhorar o prognóstico. Apesar da imagem anatómica convencional oferecer informações cruciais sobre as dimensões e localização do tumor, oferece muito pouco acerca do seu metabolismo. O metabolismo constitui um aspecto crucial do tumor, acrescentando uma dimensão funcional às diversas modalidades existentes. Esta informação metabólica adicional é cada vez mais importante podendo esclarecer acerca da agressividade do fenótipo e, até, o comportamento perante uma terapêutica instituída. Assim, neste capítulo é reportado o trabalho desenvolvido com os seguintes objectivos: o desenvolvimento de novos ligandos para marcação com radionuclídeos emissores de fóton único com características de traçadores de hipoxia em linhas celulares de cancro do cólon; a caracterização da cinética de captação dos melhores desenvolvidos, compará-la com a de  $^{18}\text{F}$ -FDG, e relacionar esta com algumas das características das linhas celulares do cancro do cólon utilizadas.

## Síntese e Marcação de Ligandos para Detecção de Hipoxia

### Material e Métodos

Estudos realizados por nós anteriormente, descrevem a síntese de uma diaminodioxima, o HL-91 (composto **3**), por reacção de 1,4-diaminobutano (composto **1**), com o 2-cloro-2-metil-3-nitrosobutano (composto **2**), representados na Figura 19 (Abrantes, 2008; Abrantes *et al.*, 2010; Abrantes *et al.*, 2012).

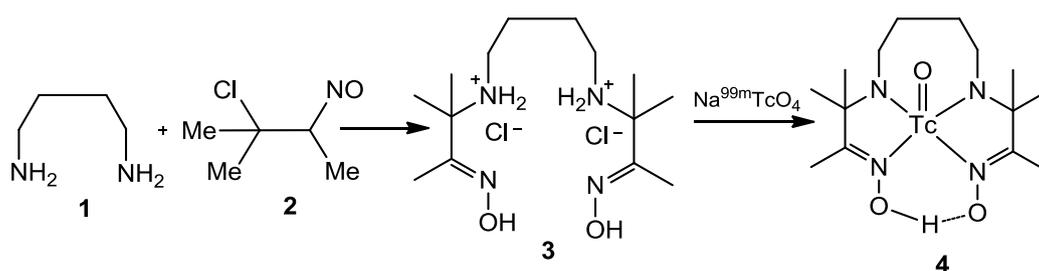
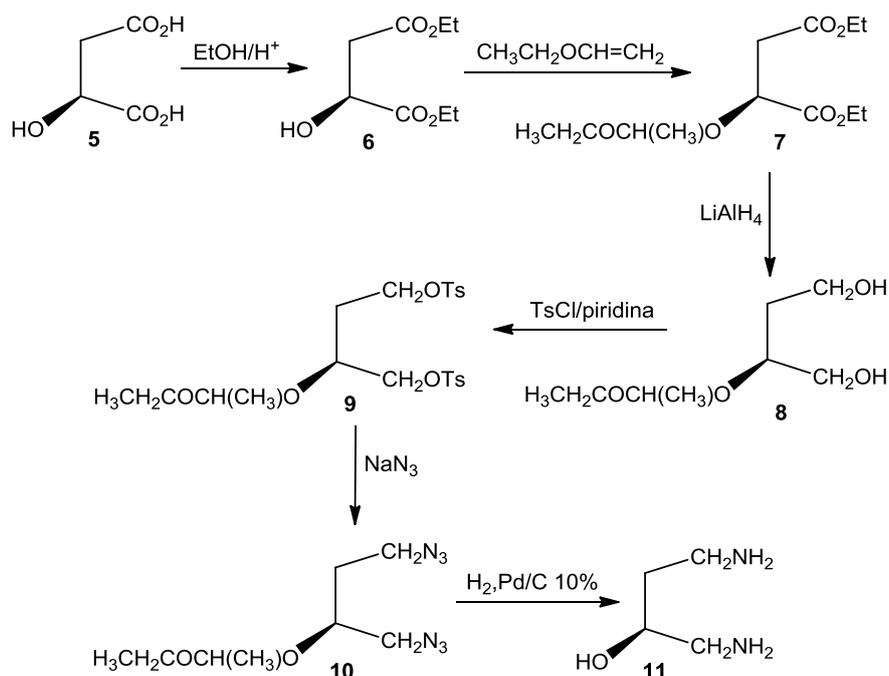


Figura 19 - Esquema representativo da síntese do radiofármaco  $^{99m}\text{Tc}$ -HL-91.

O complexo de tecnécio deste ligando, (Figura 19, composto **4**), que não possui grupos nitroimidazol na sua estrutura, foi estudado pelo nosso grupo de investigação quanto à sua capacidade de detectar hipóxia tumoral em células de cancro do cólon (Abrantes, 2008; Abrantes *et al.*, 2010; Abrantes *et al.*, 2012).

Na continuidade deste trabalho percebeu-se a necessidade de sintetizar novos ligandos, estruturalmente análogos ao HL-91, mas com características de lipofilicidade diferentes, na expectativa de que a percentagem de captação dos correspondentes complexos marcados com Tecnécio-99m pelas células em hipóxia pudesse melhorar. Assim, foram sintetizadas duas diaminas derivadas do ácido málico (composto **5**) e estruturalmente análogas ao 1,4-diaminobutano, mas com um grupo hidroxilo, -OH, e um grupo éter, -OR. A sequência sintética para obtenção da diamina hidroxilada (composto **11**) apresenta-se na Figura 20. O ácido málico

(composto **5**) é convertido no derivado **9** através de um procedimento previamente descrito (Gonsalves *et al.*, 2006).



**Figura 20** – Sequência sintética para a diamina **11** derivada do ácido málico.

O primeiro passo consiste na esterificação do ácido málico em refluxo de etanol, na presença de ácido sulfúrico, durante 5 h em atmosfera inerte, obtendo-se o produto com rendimento de 75 %. Seguidamente efectuou-se a protecção do grupo hidroxilo do diéster (composto **6**) com ácido trifluoroacético e éter etílico e vinílico como solvente e reagente, à temperatura ambiente durante 48 h. Obteve-se o produto pretendido, (composto **7**), com rendimento de 94 %, na forma de uma mistura de diastereoisómeros. O diol (composto **8**) foi obtido com rendimento de 91 % por redução do diéster (composto **7**), com hidreto de alumínio e lítio em éter etílico seco, à temperatura ambiente, durante 20 h (Hungerbuhler *et al.*, 1980; Nagel & Nedden, 1997; Gonsalves *et al.*, 2006).

Para obtenção do composto ditosilado (composto **9**), fez-se reagir o composto **8** com cloreto de tosilo e piridina, em diclorometano, à temperatura

ambiente durante 20 h (Gonsalves *et al.*, 2006; Nagel & Nedden, 1997) tendo-se obtido o produto com um rendimento de 90 %.

A diazida (composto **10**) foi obtida por reacção do composto **9** com azida de sódio em DMF (N,N-dimetilformamida) durante 18 horas a 90°C. Seguidamente, por hidrogenólise deste produto com hidrogénio molecular (1 atm) utilizando um suporte de carvão activado com 10% de paládio (Pd/C), à temperatura ambiente durante uma noite, obteve-se a diamina (composto **11**) com um rendimento de 94 %, tendo ocorrido simultaneamente a desprotecção do grupo hidroxilo. Todos os intermediários (compostos **6-11**) desta sequência sintética foram caracterizados pelos métodos habituais, estando em concordância com a literatura (Gonsalves *et al.*, 2006).

A diamina derivada do ácido málico possui um grupo éter, (composto **16**), e foi sintetizada através de uma sequência sintética idêntica à anterior, figura 21, com excepção do segundo passo, que envolve a protecção do grupo hidroxilo com metoximetano em vez de éter etílico e vinílico.

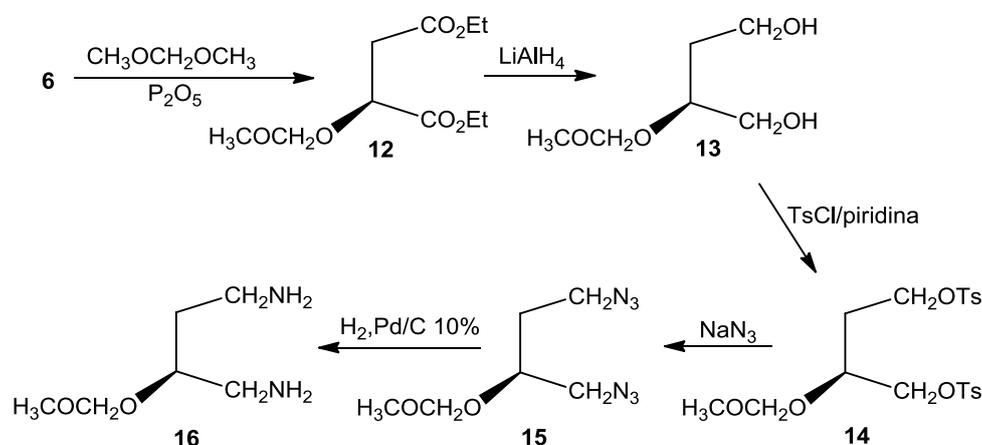


Figura 21 – Sequência sintética para a diamina **16** derivada do ácido málico.

Assim, após a obtenção do composto **6** como anteriormente descrito, procedeu-se à protecção do grupo hidroxilo. A 140 mL de dimetoximetano adicionou-se o composto **6** (57 mmol) e a 0°C adicionou-se, a intervalos e durante cerca de 1 hora, 20,1 g de pentóxido de fósforo ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ). A reacção ficou com

agitação em atmosfera inerte durante 48 horas. Após adição lenta de uma solução saturada de bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) extraiu-se o produto com água/diclorometano e secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro. Filtrou-se a solução e evaporou-se o solvente para obter o composto **12**, um óleo, com rendimento de 95 %. A análise por ressonância magnética nuclear protónica em clorofórmio deuterado apresentou os seguintes sinais: 1,27 (t, 3H,  $J_{7,2}$ ); 1,29 (t, 3H,  $J_{7,2}$ ); 2,79-2,81 (m, 2H); 3,39 (s, 3H); 4,17 (q, 2H,  $J_{7,2}$ ); 4,22 (q, 2H,  $J_{7,2}$ ); 4,54 (aprox. t, 1H,  $J_{6,4}$ ); 4,71 (d, 1H, *sist. AB*,  $J_{7,0}$ ); 4,76 (d, 1H, *sist. AB*,  $J_{7,0}$ ).

Para a síntese do diol (composto **13**), adicionaram-se lentamente a 91 mL de éter etílico seco a  $-10\text{ }^\circ\text{C}$  e em atmosfera inerte, 87 mmol de hidreto de alumínio e lítio ( $\text{LiAlH}_4$ ). A esta suspensão em agitação, adicionou-se, gota-a-gota, uma solução de 54 mmol do composto **12** em 33 mL de éter etílico. A reacção permaneceu em agitação à temperatura ambiente durante 20 horas. Adicionou-se, em seguida, acetato de etilo lentamente, até reagir todo o excesso de hidreto de alumínio e lítio ( $\text{LiAlH}_4$ ), seguido de adição lenta e sucessiva de 3,3 mL de água, 3,3 mL de NaOH a 15 % e mais 9,9 mL de água. Após agitação durante 15 minutos, a mistura foi filtrada com celite e os resíduos refluxados em diclorometano durante 1 hora. As fases orgânicas foram secas com sulfato de sódio anidro, filtradas e evaporadas a pressão reduzida para dar um óleo, o composto **13**, com rendimento de 48 %. A análise por ressonância magnética nuclear protónica em clorofórmio deuterado apresentou os seguintes sinais: 1,75-1,84 (m, 2H); 3,39-3,41 (m, 1H); 3,42 (s, 3H); 3,56-3,66 (m, 2H); 3,74-3,81 (m, 2H); 4,71(d, 1H, *sist. AB*,  $J_{5,6}$ ); 4,74 (d, 1H, *sist. AB*,  $J_{5,6}$ ).

Para a obtenção do composto **14**, adicionaram-se 25 mmol do composto **13** a uma mistura de 15 mL de piridina e 32 mL de diclorometano a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  e depois, lentamente, uma solução de 12,7 g de cloreto de tosilo em 32 mL de diclorometano, em atmosfera inerte. Deixou-se a reacção em agitação à temperatura ambiente durante 20 horas. Seguidamente, a  $0\text{ }^\circ\text{C}$ , adicionou-se lentamente uma mistura de 4,4 mL de água e 67 mL de diclorometano. Verteu-se a reacção sobre uma mistura de 23 g de gelo e 8,2 mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado, separou-se a fase aquosa e extraiu-se duas vezes com 20 mL de diclorometano. Os extratos orgânicos combinados foram lavados com solução saturada de  $\text{NaHCO}_3$ , água e secos com sulfato de sódio anidro e vestígios de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). A filtração e a evaporação do solvente a pressão reduzida deu origem ao produto **14**, com rendimento de 90 %, que foi utilizado directamente no passo seguinte para a formação da diazida. Assim, dissolveram-se 22,5 mmol do composto **14** em 100 mL

de DMF seco, adicionaram-se 5,85 g de azida de sódio ( $\text{NaN}_3$ ) e aqueceu-se a reacção a  $90\text{ }^\circ\text{C}$  em atmosfera inerte durante 18 horas. Após a evaporação do DMF, a pressão reduzida, adicionou-se ao resíduo água e éter etílico. A fase aquosa foi extraída duas vezes com éter etílico e as fases orgânicas combinadas foram secas com sulfato de magnésio anidro. Após filtrar e evaporar o solvente a pressão reduzida, o composto obtido foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica e como eluente uma mistura de acetato de etilo e de hexano na razão de 1:3. A diazida (composto **15**) foi obtida na forma de óleo com rendimento de 74 %. A análise por ressonância magnética nuclear protónica em clorofórmio deuterado apresentou os seguintes sinais: 1,64-1,92 (m, 2H); 3,32 (dd, 1H,  $J_{5,2}$ ; 12,8); 3,43 (s, 3H); 3,44-3,46 (m, 2H); 3,47 (dd, 1H,  $J_{4,4}$ ; 12,8); 3,79-3,84 (m, 1H); 4,69 (d, 1H, *sist. AB*,  $J_{7,0}$ ); 4,75 (d, 1H, *sist. AB*,  $J_{7,0}$ ). Relativamente ao espectro de infravermelho este apresentou uma banda a  $2100\text{ cm}^{-1}$  característica do grupo azida.

No último passo desta sequência sintética, 16,6 mmol do composto **15** foram submetidos a hidrogenólise, com hidrogénio molecular (1 atm) e 0,4 g de Pd/C, 10 % em 25 mL de etanol seco, durante uma noite. O catalisador foi filtrado com celite e o solvente evaporado a pressão reduzida, obtendo-se assim um óleo, a diamina (composto **16**), com rendimento de 94 %. A análise por ressonância magnética nuclear protónica em clorofórmio deuterado apresentou os seguintes sinais: 1,54 (sl, 4H); 1,57-1,67 (m, 2H); 2,63 (dd, 1H,  $J_{5,6}$ ; 13,4); 2,70-2,73 (m, 2H); 2,74 (dd, 1H,  $J_{4,4}$ ; 13,4); 3,32 (s, 3H); 3,51-3,59 (m, 1H); 4,59 (d, 1H, *sist. AB*,  $J_{6,8}$ ); 4,63 (d, 1H, *sist. AB*,  $J_{6,8}$ ). O espectro de infravermelho este apresentou as seguintes bandas: 3376; 1580; 1484; 1321; 1145;  $1033\text{ cm}^{-1}$ .

Para a síntese das diaminodioximas (compostos **17** e **18**), figura 22, foi seguido o procedimento utilizado por nós anteriormente na síntese do HL-91, figura 19, consistindo na reacção da diamina com o 2-cloro-2-metil-3-nitrosobutano (composto **2**).

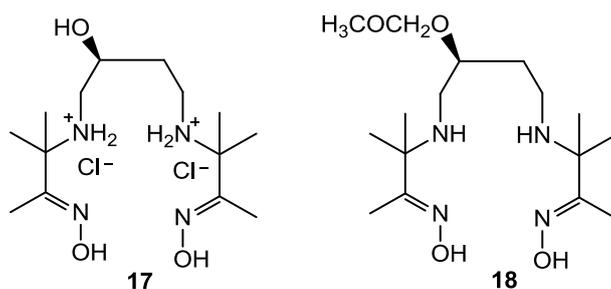


Figura 22 - Estruturas das novas diaminodioximas (compostos **17** e **18**).

Não estando este reagente disponível comercialmente, foi necessário proceder à sua síntese de acordo com o esquema representado na figura 23 (Nowotnik, 1989).

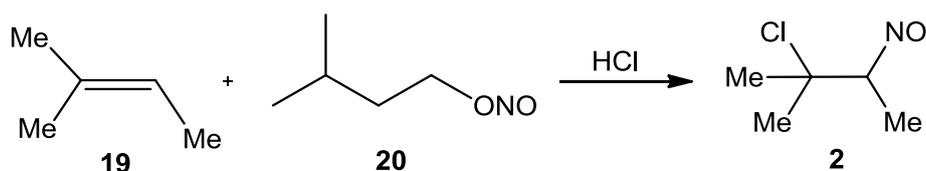


Figura 23 – Esquema representativo da síntese do composto cloronitroso **2**.

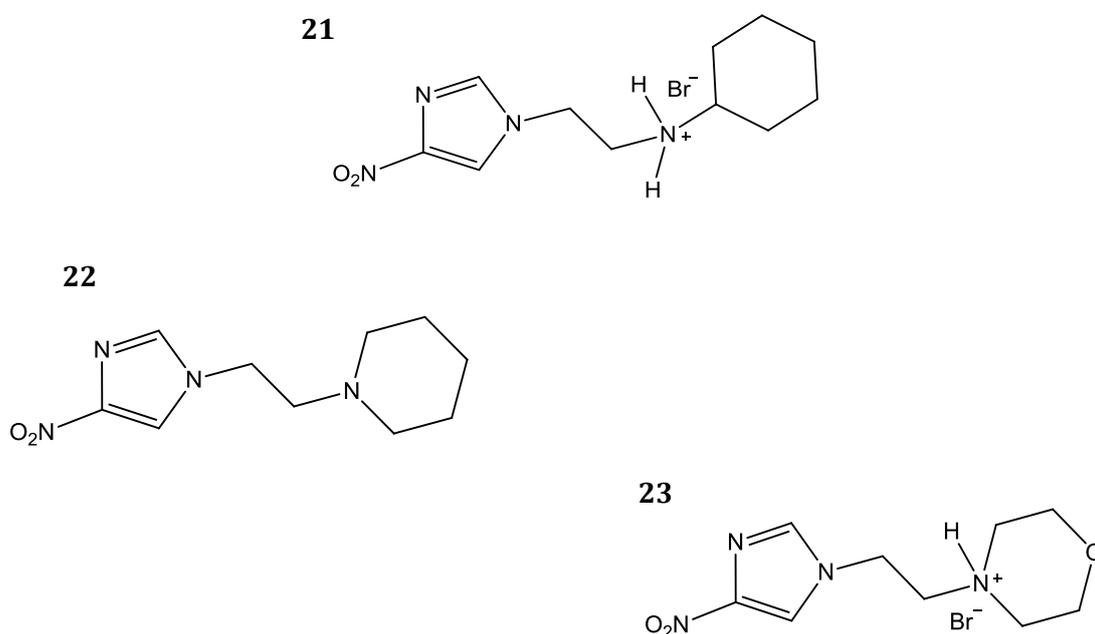
A uma mistura de 0,1 mol de 2-metil-2-buteno (composto **19**) e 0,1 mol do composto **20** a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  adicionaram-se, com uma bomba de injeção, 10 mL de HCl concentrado, a uma velocidade de 0,05 mL/min. Após a adição, a reação permaneceu sob agitação durante 2 horas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Filtrou-se o produto sólido **2** (2-cloro-2-metil-3-nitrosobutano) e lavou-se com metanol seco. Após colocação da solução no frio, foi possível fazer pelo menos mais uma recolha de sólido. Os sólidos combinados foram secos num exsiccador devidamente isolado a baixa temperatura, obtendo-se o composto **2** com rendimento de 77 %. O ponto de fusão calculado foi entre  $72\text{-}73\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A análise por ressonância magnética nuclear protónica em clorofórmio deuterado apresentou os seguintes sinais: 1,48-1,50 (d, 3H); 1,65 (s, 3H); 1,68 (s, 3H); 5,93-5,98 (q, 1H,  $J_{6,8}$ ).

Para obter a nova diaminodioxima (composto **17**), dissolveram-se 4 mmol de composto **2** em 5 mL de acetonitrilo. Seguidamente e mantendo em agitação, a  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ , adicionou-se gota a gota uma solução de 2 mmol do composto **11** em 5 mL de acetonitrilo. No final da adição a mistura foi agitada à temperatura ambiente durante uma noite. O sólido resultante foi filtrado e seco com bomba de vácuo, e obteve-se o composto **17**, um sólido branco, com rendimento de 26 %. A análise por ressonância magnética nuclear protónica em dimetilsulfóxido (DMSO) deuterado apresentou os seguintes sinais: 1,49 (s, 12H); 1,87 (s, 6H); 2,60-2,79 (m, 2H); 2,78-2,98 (m, 4H); 3,94 (m, 1H); 5,63 (sl, 1H); 11,27 (s, 2H).

O modo de preparação do composto **18** é análogo ao do composto **17**. Para o isolamento, o acetonitrilo foi evaporado, obtendo-se um sólido branco, que foi

seco a pressão reduzida para dar o produto com rendimento de 73 %. A análise por ressonância magnética nuclear protônica em dimetilsulfóxido (DMSO) deuterado apresentou os seguintes sinais: 1,49 (s, 12H); 1,87 (s, 6H); 2,70-3,00 (m, 6H); 3,31 (s, 3H); 3,82-3,99 (m, 1H); 4,64-4,76 (m, 2H); 11,30 (s, 1H); 11,31 (s, 1H).

O segundo conjunto de ligandos, os compostos **21-23** representados na figura 24, que foram sintetizados e utilizados neste trabalho como detectores de hipóxia *in vivo* na forma de complexos de  $^{99m}\text{Tc}$ , têm algumas semelhanças estruturais com o misonidazol e seus derivados tais como o FMISO, o radiotraçador mais utilizado para detecção de hipóxia por tomografia por emissão de positrões (PET) (Rajendran *et al.*, 2004; Abrantes, *et al.*, 2009; Imam, 2010; Carlin & Humm, 2012;). Este tipo de ligandos tem apresentado bons resultados em estudos de imagiologia por PET. Os resultados obtidos com estes ligandos levaram-nos a ponderar a possibilidade de algumas estruturas semelhantes, quando complexados com o  $^{99m}\text{Tc}$ , poderem ser eficientes na detecção de hipóxia em estudos de imagiologia por SPECT.



**Figura 24** –Novos ligandos sintetizados, derivados do nitroimidazol.

Os ligandos derivados do 4-nitroimidazol (compostos **21-23**) foram obtidos através de uma sequência sintética simples de dois passos, figura 25. O precursor comum dos três ligandos sintetizados, o 1-(2-bromoetil)-4-nitroimidazol (composto **26**), resultou da reação de 25 mmol de 4-nitroimidazol (composto **24**) com 100 mmol de 1,2-dibromoetano (composto **25**) na presença de 100 mmol de carbonato de potássio e vestígios de iodeto de sódio (NaI), em refluxo de acetona (25 mL) durante cerca de 24 h. O controlo foi efectuado por cromatografia de camada fina usando como eluente uma solução de acetato de etilo e hexano numa relação de 3:1. Após evaporação do solvente, o produto foi extraído com diclorometano/água e a fase orgânica seca com sulfato de sódio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) anidro. A solução foi filtrada, o solvente evaporado e o sólido resultante recristalizado em diclorometano/éter para dar o produto puro (composto **26**) com rendimento de 50%. A análise por ressonância magnética nuclear protónica em clorofórmio deuterado apresentou os seguintes sinais: 3,67 (t, 2H, J6,0); 4,46 (t, 2H, J6,0); 7,53 (s, 1H); 7,86 (s, 1H), enquanto que a ressonância magnética nuclear de carbono-13 apresentou os seguintes sinais: 29,62; 49,62; 119,08; 136,19; 148,43 (Anexo 2).

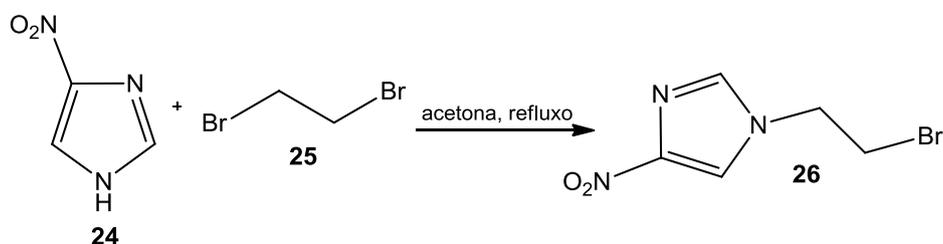


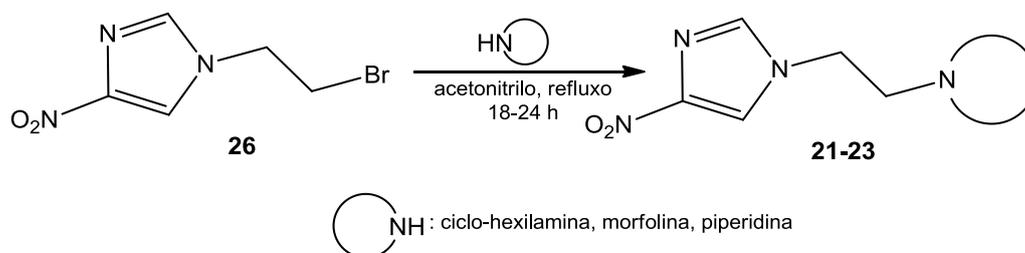
Figura 25 – Esquema da síntese do 1-(2-bromoetil)-4-nitroimidazol (composto **26**).

Os ligandos pretendidos foram sintetizados por reação do composto **26** com ciclo-hexilamina, morfolina e piperidina, figura 26. A reação de 2,5 mmol do composto **26** com 2,5 mmol de ciclo-hexilamina em refluxo de acetonitrilo (10 mL) durante 18-24 h, com controlo por cromatografia de camada fina usando como eluente uma solução de acetato de etilo/metanol/dietilamina, na razão 110:10:3, originou um sólido que precipitou do meio de reação, foi filtrado, lavado com acetona gelada e seco para dar o produto pretendido, hidrobrometo de

*N*-(2-(4-nitro-1H-imidazol-1-il)etil)ciclo-hexilamina, (composto **21**) com rendimento de 55 %.

A análise por ressonância magnética nuclear protônica em metanol deuterado apresentou os seguintes sinais: 1,14-1,29 (m, 1H); 1,30-1,47 (m, 4H); 1,63-1,77

(m, 1H); 1,78-1,97 (m, 2H); 2,06-2,25 (m, 2H); 3,15-3,25 (m, 1H); 3,61 (t, 2H, *J*6,2); 4,55 (t, 2H, *J*6,2); 7,90 (s, 1H); 8,32 (s, 1H) e o espectro de RMN de carbono-13 apresentou os seguintes sinais: 25,48; 26,02; 30,27; 45,36; 45,50; 59,47; 121,68; 138,74; 149,09 (Anexo 3).



**Figura 26** – Sequência sintética para os ligandos **21-23**.

De forma idêntica, mas utilizando morfolina (2,5 mmol) em vez de ciclo-hexilamina, obteve-se o hidrobrometo de *N*-(2-(4-nitro-1H-imidazol-1-il)etil)morfolina (composto **22**), com rendimento de 50%, que foi isolado por evaporação do solvente seguido de cromatografia em coluna usando como eluente uma solução de acetato de etilo/metanol/dietilamina, na razão de 110:10:3. A análise por ressonância magnética nuclear protônica em metanol deuterado apresentou os seguintes sinais: 2,40-2,66 (m, 4H); 2,75 (t, 2H, *J*5,8); 3,56-3,76 (m, 4H); 4,23 (t, 2H, *J*5,8); 7,78 (s, 1H); 8,20 (s, 1H) enquanto a ressonância magnética nuclear de carbono-13 revelou os seguintes sinais: 44,57; 52,98; 57,70; 66,41; 120,47; 137,10; 146,87 (Anexo 4). A espectrometria de massa de alta resolução do composto  $C_9H_{15}BrN_4O_3$  apresentou um valor de  $[M-Br]^+$  227.1142, sendo o valor teórico de  $[M]^+$  306.0328.

O derivado da piperidina, *N*-(2-(4-nitro-1H-imidazol-1-il)etil)piperidina (composto **23**), foi obtido de forma semelhante, utilizando piperidina (2,5 mmol) e

carbonato de sódio (2,5mmol). O isolamento do produto foi feito por evaporação do solvente seguido de extracção com diclorometano/água, secagem com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtração e evaporação do solvente. Após cromatografia em coluna com o eluente acetato de etilo/metanol/dietilamina, na razão 110:10:3, obteve-se o produto com rendimento de 67 %. A análise por ressonância magnética nuclear protónica em metanol deuterado apresentou os seguintes sinais: 1,44-1,48 (m, 2H); 1,54-1,61 (m, 4H); 2,42 (sl, 4H); 2,66 (t, 2H, J<sub>5,8</sub>); 4,05 (t, 2H, J<sub>5,8</sub>); 7,51 (s, 1H); 7,89 (s, 1H) enquanto o espectro de ressonância magnética nuclear de carbono-13 apresentou os sinais: 24,09; 25,98; 30,27; 45,85; 54,61; 58,61; 119,89; 136,33 (Anexo 5). A espectrometria de massa de alta resolução do composto C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> apresentou um valor de [MH]<sup>+</sup> 225.1346 para um valor teórico de [M]<sup>+</sup> 224.1273.

As diferentes abordagens de marcação dos derivados de nitroimidazol com radionuclídeos consistem na incorporação directa de um átomo de halogéneo radioactivo na molécula ou, alternativamente, o seu acoplamento a um agente quelante bifuncional adequado. A incorporação directa de radionuclídeos tem sido explorada extensivamente nos últimos anos, resultando no desenvolvimento de grande número dos traçadores disponíveis, entre eles o <sup>14</sup>C-misonidazol, o <sup>3</sup>H-misonidazol, o <sup>82</sup>Br-misonidazol, o <sup>123</sup>I-vinilmisonidazol, <sup>18</sup>F-misonidazol, o <sup>123</sup>I-azomicina-ribosideo e o <sup>123</sup>I-azomicina-arabinosídeo (Grunbaum *et al.*, 1987; Nunn *et al.*, 1995; Chapman *et al.*, 1998; Serganova *et al.*, 2006; Krohn *et al.*, 2008;).

No entanto, todos estes traçadores possuem características pouco favoráveis à sua utilização na prática clínica. A justificação encontra-se no radionuclídeo usado na marcação do fármaco, tipo de radiação emitida, o período de semi-desintegração ou os custos de produção. Desta forma, surgiu a necessidade de desenvolvimento de radiofármacos marcados com emissores de fóton único como o BMS181321 e o BRU59-21 (Das *et al.*, 2003).

Neste trabalho, pretendemos desenvolver radiofármacos com características físico-químicas favoráveis, baixo custo e capazes de serem marcados com o Tecnécio-99m (<sup>99m</sup>Tc), o radionuclídeo mais utilizado em Medicina Nuclear para imagem por emissão de fóton único. A marcação radioactiva consistiu na complexação do ligando, princípio activo, com o <sup>99m</sup>Tc, no estado de oxidação apropriado, permitindo assim a obtenção de informação funcional relevante que pode ser utilizada para o diagnóstico, para avaliar a evolução e por conseguinte, para estadiamento/re-estadiamento.

Os ligandos do tipo diaminadioxima foram marcados com <sup>99m</sup>Tc, sob a forma

de pertecnetato de sódio ( $^{99m}\text{TcO}_4\text{Na}$ ), com o  $^{99m}\text{Tc}$  no estado de oxidação +7. A redução do metal a um estado de oxidação mais baixo, para permitir a complexação com os ligandos e formação dos radiofármacos, foi feita com cloreto estanhoso di-hidratado ( $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) como agente redutor (Sharp *et al.*, 2005). O complexo é formado por coordenação do metal aos quatro átomos de azoto da diaminodioxima, figura 27.

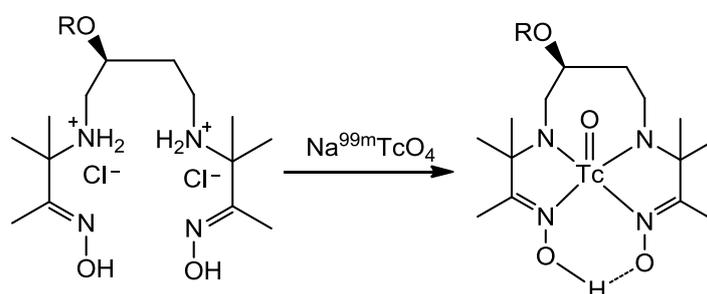
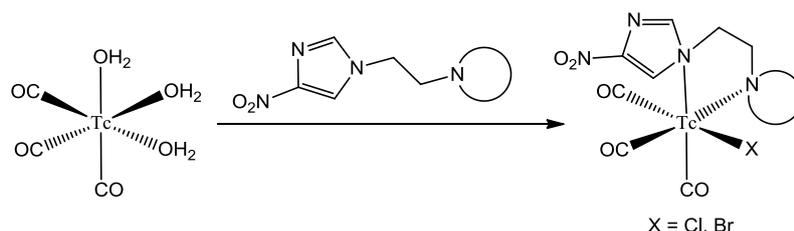


Figura 27 – Formação de complexos com  $^{99m}\text{TcO}_4\text{Na}$  e diaminodioximas.

O trabalho desenvolvido por Alberto *et al* (Alberto *et al.*, 1994, Alberto *et al.*, 1998;) apresentou a alternativa de utilizar o Tecnécio-99m tricarbonilo [ $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3$ ] $^+$ , como precursor do radiofármaco em vez do pertecnetato de sódio. Esta alternativa foi simplificada pela existência comercial de um *kit* comercial, o Isolink<sup>TM</sup> (Covidien, EUA), que permitiu uma preparação segura e reprodutível.

Na presença dos ligandos apropriados, preferencialmente tridentados ou bidentados, ocorre complexação com o  $^{99m}\text{Tc}$  por deslocação das moléculas de água, do que resulta o radiofármaco. No caso de se tratar de um ligando bidentado, a terceira molécula de água poderá ser substituída por um halogénio do meio, figura 28.



**Figura 28** – Formação de complexos com  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$  e ligandos derivados do 4-nitroimidazol.

O procedimento para a marcação dos ligandos por nós desenvolvidos consistiu na utilização de uma quantidade específica (número de moles) de ligando à qual se adicionaram cerca de 555 MBq de  $^{99m}\text{Tc}$ . Para ocorrer a radiomarkação do ligando foi necessário um aquecimento a 100 °C durante 10 minutos. Os radiofármacos assim obtidos foram sujeitos a testes de controlo de qualidade, que incluíram a determinação da pureza radioquímica por microcromatografia ascendente em camada fina.

A microcromatografia ascendente em camada fina, técnica comumente utilizada para a determinação da pureza radioquímica de complexos de  $^{99m}\text{Tc}$ , é um método de separação molecular e físico, em que a fase móvel (solvente) se desloca ao longo de uma fase estacionária (adsorvente). Dependendo das diferentes afinidades entre a amostra e as fases estacionária e móvel, os componentes da amostra migram de modo diferente na fase estacionária. Este efeito, simultaneamente, com as diferentes solubilidades de cada espécie radioquímica na fase móvel, provoca uma diferença nas velocidades de cada espécie a separar (Digenis, 1992). No caso das marcações com  $^{99m}\text{Tc}$ , os principais contaminantes radioquímicos são o pertecnetato de sódio livre e as formas coloidais resultantes da hidrólise do pertecnetato, que são complexos de Tecnécio- $^{99m}$  reduzido-hidrolizado não ligado. Deste modo, a pureza radioquímica de um complexo de  $^{99m}\text{Tc}$  é expressa em percentagem de actividade presente na forma química desejada relativamente à radioactividade total. No caso presente, para os radioligandos desenvolvidos, foi otimizado o sistema de microcromatografia, envolvendo a utilização de diferentes fases móveis e fases estacionárias.

No desenvolvimento deste trabalho foram testadas diferentes fases móveis e diferentes fases estacionárias. Constituindo os radiofármacos desenvolvidos novas entidades, as condições tiveram que ser desenvolvidas e, posteriormente,

otimizadas. Desta forma, para a fase móvel foram estudados solventes como o soro fisiológico, a acetona, o metanol e muitas vezes misturas com diferentes percentagens destes solventes. Relativamente à fase estacionária, também diferentes tipos de suportes foram experimentados como o papel Whatman nº1, o ITLC-SG, o papel Whatman 3MM, o papel de cromatografia 31ET e a poliamida-6.

Com o objectivo de determinar a lipofilicidade dos radiofármacos que apresentaram elevada eficiência de marcação, procedeu-se à determinação dos seus coeficientes de partição *n*-octanol/água. Assim, no mesmo tubo foram colocados 3 mL de soro fisiológico, 3 mL de *n*-octanol e 3,7 MBq do radiofármaco. Após agitação vigorosa da mistura durante 5 minutos retiraram-se duas amostras de 100 µL de cada fase distinta, *n*-octanol e soro fisiológico. As contagens radioactivas de cada fase foram medidas utilizando um contador de poço (DPC-C12). Para o cálculo do coeficiente de partição utilizou-se a equação 1.

$$\text{Coeficiente de partição} = \log \left( \frac{\text{contagens } n - \text{octanol}}{\text{contagens água}} \right) \quad (1)$$

## Resultados

Após a síntese dos ligandos **17**, **18**, **21**, **22** e **23**, procedeu-se à sua marcação radioactiva e respectivo controlo de qualidade. Pela semelhança estrutural entre os complexos dos ligandos **17** e **18** e o complexo  $^{99m}\text{Tc-HL-91}$ , já anteriormente sintetizado e marcado, foram adotados para o controlo de qualidade os dois sistemas microcromatográficos já utilizados nesses estudos (Abrantes *et al.*, 2010). Para quantificar a presença de  $^{99m}\text{Tc}$ -reduzido-hidrolizado não ligado foram utilizadas, como fase estacionária, tiras de 10 cm de comprimento e 1 cm de largura de papel de cromatografia Whatman nº1 (Whatman Chromatography Products) e, para fase móvel, uma solução aquosa de acetoneitrilo p.a. Merck a 50%. Para quantificar a presença de pertecnetato livre ( $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ) foram utilizadas como fase estacionária, tiras de gel de sílica (ITLC-SG - Instant Thin Layer Chromatography Silica Gel, Pall Corporation) com as mesmas dimensões das anteriores e, como fase móvel, cloreto de sódio 0,9 % (Hung *et al.*, 2002). No primeiro sistema microcromatográfico acima referido, o  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  e os complexos

marcados migram com a frente do solvente enquanto que o  $^{99m}\text{Tc}$ -reduzido-hidrolizado não ligado permanece na origem. No segundo sistema o  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  separa-se dos restantes componentes acompanhando a frente do solvente, enquanto que os complexos marcados e o  $^{99m}\text{Tc}$ -reduzido-hidrolizado não ligado permanecem na origem. Os resultados obtidos para eficiência de marcação destes dois complexos, **17** e **18**, nunca foram superiores a 60%.

Relativamente aos complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  obtidos a partir dos ligandos **21-23**, e de acordo com a literatura consultada, o controlo de qualidade adoptado consistiu na utilização de tiras de poliamida-6 (Sigma) como fase estacionária, e o metanol como fase móvel (Wang *et al.*, 2002). Neste sistema, as espécies contaminantes como o  $^{99m}\text{Tc}$  livre, o  $^{99m}\text{Tc}$  reduzido-hidrolizado não ligado e o precursor  $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$  permanecem na origem, ou seja factor de retenção ( $R_f$ , do inglês, *retention factor*) é zero, enquanto que os complexos marcados com o tecnécio-99m migram com a frente de solvente, possuindo um  $R_f$  superior a 0,5. O controlo de qualidade destes complexos revelou uma pureza radioquímica de  $90,3 \pm 3,9$  %.

Tendo em conta os resultados do controlo de qualidade, os complexos que apresentaram melhores resultados foram os obtidos a partir dos ligandos **21** a **23**. Consequentemente, foram determinados os coeficientes de partição *n*-octanol/água dos referidos complexos para posteriores estudos *in vitro*. Estes resultados revelaram que o complexo com maior coeficiente *n*-octanol/água foi o  $^{99m}\text{Tc}$ -**21** ( $-0,15 \pm 0,05$ ), seguindo-se o  $^{99m}\text{Tc}$ -**22** ( $-0,82 \pm 0,06$ ) e, por fim, o  $^{99m}\text{Tc}$ -**23** ( $-0,94 \pm 0,06$ ).

## Discussão

Tendo em conta os resultados obtidos, nomeadamente as baixas eficiências de marcação dos ligandos **17** e **18**, somente os complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  ligandos **21-23**, com elevada eficiência de marcação, foram utilizados para os estudos de captação por células realizados em ambiente de hipoxia e normoxia.

A opção de realizar as experiências de marcação dos ligandos **17** e **18** com pertecnetato de sódio e cloreto estanhoso como agente redutor, prendeu-se com o facto de estes ligandos serem estruturalmente semelhantes ao HL-91, que foi marcado, com elevada eficiência, nas referidas condições. Neste processo forma-se

o complexo intermediário  $^{99m}\text{TcO}^{3+}$  com quatro locais de coordenação livres. Assim apesar de todos os ligandos referidos serem do tipo tetradentado, e supostamente coordenam com o  $^{99m}\text{TcO}^{3+}$ , na verdade mostraram-se instáveis e com eficiências de marcação baixas.

Os ligandos **21-23** foram marcados utilizando o *kit* comercial Isolink™ (Alberto *et al.*, 1994; Alberto *et al.*, 1998). Nestas condições forma-se o complexo  $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ , cujos três ligandos lábeis ( $\text{H}_2\text{O}$ ), podem ser substituídos por átomos dadores mais fortes. Assim, este tipo de complexos são apropriados para coordenação com os ligandos bidentados **21-23**.

Para os complexos  $^{99m}\text{Tc-21}$  a  $^{99m}\text{Tc-23}$ , que apresentaram as melhores eficiências de marcação, foram determinados os correspondentes coeficientes de partição *n*-octanol/água, um parâmetro que caracteriza cada complexo e que permite inferir acerca da sua lipofilicidade. A solubilidade relativa destes três complexos poderá ser explicada tendo em consideração as estruturas dos ligandos e dos respectivos complexos.

A presença de um átomo de oxigénio no ligando **23** poder-lhe-á conferir uma maior hidrofiliicidade relativamente aos ligandos **21** e **22**.

Os complexos dos ligandos bidentados **21** e **22**, por serem hidrobrometos de amónio, poderão dar origem a uma mistura de dois complexos muito semelhantes, com bromo ou cloro no terceiro local de coordenação, figura 28. Sendo o ligando **22** neutro, o seu complexo,  $^{99m}\text{Tc-23}$ , apenas pode incorporar cloro no terceiro local de coordenação.

Como consequência de todos estes factores, os complexos  $^{99m}\text{Tc-21}$  e  $^{99m}\text{Tc-22}$  possuem propriedades de menor hidrofiliicidade relativamente ao complexo  $^{99m}\text{Tc-23}$ .

## ***Cinética de Radiofármacos em Hipoxia***

Após a síntese e marcação radioactiva dos diferentes ligandos sintetizados para a detecção de hipoxia *in vivo*, só os que apresentaram os melhores valores de eficiência de marcação, os complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  **21**, **22** e **23**, foram utilizados nos estudos em linhas celulares de cancro de cólon. Para além destes radiofármacos também foi utilizado o  $^{18}\text{F}$ -FDG, como radiotraçador de referência, já que em condições de hipoxia nas células tumorais se verificam alterações no metabolismo glicolítico.

## **Material e Métodos**

Para a realização dos estudos *in vitro*, foram utilizadas linhas celulares de cancro do cólon (WiDr, LS1034 e C2BBE1) obtidas e certificadas pela American Type Culture Collection (ATCC).

A linha celular WiDr provém do cólon de uma doente de 78 anos com diagnóstico de carcinoma colorrectal. Esta linha celular apresenta uma morfologia epitelial e sabe-se que possui uma mutação ao nível do codão 273 do gene *TP53* que traduz na substituição do aminoácido arginina por histidina na proteína p53 (Garcia-Barreno *et al.*, 1992).

A linha celular LS1034 foi isolada do cego de uma doente caucasiana de 54 anos de idade. Tal como a linha celular WiDr possui uma mutação no gene *TP53*, mas neste caso na posição 245 que se traduz na substituição da glicina por serina. É também caracterizada por uma mutação no gene *APC*, para além da sobreexpressão de uma proteína de efluxo, a glicoproteína-P (Gp-P), associada à resistência a quimioterapia (Casalta-Lopes *et al.*, 2011; Suardet *et al.*, 1992).

A terceira linha celular utilizada na realização do trabalho experimental foi a linha celular C2BBE1, clone da linha celular Caco-2 obtida por diluição limitante. A última provém do cólon de um doente de 72 anos, caucasiano e com diagnóstico de carcinoma colorrectal. O clone foi seleccionado com base na homogeneidade morfológica e na localização apical exclusiva da proteína vilina (Basson *et al.*, 1992; Peterson & Mooseker, 1992).

Após a recepção, das linhas celulares, estas foram descongeladas e propagadas em culturas aderentes a 37 °C, em atmosfera de ar com 5 % de dióxido de carbono utilizando como meio de cultura o meio Dulbecco's Modified Eagle's

Medium (DMEM) (Sigma D-5648) para as linhas celulares WiDr e C2BBE1 e o meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) (Sigma R4130) para a linha celular LS1034. Aos dois meios utilizados foram adicionados, como suplementos, 400  $\mu\text{M}$  piruvato de sódio (Gibco - 11360), 10 % de soro bovino fetal (Sigma - F7524) e 1 % de antibiótico (100 U/mL de penicilina e 10  $\mu\text{g/mL}$  estreptomicina; Sigma A5955).

Para a realização das experiências todas as linhas celulares foram cultivadas em duas concentrações de glicose diferentes, a concentração de 5 mM denominada como baixa concentração e a concentração de 25 mM denominada como elevada concentração. Desta forma, aquando da preparação dos meios as massas de glicose foram ajustadas de forma a obter as concentrações pretendidas. Para além da diferente concentração de glicose no meio e, tendo em conta o objectivo do trabalho, as experiências foram realizadas em ambiente de normoxia (5 %  $\text{CO}_2$ ; 95 % ar) e de hipoxia (5 %  $\text{CO}_2$ ; 93 %  $\text{N}_2$ ; 2 %  $\text{O}_2$ ) com o auxílio de uma câmara de ambiente controlado (PlasLab, EUA).

Para a realização dos estudos de cinética, as células, foram sujeitas à acção da tripsina e preparadas de forma a obter uma suspensão celular de  $2 \times 10^6$  células/mL, em frascos de 25  $\text{cm}^2$ . Após a preparação das células seguiu-se um período de repouso de 45 minutos em condições de normoxia (5 %  $\text{CO}_2$  e 95 % ar). Terminado o repouso, as células permaneceram por um período de duas horas nas condições de realização da experiência, ou seja, em ambiente hipóxico ou normóxico, com o objectivo das células atingirem o estado de equilíbrio. Após este período, a cada frasco foi adicionada a atividade de 925 Bq/mL dos radiofármacos sintetizados para avaliação da hipoxia ou de  $^{18}\text{F}$ -FDG. Aos 5, 30, 60, 90 e 120 minutos após a adição do radiofármaco, foram retiradas alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  da suspensão celular para microtubos que continham solução gelada de tampão fosfato (PBS). De seguida, as amostras foram centrifugadas a 5600 g durante 60 segundos, para completa separação entre o *pellet* e o sobrenadante, tendo este sido colhido para um microtubo identificado. Seguiu-se uma lavagem do *pellet* com 500  $\mu\text{L}$  de PBS gelado, repetindo-se o procedimento de separação do sobrenadante. Os sobrenadantes resultantes das centrifugações foram recolhidos em tubos identificados e os *pellets* permaneceram nos respectivos microtubos igualmente identificados. O cálculo da percentagem de captação foi realizado de acordo com a equação 2.

$$\text{Percentagem de Captação (\%)} = \frac{CPM_{\text{pellet}}}{CPM_{\text{pellet+sobrenadante}}} * 100 \quad (2)$$

Após a colheita, para a determinação da percentagem de captação aos 120 minutos, recolheram-se 20 µL da suspensão celular, para a determinação da viabilidade das células, através do método de exclusão do azul tripano (Moldéus *et al.*, 1978).

Em relação aos compostos por nós desenvolvidos e marcados com  $^{99m}\text{Tc}$  e tendo em conta a sua estrutura, utilizou-se o pimonidazol, molécula derivada do imidazol, para melhor caracterizar o seu mecanismo de captação. Para isso, utilizaram-se células das três linhas celulares de cancro do cólon referidas anteriormente, e procedeu-se à quantificação de aductos proteicos com origem no pimonidazol, que se sabe ser reduzido no interior de células em condições de hipoxia (Chapman *et al.*, 2001; Varghese *et al.*, 1976).

De facto, Varghese *et al.* (1976) descreveram a existência, *in vitro* e *in vivo*, nas células em hipoxia através da marcação com carbono-14, de aductos formados a partir do misonidazol (Varghese *et al.*, 1976). Da mesma forma, Chapman *et al.* (2001) demonstraram a relação entre a captação do misonidazol e a baixa concentração intracelular de oxigénio, concluindo que este poderia ser um marcador de hipoxia (Chapman *et al.*, 2001; Varghese *et al.*, 1976). Com esta técnica, é possível, através de um anticorpo fluorescente, detectar os aductos proteicos resultantes da redução do 2-nitroimidazol. Assim sendo, as células que apresentem uma pressão parcial de oxigénio inferior a 10 mmHg a 37 °C apresentam uma intensidade de fluorescência proporcional ao seu estado de oxigenação.

Para a marcação, utilizaram-se  $10^6$  células, as quais foram permeabilizadas e fixadas com 100 µL de fixante de brefeldina (solução A), solução composta por PBS e paraformaldeído a 4 % (KIT FIX & PERM – Caltag Laboratories, INOPAT), durante 15 minutos no escuro, à temperatura ambiente. Após esta incubação, as células foram lavadas com FACSFlow® e de seguida adicionaram-se 2 µL de anticorpo Hypoxyprobe®-1 Mab1 (Chemicon, International) e 100 µL de solução B, constituída por PBS, 1% de FBS (do inglês, *fetal bovine serum* - FBS), 0,1% de azida de sódio e 0,1% de saponina (KIT FIX & PERM – Caltag Laboratories, INOPAT), permanecendo as células nesta solução durante 15 minutos, no escuro, à temperatura ambiente. Após a incubação, as células foram novamente lavadas com FACSFlow® e re-suspensas em 400 µL da mesma solução tampão. Posteriormente,

as células foram analisadas no citómetro (FACSCalibur - BectonDickinson, San Jose, CA) após a excitação com luz de comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 495 nm, por detecção da emissão de luz com comprimento de onda de 519 nm. Os resultados foram apresentados sob a forma da razão entre a média de intensidade de fluorescência (MIF) da condição da hipoxia relativamente à condição de normoxia.

Para avaliar a expressão membranar da glicoproteína-P,  $10^6$  células foram lavadas por centrifugação a 200g durante 5 minutos com PBS. Posteriormente decantou-se o sobrenadante e as células foram marcadas com 10  $\mu$ L de anticorpo anti-Gp-P (isotiocianato de fluoresceína (FITC) *mouse anti-human P-glicoprotein*, BD, Pharmingen, EUA) durante 15 minutos à temperatura ambiente e na ausência de luz. Após incubação, as células marcadas foram lavadas com 2 mL de PBS por centrifugação a 1300 g durante 5 minutos e ressuspensas em 400  $\mu$ L do mesmo tampão. Estas células foram guardadas a 4 °C até aquisição no citómetro de fluxo FACSCalibur (BectonDickinson, San Jose, CA), equipado com um laser de árgon de 15 mW, após a excitação com luz de comprimento de onda de 495 nm, por detecção da emissão de luz com comprimento de onda de 519 nm. Os resultados obtidos foram expressos em termos da MIF (média da intensidade de fluorescência).

A análise estatística foi realizada com recurso ao *software* IBM® SPSS® v. 20.0 (IBM Corporation, Armonk, New York, EUA). A avaliação da normalidade de distribuição das variáveis quantitativas foi feita de acordo com o teste de Shapiro-Wilk. Foram utilizados testes paramétricos no caso de se verificar uma distribuição normal e testes não paramétricos no caso contrário.

Na análise de captações de FDG, os valores experimentais obtidos foram ajustados a um modelo exponencial utilizando o *software* OriginLab v. 8.0, de acordo com a equação 3:

$$Uptake (\%) = A \cdot (1 - e^{\ln(2) \cdot t / T_{50\%}}) \quad (3)$$

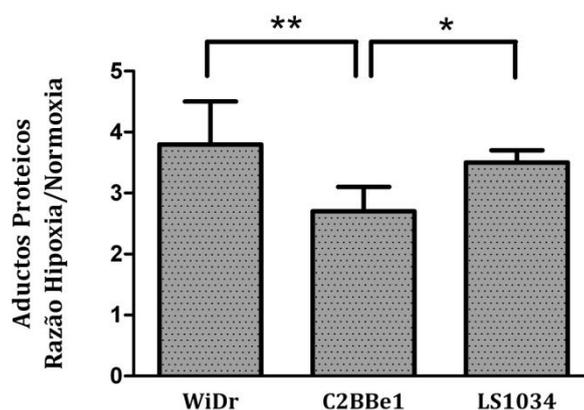
onde  $A$  representa a captação máxima obtida (estado estacionário -  $C_{ee}$ ) e  $T_{50}$  representa o tempo que demora a ser atingida metade da percentagem da captação máxima. Os parâmetros obtidos foram comparados com recurso ao teste ANOVA de um factor, com comparações múltiplas segundo a correcção de Bonferroni.

Na comparação entre a expressão de Gp-P total, Gp-P membranar e de aductos proteicos foi utilizado o teste t de Student para amostras emparelhadas (teste

paramétrico) ou o teste de Wilcoxon (teste não paramétrico). Na comparação da expressão de proteínas de resistência entre linhas celulares foi utilizado o teste ANOVA de um factor (teste paramétrico) ou o teste de Kruskal-Wallis (teste não paramétrico). As comparações múltiplas foram realizadas de acordo com a correcção de Bonferroni. Foi considerado um erro tipo I de 0,05 para todas as comparações.

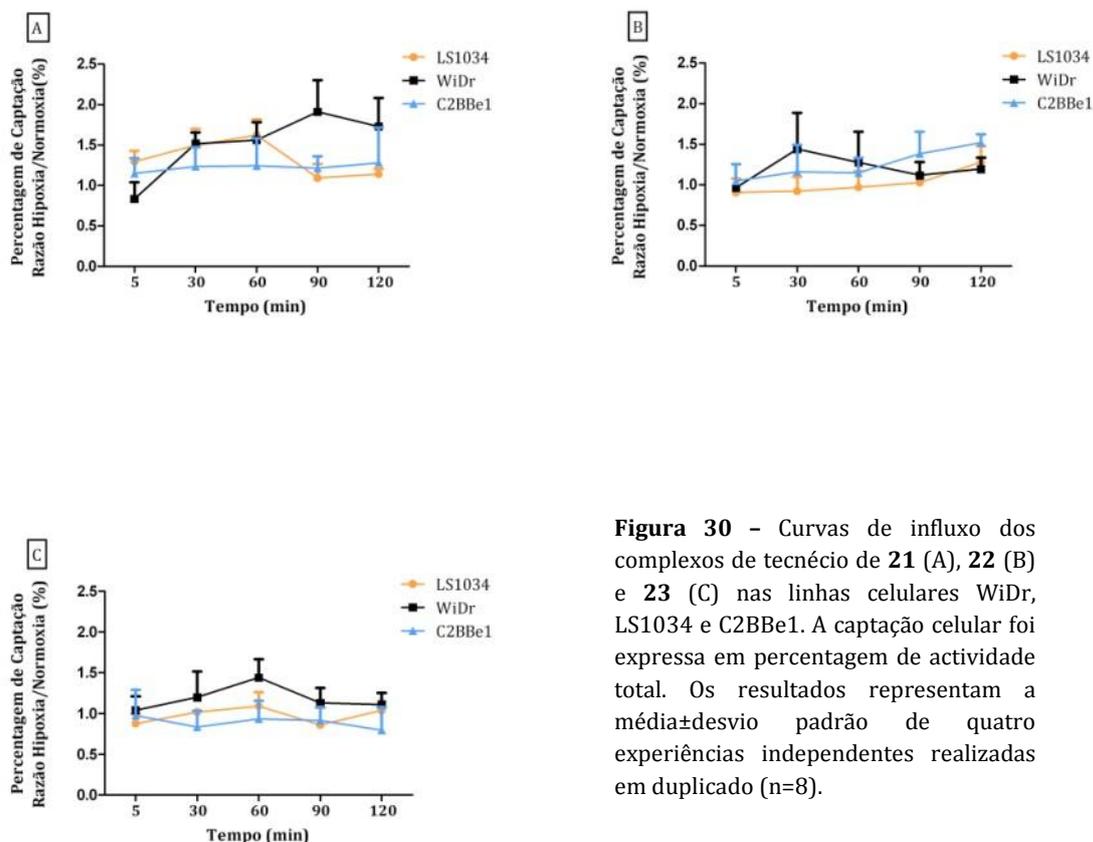
## Resultados

De acordo com os resultados obtidos na quantificação de aductos proteicos observou-se que a linha celular WiDr foi a que apresentou maior capacidade de redução do pimonidazol em condição de hipoxia relativamente à condição de normoxia. Não existe diferença entre as linhas celulares WiDR e LS1034 na capacidade de formação de aductos proteicos (p n.s.). No entanto, verificam-se diferenças significativas tanto para linha celular WiDr ( $p=0,006$ ) como a linha celular LS1034 ( $p=0,047$ ) relativamente à linha C2BBe1 quanto à capacidade de redução do pimonidazol (figura 29).



**Figura 29** - Quantificação de aductos proteicos em hipoxia *versus* normoxia com o pimonidazol para as três linhas celulares. A quantificação é expressa sob a forma da razão entre a quantidade de aductos proteicos formados na condição de hipoxia e na condição de normoxia. Os resultados representam a média±desvio padrão de quatro experiências independentes realizadas em duplicado (n=8).

Quando avaliada a captação dos diferentes complexos sintetizados pelas linhas celulares de cancro do cólon observou-se, como representado na figura 30, que o complexo que possui melhores características de radiotraçador de hipoxia é complexo  $^{99m}\text{Tc}$ -**21**. Este complexo, a partir dos 5 minutos, revela uma razão entre as captações obtidas na condição de hipoxia e na condição de normoxia sempre superior à unidade, atingindo, aos 90 minutos, o valor de dois. Como podemos observar na figura 30-A a captação entre as diversas linhas difere. A linha WiDr é a linha celular que apresenta maior captação, em especial a partir dos 60 minutos. Esta linha celular apresenta um aumento significativo da captação relativamente às linhas C2BBe1 ( $p=0,01$ ) e LS1034 ( $p<0,001$ ) aos 90 minutos. Aos 120 ocorre também uma captação significativamente superior por parte da linha celular WiDr em relação à linha celular C2BBe1 ( $p=0,009$ ) e à linha celular LS1034 ( $p=0,008$ ).

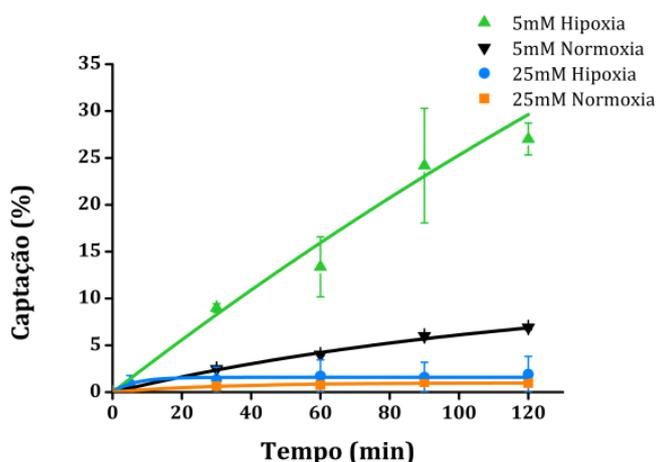


**Figura 30** - Curvas de influxo dos complexos de tecnécio de **21** (A), **22** (B) e **23** (C) nas linhas celulares WiDr, LS1034 e C2BBe1. A captação celular foi expressa em percentagem de actividade total. Os resultados representam a média±desvio padrão de quatro experiências independentes realizadas em duplicado (n=8).

Relativamente ao complexo  $^{99m}\text{Tc-22}$  (figura 30-B), a razão entre as captações obtidas na condição de hipoxia e na condição de normoxia nunca supera a captação do complexo  $^{99m}\text{Tc-21}$  apesar de aos 30 min de captação se verificarem diferenças significativas da linha celular WiDr em relação à linha celular C2BBe1 ( $p=0,002$ ) e à linha celular LS1034 ( $p<0,001$ ). Por fim o complexo  $^{99m}\text{Tc-23}$ , foi o que revelou piores resultados como radiotraçador de hipoxia (figura 30-C).

A utilização do  $^{18}\text{F-FDG}$  nos estudos de cinética celular permite avaliar o metabolismo glicolítico das três linhas celulares de cancro do cólon (WiDr, LS1034 e C2BBe1) com diferentes concentrações de glicose no meio de cultura (5 e 25 mM) e em diferentes ambientes, de normoxia e de hipoxia.

Relativamente à linha celular WiDr observou-se, como podemos apreciar na figura 31, que existem diferenças notórias nas curvas que traduzem a captação de  $^{18}\text{F-FDG}$ , obtidas nas diferentes condições de concentração de glicose e de percentagem de oxigénio. Nesta linha celular, a concentração de 5 mM de glicose no meio de cultura em ambiente de hipoxia revela-se a condição em que maior actividade foi acumulada no interior das células. Para qualquer das outras condições estudadas as células tendem muito precocemente para a situação estacionária, havendo diferenças entre as intensidades do influxo, o que se reflecte nos parâmetros cinéticos de cada curva tais como a percentagem da captação no estado estacionário ( $C_{ee}$ ) e o tempo que demora a atingir 50 % da percentagem de captação no estado estacionário ( $T_{50}$ ), os quais se mostram na tabela 2.



**Figura 31** – Curvas de influxo de  $^{18}\text{F-FDG}$  da linha celular WiDr. A captação celular foi expressa em percentagem de actividade total. Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão de quatro experiências independentes realizadas em duplicado ( $n=8$ ).

**Tabela 2** – Parâmetros cinéticos da captação de  $^{18}\text{F}$ -FDG pela linha celular WiDr nas diferentes concentrações de glicose, de 5 e de 25 mM, em condições de normoxia e de hipoxia.

$^{18}\text{F}$ -Fluordesoxiglicose	C <sub>ee</sub> (%)	T <sub>50</sub> (min)
WiDr 25 mM Normoxia	0,88 ± 0,24 <sup>#</sup>	15,60 ± 9,89
WiDr 25 mM Hipoxia	1,60 ± 0,12 <sup>#</sup>	4,32 ± 1,16
WiDr 5 mM Normoxia	9,76 ± 4,82 <sup>#</sup>	71,27 ± 50,41
WiDr 5 mM Hipoxia	41,09 ± 13,99 <sup>#</sup>	80,77 ± 35,14

\*p<0,05 comparando diferentes concentrações de glicose no meio

<sup>#</sup>p<0,05 comparando os diferentes ambientes normoxia e hipoxia

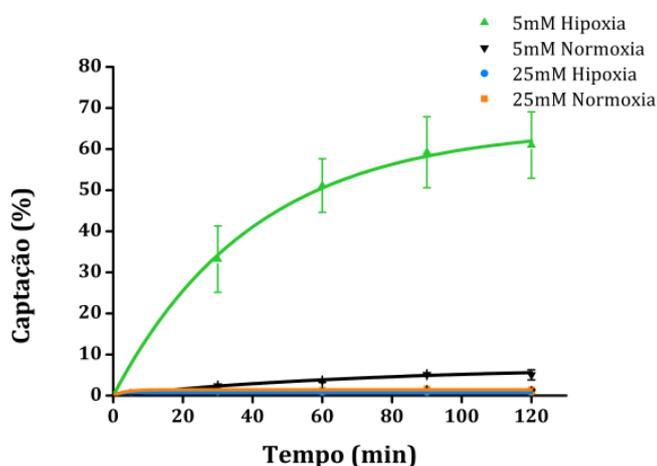
Nesta linha celular observou-se que existem diferenças significativas (p=0,011) na percentagem de captação no estado estacionário (C<sub>ee</sub>) quando comparados os resultados para a concentração de glicose mais elevada, 25 mM, em condição de hipoxia (1,60%±0,12%) com a condição de normoxia (0,88%±0,24%). Relativamente ao T<sub>50</sub> não existem diferenças com significado estatístico na condição de hipoxia comparativamente com a condição de normoxia.

Quanto ao C<sub>ee</sub>, relativamente à concentração de 5 mM de glicose no meio de cultura, observaram-se também diferenças significativas (p=0,033) entre a condição de hipoxia (41,09%±13,99%) e a condição de normoxia (9,76%±4,82%). Relativamente ao valor T<sub>50</sub>, à semelhança da condição de elevada concentração de glicose, não se verificaram diferenças com significado estatístico.

Na condição de hipoxia, e quando comparamos as diferentes concentrações de glicose no meio de cultura (25 e 5 mM) não há significativas entre os C<sub>ee</sub>. O mesmo acontece para a condição de normoxia com as duas concentrações de glicose no meio. De modo semelhante não se verificam diferenças para os valores de T<sub>50</sub>.

Em relação à linha celular C2BB<sub>e</sub>1, como pode ser observado na figura 32, constatou-se que, à semelhança da linha celular WiDr, as condições que determinam maior C<sub>ee</sub> são a condição de hipoxia associada a baixa concentração de glicose. Assim, e como podemos ver na tabela 3, quando comparados, os resultados referentes à concentração de glicose mais elevada, 25 mM, os valores de C<sub>ee</sub> são significativamente (p<0,001) menos elevados em condição de hipoxia (0,76±0,06%) do que na condição de normoxia (1,62±0,02%). Relativamente ao

$T_{50}$  verifica-se que também existem diferenças ( $p=0,011$ ) quando comparamos a condição de hipoxia ( $1,21\pm 1,05$  min) com a condição de normoxia ( $4,52\pm 0,69$  min).



**Figura 32** - Curvas de influxo de  $^{18}\text{F}$ -FDG da linha celular C2BBE1. A captação celular foi expressa em percentagem de captação acumulada. Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão de quatro experiências independentes realizadas em duplicado ( $n=8$ ).

**Tabela 3** – Parâmetros cinéticos de captação de  $^{18}\text{F}$ -FDG na linha celular C2BBE1 para as diferentes concentrações de glicose, 5 e 25 mM, em condições de normoxia e de hipoxia.

$^{18}\text{F}$ -Fluordesoxiglicose	$C_{ee}$ (%)	$T_{50}$ (min)
C2BBE1 25 mM Normoxia	$1,62 \pm 0,02^{\#}$	$4,52 \pm 0,69^{\#}$
C2BBE1 25 mM Hipoxia	$0,76 \pm 0,06^{*\#}$	$1,21 \pm 1,05^{*\#}$
C2BBE1 5 mM Normoxia	$5,67 \pm 2,01^{\#}$	$34,65 \pm 22,33$
C2BBE1 5 mM Hipoxia	$65,31 \pm 1,80^{*\#}$	$27,99 \pm 2,11^*$

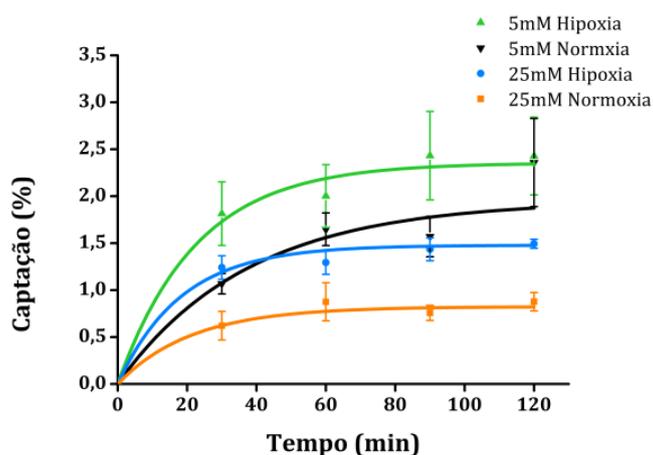
\* $p < 0,05$  comparando as diferentes concentrações de glicose no meio  
 $\#p < 0,05$  comparando os diferentes ambientes normoxia e hipoxia

Quando avaliada a  $C_{ee}$  em baixa concentração de glicose no meio de cultura, 5 mM, observou-se que existem diferenças ( $p < 0,001$ ) entre a condição de hipoxia ( $65,31\% \pm 1,80\%$ ) e a condição de normoxia ( $5,67\% \pm 2,01\%$ ). Relativamente ao valor de  $T_{50}$ , quando comparadas as condições, hipoxia com a normoxia, não se verificam diferenças com significado estatístico.

Na condição de hipoxia, e quando comparamos as diferentes concentrações de glicose no meio de cultura (25 e 5 mM) existem diferenças significativas ( $p < 0,001$ ) entre os  $C_{ee}$  obtida na maior concentração de glicose ( $0,76\% \pm 0,06\%$ ) e na menor concentração ( $65,31\% \pm 1,80\%$ ). Na condição de normoxia não se verificam diferenças significativas entre as  $C_{ee}$  obtidas nas duas concentrações de

glicose. Relativamente ao  $T_{50}$ , observou-se que existem diferenças com significado estatístico na condição de hipoxia ( $p < 0,001$ ) entre a concentração de 25 mM ( $1,21\text{min} \pm 1,05\text{min}$ ) e a de 5 mM de glicose no meio ( $27,99\text{min} \pm 2,11\text{min}$ ).

Ao contrário das restantes linhas celulares, a linha celular LS1034, tal como está representado na figura 33, apresenta valores de captação muito inferiores às restantes linhas.



**Figura 33** - Curvas de influxo de  $^{18}\text{F}$ -FDG para a linha celular LS1034. A captação celular foi expressa em percentagem de actividade acumulada. Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão de quatro experiências independentes realizadas em duplicado ( $n=8$ ).

Assim, como é possível constatar na tabela 4, as células quando em presença de elevada concentração de glicose (25mM), apresentam um valor de  $C_{ee}$  em condições de hipoxia ( $1,44\% \pm 0,05\%$ ) significativamente superior ( $p < 0,001$ ) quando comparado com o valor obtido em condições de normoxia ( $0,79\% \pm 0,05\%$ ). Relativamente ao valor de  $T_{50}$  obtido quando a concentração de glicose no meio é elevada, este parâmetro não apresenta diferenças significativas entre as condições de hipoxia e de normoxia.

**Tabela 4** – Parâmetros cinéticos de captação de  $^{18}\text{F}$ -FDG na linha celular LS1034 para as diferentes concentrações de glicose, 5 e 25 mM, em condições de normoxia e de hipoxia.

$^{18}\text{F}$ -Fluordesoxiglicose	$C_{ee}$ (%)	$T_{50}$ (min)
LS1034 25 mM Normoxia	$0,79 \pm 0,05^{*#}$	$2,99 \pm 0,93$
LS1034 25 mM Hipoxia	$1,44 \pm 0,05^{*#}$	$3,55 \pm 1,03$
LS1034 5 mM Normoxia	$1,33 \pm 0,19^{*#}$	$4,20 \pm 1,25$
LS1034 5 mM Hipoxia	$2,11 \pm 0,15^{*#}$	$4,14 \pm 0,73$

\* $p < 0,05$  comparando diferentes concentrações de glicose no meio

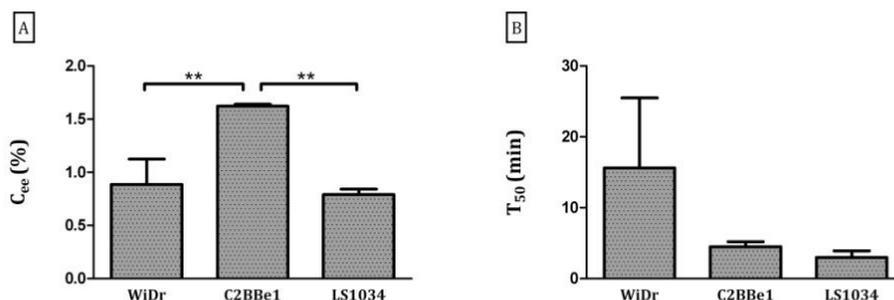
# $p < 0,05$  comparando os diferentes ambientes de normoxia e hipoxia

Quando comparadas as condições de hipoxia ( $2,11\% \pm 0,15\%$ ) e de normoxia ( $1,33\% \pm 0,19\%$ ) para a baixa concentração de glicose (5mM), verificou-se que existem diferenças com significado estatístico ( $p=0,004$ ). No entanto, quando comparado o valor de  $T_{50}$  em hipoxia e em normoxia não existiam diferenças significativas.

Na condição de hipoxia, e quando comparamos as diferentes concentrações de glicose no meio de cultura (25 e 5 mM) existem diferenças significativas ( $p=0,001$ ) entre os  $C_{ee}$  obtida na maior concentração de glicose ( $1,44\% \pm 0,05\%$ ) e na menor concentração ( $2,11\% \pm 0,15\%$ ). Na condição de normoxia e quando comparamos as diferentes concentrações de glicose no meio de cultura (25 e 5 mM) existem diferenças significativas ( $p=0,009$ ) entre os  $C_{ee}$  obtida na maior concentração de glicose ( $0,79\% \pm 0,05\%$ ) e na menor concentração ( $1,33\% \pm 0,19\%$ ). Em relação ao valor de  $T_{50}$  comparando as diferentes concentrações de glicose no meio em condições de hipoxia e normoxia não se verificam diferenças com significado estatístico em nenhuma condição. No entanto, quando avaliada a mesma condição de oxigenação, ou seja de hipoxia, com diferentes concentrações de glicose no meio, não se verificaram diferenças significativas nos valores de  $T_{50}$ .

As diferenças encontradas nos parâmetros obtidos,  $C_{ee}$  e  $T_{50}$ , dentro de cada linha celular estudada, nas condições de oxigênio no meio (hipoxia e normoxia) e nas concentrações de glicose no meio (5 mM e 25 mM), conduziram à comparação dos  $C_{ee}$  e dos  $T_{50}$  entre as diferentes linhas celulares (WiDr, C2BBE1 e LS1034). Assim, as avaliações realizadas em condição de normoxia e em elevada concentração de glicose no meio de cultura celular (25 mM), mostraram que a linha celular C2BBE1 possui maior  $C_{ee}$ , existindo diferenças significativas entre os valores obtidos nesta linha e nas linhas celulares WiDr ( $p=0,003$ ) e LS1034 ( $p < 0,001$ ). A linha celular LS1034 é a linha celular que apresenta menor

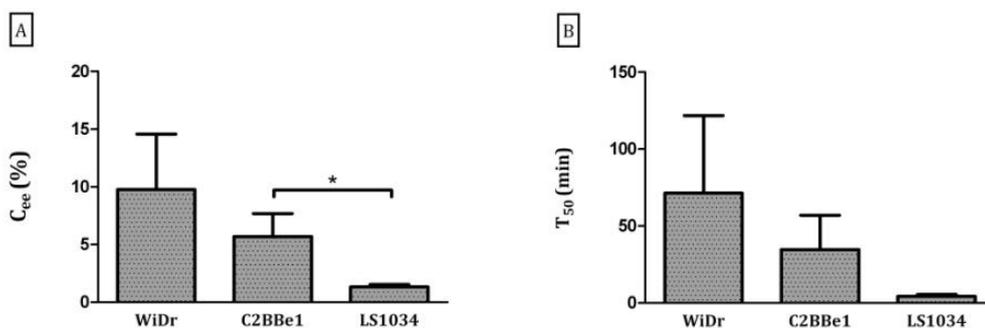
percentagem de captação no estado estacionário (figura 34 A).



**Figura 34** – Representação gráfica da C<sub>ee</sub> (A) e do T<sub>50</sub> (B) de <sup>18</sup>F-FDG em condições de elevada concentração de glicose, 25 mM, e normoxia. Os resultados representam a média±desvio Os resultados representam a média±desvio padrão de quatro experiências independentes realizadas em duplicado (n=8) para as diferentes linhas celulares. As diferenças significativas em relação ao controlo estão assinaladas com \*\* que corresponde a p<0,01.

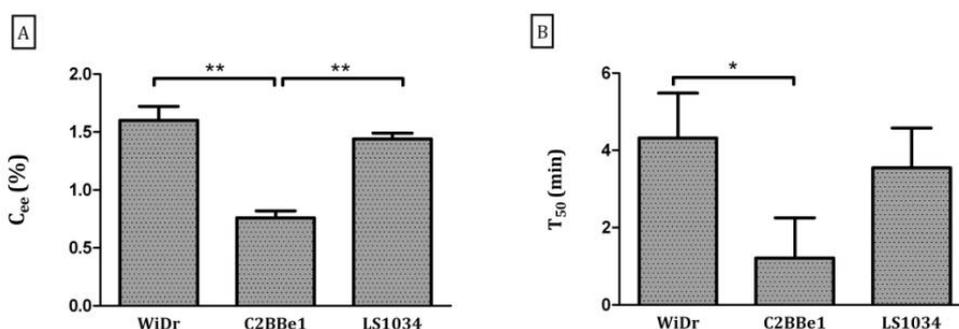
Relativamente ao T<sub>50</sub>, (figura 34 B), para nas mesmas condições de normoxia verifica-se, que a linha celular WiDr apresenta o valor de T<sub>50</sub> mais elevado mas sem significado estatístico em relação aos valores obtidos nas linhas outras celulares, sendo que a linha celular LS1034 é a que apresenta menor C<sub>ee</sub>.

Em condições de normoxia e a 5 mM de de glicose no meio de cultura verificou-se, como é possível observar na figura 35-A, que a linha celular WiDr é que apresenta maior C<sub>ee</sub>, seguida pela linha C2BBe1 e por fim a linha LS1034. De referir que entre estas duas linhas celulares existem diferenças com significado estatístico (p=0,015). Quando analisado o T<sub>50</sub> (figura 35-B), a linha celular que apresenta o maior valor é a linha celular WiDr, seguida da C2BBe1 e por fim a LS1034, no entanto, sem diferenças significativas entre os três valores de T<sub>50</sub>.



**Figura 35** - Representação gráfica da  $C_{ee}$  (A) e do  $T_{50}$  (B) de  $^{18}\text{F}$ -FDG em condições de baixa concentração de glicose, 5 mM, e normoxia. Os resultados representam a média $\pm$ desvio de quatro experiências independentes realizadas em duplicado ( $n=8$ ), para as diferentes linhas celulares. As diferenças significativas em relação ao controlo estão assinaladas com \* que corresponde a  $p<0,05$ .

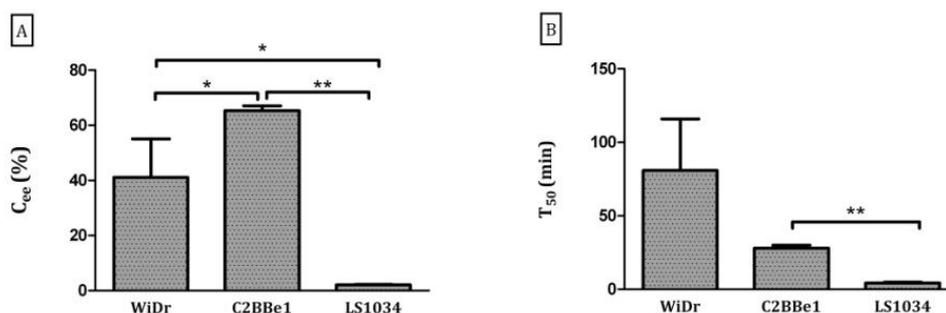
Quando as células foram avaliadas na condição de hipoxia e em elevada concentração de glicose no meio, (25 mM), a  $C_{ee}$  observou-se ser mais elevada na linha celular WiDr seguida da linha celular LS1034 e da linha celular C2BBE1, linha celular que apresenta a menor  $C_{ee}$  (figura 36-A). Este estudo comparativo da  $C_{ee}$  nas diferentes linhas celulares mostrou que as diferenças existentes entre a  $C_{ee}$  da linha C2BBE1 relativamente às restantes, WiDr e LS1034 apresentam significado, ambas com um valor de  $p < 0,001$ . Ainda em relação ao  $T_{50}$ , a linha celular C2BBE1 possui um valor de  $T_{50}$  inferior às linhas celulares LS1034 e WiDr com significado estatístico ( $p=0,022$ ). A linha celular WiDr, constitui a linha que revela um maior valor de  $T_{50}$  (figura 36-B).



**Figura 36** - Representação gráfica da  $C_{ee}$  (A) e do  $T_{50}$  (B) de  $^{18}\text{F}$ -FDG em condições de elevada concentração de glicose, 25 mM, e hipoxia. Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de quatro experiências independentes realizadas em duplicado ( $n=8$ ), para as diferentes linhas celulares. As diferenças significativas em relação ao controlo estão assinaladas com \* que corresponde a  $p<0,05$  e \*\* que corresponde a  $p<0,01$ .

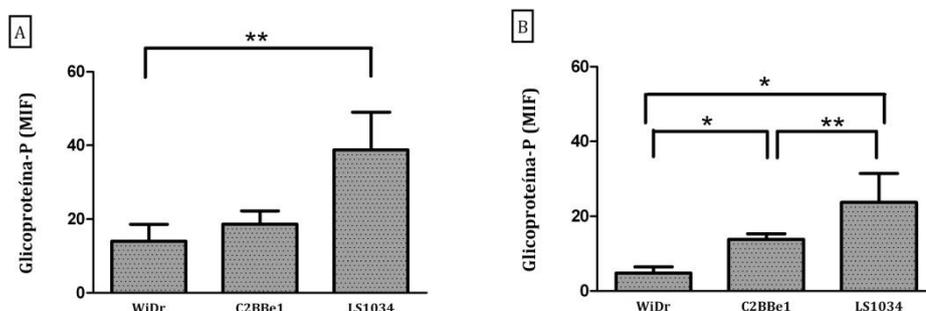
Quando avaliada a  $C_{ee}$  e o  $T_{50}$  em condição de hipoxia e em reduzida concentração de glicose, (5 mM), e de acordo com a figura 37-A, a linha celular que apresenta maior  $C_{ee}$  é a linha celular C2BBE1 com diferenças significativas em relação às restantes linhas celulares, à linha celular WiDr ( $p=0,042$ ), e à linha celular LS1034 ( $p<0,001$ ), apresentando ambas menor valor de  $C_{ee}$ . A linha celular LS134 é a que apresenta menor valor da  $C_{ee}$ , existindo significância entre esta linha e a linha celular WiDr ( $p=0,034$ ).

Quando analisado o valor de  $T_{50}$ , a linha celular WiDr apresenta o valor maior de  $T_{50}$  mas sem diferenças significativas em relação às outras duas linhas celulares. A linha celular C2BBE1 tem um valor de  $T_{50}$  intermédio, enquanto a linha celular LS1034 é a que apresenta o valor mais baixo de  $T_{50}$ . As diferenças de  $T_{50}$  entre a linha celular C2BBE1 e LS1034 são significativas ( $p<0,001$ ) (Figura 37-B)



**Figura 37** - Representação gráfica da  $C_{ee}$  (A) e do  $T_{50}$  (B) de  $^{18}\text{F}$ -FDG em condições de baixa concentração de glicose, 5 mM, e hipoxia. Os resultados representam a média±desvio padrão de quatro experiências independentes realizadas em duplicado ( $n=8$ ). As diferenças significativas em relação ao controlo estão assinaladas com \* que corresponde a  $p<0,05$  e \*\* que corresponde a  $p<0,01$ .

Os resultados obtidos relativamente à cinética do  $^{18}\text{F}$ -FDG nas diferentes linhas celulares, em especial o comportamento dinâmico da linha celular LS1034, levantaram algumas questões. Para tentar perceber um pouco mais sobre a influência na captação de moléculas do tipo do  $^{18}\text{F}$ -FDG, foi avaliada a expressão de transportadores que parecem influenciar a sua captação. Assim, a expressão total e membranar da Gp-P foram avaliadas por citometria de fluxo. Através desta técnica, observou-se que a linha LS1034 apresenta maior expressão da Gp-P total, com diferença significativa em relação à linha celular WiDr ( $p=0,005$ ). A linha celular WiDr possui a menor expressão total da Gp-P, como representado na figura 38-A.



**Figura 38** - Representação gráfica da expressão total (A) e membranar da Glicoproteína-P (B). Os resultados representam a média±desvio padrão da média de intensidade de fluorescência de quatro experiências independentes realizadas em duplicado (n=8). As diferenças significativas estão assinaladas com \* que corresponde a  $p < 0,05$  e \*\* que corresponde a  $p < 0,01$ .

Quanto à expressão membranar de Gp-P, a linha celular LS1034 possui a maior expressão seguida da linha celular C2BBE1 e por último a linha celular WiDr, linha celular que possui a menor expressão. As diferenças entre as expressões na linha celular LS1034 e as linhas celulares C2BBE1 ( $p=0,008$ ) e WiDr ( $p=0,001$ ) são significativas. As linhas celulares WiDr e C2BBE1 também apresentam diferenças com significado estatístico ( $p=0,02$ ), para a mesma expressão, como representado na figura 38 -B.

## Discussão

A condição de baixa oxigenação das células tumorais constitui uma característica dos tumores sólidos. Para caracterizar e quantificar esta condição estão disponíveis métodos directos e indirectos, os quais apresentam variadas vantagens e desvantagens (Abrantes *et al.*, 2009). A Medicina Nuclear constitui um método de diagnóstico e de terapêutica. A componente de diagnóstico permite por imagem funcional, a caracterização e/ou quantificação de funções em órgãos ou tecidos na dependência da escolha criteriosa dos radiofármacos.

Em Oncologia Nuclear, se pretendermos avaliar áreas de hipoxia, podemos também recorrer à utilização de radiofármacos específicos.

A síntese de novos compostos específicos para áreas em hipoxia, um dos objectivos deste trabalho, permitiu obter três novos radiotraçadores com elevada eficiência de marcação, assim como com elevada estabilidade do complexo. Relativamente à estrutura dos ligandos, todos possuem um grupo nitro na sua estrutura química, já que através desta característica o complexo é reduzido em ambiente de hipoxia e, desta forma, fica retido na célula. No entanto, e tendo em conta as experiências realizadas *in vitro* com as três linhas celulares de cancro do cólon, os três complexos revelaram comportamentos diferentes, verificando-se que o complexo  $^{99m}\text{Tc-21}$  foi o que mostrou ter as características cinéticas que melhor se adequam a um radiotraçador para avaliar a hipoxia.

A justificação para tal facto pode residir na sua estrutura química. Apesar de os três complexos possuírem um grupo nitro, a restante estrutura química difere entre eles. De facto, o complexo  $^{99m}\text{Tc-23}$ , um derivado de piperidina, foi o que mostrou ter as características menos favoráveis, enquanto que os complexos  $^{99m}\text{Tc-21}$  e  $^{99m}\text{Tc-22}$ , derivados da ciclo-hexilamina e morfolina, respectivamente, foram os que apresentaram características mais favoráveis como radiotraçadores para a hipoxia. Entre estes, o complexo  $^{99m}\text{Tc-21}$  foi o que apresentou os melhores resultados no que diz respeito à captação celular. Estes resultados são justificados pelas suas características físico-químicas, em especial a maior lipofilicidade, quando comparada com a do complexo  $^{99m}\text{Tc-22}$ . Estes resultados estão de acordo com o já descrito na literatura, sobre a biodistribuição de ligandos derivados do imidazol marcados com radionuclídeos, a qual pode ser influenciada pelo coeficiente de partição *n*-octanol/água do complexo (Grunbaum *et al.*, 1987). Esta característica condiciona o transporte dos complexos através das membranas celulares, que por sua vez é influenciado pelo coeficiente de partição *n*-octanol/água que aumenta com a lipofilicidade do complexo. Adicionalmente, os nitroimidazóis com a mesma afinidade electrónica apresentam elevadas concentrações em células tumorais, os quais se correlacionam positivamente com a sua lipofilicidade (Grunbaum *et al.*, 1987).

Em relação às três linhas celulares estudadas, e de acordo com os resultados obtidos, a captação do melhor complexo demonstrou ser maior na linha celular WiDr. A justificação possível para este facto poderá ter a ver com a maior capacidade de redução do pimonidazol por parte da linha celular WiDr comparativamente com as restantes linhas celulares, como também foi

demonstrado nos resultados. No entanto, o processo de redução do pimonidazol em presença de baixa concentração de oxigénio, como se verifica nas células em hipoxia, poderá ser controverso. De facto, existe literatura que refere que a redução do pimonidazol, em células tumorais humanas, só se correlaciona com significado estatístico, com a enzima LDH-5 e não com outras enzimas, como a CAIX, factores de transcrição como o HIF-1 $\alpha$ , ou transportadores como os GLUTs, (Goethals *et al.*, 2006; Rademakers *et al.*, 2011). Quando a célula se encontra em hipoxia e ocorre redução do pimonidazol, os derivados deste composto formam aductos proteicos; no entanto, o pimonidazol pode reagir com as espécies reactivas de oxigénio presentes na célula, o que significa que o stresse oxidativo pode interferir com a quantidade de aductos proteicos derivados do pimonidazol (Goethals *et al.*, 2006; Mayr *et al.*, 2008).

Tendo em conta as características das células tumorais, em especial o incremento da glicólise, tornou o  $^{18}\text{F}$ -FDG este traçador o *gold standard* na detecção e estadiamento de tumores, na prática clínica. No entanto, a biodistribuição do radiofármaco é muitas vezes heterogénea o que tornou necessário aprofundar os mecanismos envolvidos na captação de  $^{18}\text{F}$ -FDG pelas células tumorais. Estudos neste âmbito permitem relacionar a sua captação com as alterações do microambiente onde o tumor se encontra inserido. Assim, a hipoxia ou o aumento da proliferação celular, ou seja, a informação e/ou caracterização espacial da captação de  $^{18}\text{F}$ -FDG pode ser bastante útil para inferir acerca do prognóstico e tratamento dos doentes (Pugachev *et al.*, 2005).

Em relação aos estudos de captação com  $^{18}\text{F}$ -FDG observou-se que a sua captação é superior na condição de hipoxia, para ambas as concentrações de glicose, nas linhas celulares WiDr e LS1034. Na linha celular C2BBel, a captação de  $^{18}\text{F}$ -FDG é máxima para a condição de normoxia e em presença de grande concentração de glicose (25 mM).

De um modo geral, podemos dizer que a diminuída pressão parcial de oxigénio na célula tumoral altera diversas vias metabólicas celulares, entre elas a fosforilação oxidativa, a qual é dependente de oxigénio. Em condição de hipoxia, a fosforilação oxidativa e respectiva produção de ATP ficam comprometidas, passando a glicólise a ter um papel preponderante. Daqui resulta que nos tumores sólidos, onde a hipoxia tumoral mais se verifica, ocorre uma elevada captação da glicose (Burgman, *et al.*, 2001; van Baardwijk *et al.*, 2007; Weljie & Jirik, 2011). Assim, como o  $^{18}\text{F}$ -FDG é um análogo da glicose, em condições de diminuída oxigenação, a célula tumoral aumenta a captação de  $^{18}\text{F}$ -FDG, contribuindo para um

aumento da razão entre a actividade do tecido tumoral e a actividade de fundo correspondente ao tecido normal (Pauwels *et al.*, 1998; Burgman *et al.*, 2001; van Baardwijk *et al.*, 2007; Weljie & Jirik, 2011c). Para além disso, é característico da transformação maligna em ambiente hipóxico, o aumento da expressão dos transportadores de glicose (GLUT), em especial das isoformas 1 e 3, assim como o aumento da actividade da enzima hexocinase, cuja isoforma mais comum é a isoforma II. Estas duas características adicionalmente também favorecem o aumento da captação de  $^{18}\text{F}$ -FDG pelas células tumorais (Pauwels *et al.*, 1998; Burgman *et al.*, 2001; van Baardwijk *et al.*, 2007; Weljie & Jirik, 2011c).

Outros estudos *in vitro*, revelaram ainda que a hipoxia aguda não só influencia a captação de  $^{18}\text{F}$ -FDG, proporcionando o seu aumento, como é distinta nas diferentes linhas celulares tumorais (Van de Wiele *et al.*, 2003). Segundo estes autores estas diferenças relacionam-se com o aumento significativo dos GLUTs. De facto, esta conclusão pode ser justificada pela provável reciclagem dos receptores membranares internalizados ou, mesmo devido a uma diminuição da taxa de internalização dos GLUTs. Outra explicação proposta foi que, devido à hipoxia, ocorre a modificação dos grupos tiol presentes nos GLUTs o que, por sua vez, poderia aumentar a cinética do transporte de glicose (Van de Wiele *et al.*, 2003). Segundo esta proposta, a captação de  $^{18}\text{F}$ -FDG pode então variar de acordo com as condições de oxigenação dos tecidos.

Nos nossos resultados, quando comparamos a captação de  $^{18}\text{F}$ -FDG pelas diferentes linhas celulares nas mesmas condições, ou seja, na condição de hipoxia ou na condição de normóxia, verificamos que a linha celular LS1034 é a que apresenta a menor captação. Esta linha celular tem a sua máxima captação na condição de normoxia com elevada concentração de glicose no meio de cultura. Uma possível explicação da menor captação de  $^{18}\text{F}$ -FDG pela linha LS1034 reside no facto de que esta linha apresenta resistência à quimioterapia por sobreexpressão da Gp-P que é uma glicoproteína membranares de extrusão, a qual poderia ser responsável pela extrusão do  $^{18}\text{F}$ -FDG previamente captado, nunca deixando acumular muito radiofármaco no interior da célula (Casalta-Lopes *et al.*, 2011).

Estudos realizados em células de carcinoma hepatocelular mostraram que este tipo de tumor é multirresistente e está associado a uma sobreexpressão da Gp-P. Esses estudos revelaram ainda que a captação de  $^{18}\text{F}$ -FDG pelas células se correlaciona inversamente com a concentração membranares de Gp-P, ou seja, quando a expressão de Gp-P é elevada verifica-se uma redução da concentração intracelular de  $^{18}\text{F}$ -FDG, em comparação com os tumores que não sobreexpressam

a Gp-P. Tais factos revelam que a Gp-P actua como uma bomba de efluxo para o  $^{18}\text{F}$ -FDG, ou seja, o  $^{18}\text{F}$ -FDG é substrato desta glicoproteína membranar, o que suportaria os resultados por nós obtidos (Seo *et al.*, 2007, 2009).

A relação da expressão das proteínas membranares associadas a resistência multi-fármacos (do inglês, *MultiDrug Resistance* – MDR) com a captação de  $^{18}\text{F}$ -FDG e com a expressão da proteína p53 foi verificada em outros estudos realizados (Gatenby & Gillies, 2004; Smith *et al.*, 2006; Smith, 2010). A partir desses estudos, provou-se que a perda de p53 está relacionada com um aumento da taxa de utilização da glicose pelas células. Foram obtidas correlações directas entre a expressão de p53 mutada e a incorporação de  $^{18}\text{F}$ -FDG em estudos de cancro colorrectal, mama, pulmão, colo do útero e sarcomas (Gatenby & Gillies, 2004; Smith *et al.*, 2006; Smith, 2010). Estudos desenvolvidos em timoma e em metastases hepáticas de cancro colorrectal referem uma correlação positiva entre a expressão de p53 e a captação de  $^{18}\text{F}$ -FDG (Riedl *et al.*, 2007; Kaira *et al.*, 2010). Estão também descritas correlações entre a expressão da enzima hexocinase II e a expressão de p53 (Gatenby & Gillies, 2004; Smith *et al.*, 2006; Smith, 2010).

Também foi realizada a avaliação da expressão de p53 nas três linhas celulares de cancro do cólon. Estes resultados que são apresentados e discutidos no capítulo V permitem justificar a captação quase sempre mais baixa da linha celular C2BBE1 relativamente à linha celular WiDr, já que a linha celular C2BBE1 apresenta uma ausência de expressão da proteína p53.



## CAPÍTULO V

# HIPOXIA NA CÉLULA DE CANCRO DO CÓLON



## Introdução

Em geral, o principal objectivo de uma célula tumoral é de uma forma inicial sobreviver, conseqüentemente proliferar e, finalmente, metastizar. A capacidade aumentada de proliferação das células tumorais nos tumores sólidos pode conduzir à sua própria falência tendo em conta o seu distanciamento à fonte de oxigénio, factores de crescimento e nutrientes. Por outro lado, esta privação desencadeia mecanismos de resposta das células tumorais que promovem a sobrevivência celular e a migração (Brahimi-Horn *et al.*, 2007, Brahimi-Horn *et al.*, 2011). Assim, e tendo em conta o conjunto de alterações que a diminuição da pressão parcial de oxigénio pode causar na célula tumoral, o objectivo deste capítulo experimental consiste no estudo da influência da hipoxia na proliferação, viabilidade e ciclo celular nas linhas celulares referidas no capítulo anterior. Para além deste objectivo pretende-se também estudar a expressão das proteínas p53 e HIF-2 $\alpha$ , duas proteínas que possuem um papel importante na resposta da célula tumoral a esta condição de reduzida oxigenação.

## Material e Métodos

Para avaliar o efeito da reduzida percentagem de oxigénio nas células de três linhas celulares de cancro do cólon foi realizado o ensaio do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol). Este composto é internalizado por endocitose e é reduzido nas células metabolicamente activas pela acção de enzimas desidrogenases, sendo que este processo ocorre maioritariamente ao nível da mitocôndria. Assim, este método constitui essencialmente uma medida da actividade metabólica (Büttner *et al.*, 2008). As enzimas em causa clivam os anéis de tetrazólio do MTT transformando-o em cristais de formazan de cor azul escura que podem ser solubilizados e quantificados por meios espectrofotométricos. Assim, a quantidade de cristais de formazan formados constitui uma forma indirecta de avaliar a actividade metabólica.

As três linhas celulares de cancro do cólon cultivadas em 25 mM e em 5 mM de glicose foram ressuspensas de modo a preparar placas de 24 poços. Estas placas foram preparadas, sempre em duplicado, para que cada placa incubada em condições de hipoxia tivesse o seu controlo em condições de normoxia. Todas as

placas obtidas foram inicialmente incubadas durante a noite em condições *standard* de modo a permitir a adesão das células ao fundo de cada poço. Posteriormente as placas foram divididas em dois grupos, de forma a ficarem em ambientes distintos relativamente à percentagem de oxigénio: normoxia (95 % ar e 5 % CO<sub>2</sub>) e hipoxia (93 % N<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub> e 2 % O<sub>2</sub>). Após duas e após quarenta e oito horas de incubação das placas nos ambientes diferentes foi avaliada a actividade metabólica. Para este fim, o meio de cultura foi retirado e a cada poço da placa foi adicionado PBS (PBS, do inglês *phosphate buffer saline*) com o objectivo de lavar e retirar todo o meio. Posteriormente, foram adicionados 200 µL de uma solução de MTT com concentração de 0,5 mg/mL (Sigma M2128) em PBS. Passadas três horas de incubação a 37 °C, acrescentaram-se a cada poço 200 µL de uma solução 40 mM de ácido clorídrico em isopropanol com o objectivo de solubilizar os cristais de formazan obtidos. Após solubilização foi retirada de cada poço uma amostra de 200 µL da solução, que se transferiu para outra placa, de 96 poços e a absorvância da solução foi quantificada através da leitura óptica com uma luz de 570 nm, com um filtro de referência de 620 nm, usando o espectrofotómetro leitor de microplacas Biotek® *Synergy HT*. O efeito da hipoxia na actividade metabólica de cada linha celular em ambas as condições de glicose foi obtido através do cálculo da razão entre a absorvância obtida na condição de hipoxia e a absorvância obtida na condição de normoxia.

Para além da actividade metabólica, também foi avaliado o efeito da hipoxia na síntese proteica. Para tal, realizou-se o ensaio da sulforrodamina B (SRB). Este corante arroxeadado e aniónico liga-se aos aminoácidos das proteínas de forma electroestática e dependente do pH. Sob condições acídicas liga-se aos aminoácidos das proteínas celulares, e, sob condições alcalinas, pode ser extraído. Após fixação, solubilização e medição por métodos espectrofotométricos, os resultados obtidos correlacionam-se com o número de células através do conteúdo proteico total (Papazisis *et al.* 1997; Voigt, 2005; Vichai & Kirtikara, 2006).

Para a realização deste ensaio e à semelhança do descrito para o ensaio de MTT foram preparadas placas de 24 poços de cada linha celular cultivada com concentração de 25 mM e de 5 mM de glicose. Também nesta experiência as placas foram preparadas em simultâneo, ou seja, cada placa incubada em condição de hipoxia possui uma placa de controlo, preparada a partir da mesma suspensão celular, que foi incubada em condição de normoxia. As placas foram deixadas durante a noite em incubadora a 37° e 95 % ar e 5 % CO<sub>2</sub>, de modo a permitir a adesão das células. A avaliação do conteúdo proteico foi realizada após 2 e

48 horas de incubação. Para tal, descartou-se o meio de cada poço, lavou-se com PBS. Deixou-se secar ao ar durante 5 minutos e, de modo a fixar as células, foram adicionados a cada poço 300  $\mu$ L de uma solução gelada de ácido acético a 1 % (Panreac 361008) em metanol (Merck K35192409). Após 30 minutos, removeu-se a solução de fixação lavou-se com água ultra-pura, a fim de remover os sais e deixou-se secar. Posteriormente, adicionaram-se 200 $\mu$ L de SRB 0,5 % (Sigma S9012) em ácido acético a 1 %. Após uma hora de incubação à temperatura ambiente e protegidas da luz, as placas foram lavadas com água ultra-pura até eliminar o corante não fixado e, após secar, adicionaram-se 300  $\mu$ L de Tris.NaOH na concentração de 10 mM, pH=10 (Sigma T1503). O conteúdo de cada poço foi homogeneizado, transferido para uma placa de 96 poços e a absorvância da solução foi quantificada a 540nm com um filtro de referência de 690 nm, usando o espectrofotómetro leitor de microplacas. A razão entre a absorvância obtida na condição de hipoxia e a obtida na condição de normoxia fornece informação acerca da alteração do conteúdo proteico.

A viabilidade celular e o ciclo celular das células das três linhas de cancro do cólon também foram avaliados, e para isso recorreu-se à citometria de fluxo. A citometria de fluxo é um método que permite medir e analisar, simultaneamente e num curto período de tempo, múltiplas características físicas e bioquímicas de partículas ou células em suspensão, usando um feixe de luz e fluorocromos apropriados que, após excitação pela luz de um comprimento de onda específico ( $\lambda$ ), emitem luz num outro comprimento de onda característico ( $\lambda'$ ).

Para a análise da viabilidade celular recorreu-se à marcação dupla com a anexina-V e o iodeto de propídeo, o que permite quantificar a viabilidade celular assim como distinguir os diferentes tipos de morte celular, ou seja a necrose e a apoptose. A anexina-V permite identificar as células que se encontram em apoptose, pois este fluorocromo liga-se especificamente à fosfatidilserina, um fosfolípido característico do folheto interno da bicamada lipídica da membrana celular que, na apoptose, transloca para o folheto externo. De forma complementar, o iodeto de propídeo, é um corante que se intercala no DNA das células, marcando os núcleos daquelas que se encontram em apoptose tardia ou necrose. Desta forma é possível distinguir quatro populações: as células vivas; as células que se encontram em apoptose inicial; as células que se encontram em apoptose tardia/necrose; e as células que se encontram em necrose. Com este tipo de abordagem, as células vivas, apresentam-se negativas tanto para a marcação com

anexina-V como para a marcação com iodeto de propídeo., as células em apoptose inicial, apresentam-se positivas para a marcação com anexina-V e negativas para a marcação com o iodeto de propídeo. As células que se apresentam positivas para as duas marcações, consideram-se em apoptose tardia/necrose, enquanto que as células que se encontram em necrose apresentam-se positivas apenas para a marcação com o iodeto de propídeo.

Para avaliar o tipo de morte, as três linhas celulares de cancro do cólon foram cultivadas em concentração de 25 mM e de 5mM de glicose e incubadas durante 2, 24 e 48 horas em condição de normoxia e em condição de hipoxia. Estas culturas, foram destacadas de modo a obter suspensões celulares com  $10^6$  células e foram centrifugadas a 1000 g durante 5 minutos. De seguida, retirou-se o sobrenadante e lavou-se o *pellet* com PBS. Após uma segunda lavagem seguida de centrifugação, o *pellet* foi incubado com uma solução constituída por 100  $\mu$ L de tampão de ligação, 5  $\mu$ L de anexina-V marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e 2  $\mu$ L de iodeto de propídeo (BD Pharmingen 51-65874X), durante 15 minutos à temperatura ambiente, e em ambiente escuro. Após esta incubação, adicionaram-se 400  $\mu$ L de tampão de ligação e efectuou-se a análise no citómetro FACScalibur (BD Biosciences) utilizando o laser de argon com comprimento de onda de excitação a 488 nm e os comprimentos de onda de emissão 530/30 nm para a anexina-V – FITC e 585/42 nm para o iodeto de propídeo, correspondentes aos canais de emissão de fluorescência 1 (FL1) e 2 (FL2), respectivamente. Para a avaliação dos tipos de morte celular, analisaram-se 10000 eventos, que neste caso corresponde ao número de células. Para a análise e quantificação da informação, utilizou-se *software* específico (Paint-a-Gate 3.02, Machintosh Software). Os resultados são mostrados sob a forma de percentagem de células em cada uma das quatro populações referidas.

Para a análise do ciclo celular também foi utilizada a citometria de fluxo com o fluorocromo iodeto de propídeo. A utilização deste fluorocromo prende-se com o facto de o iodeto de propídeo se ligar ao DNA, intercalando-se na dupla cadeia, sendo a quantidade de iodeto de propídeo ligado proporcional à quantidade em DNA. Assim, é possível a quantificação do conteúdo de DNA, o que permite identificar a distribuição de uma população de células nas diferentes fases do ciclo celular, G0/G1, S e G2/ M (Linke et al., 1996).

Para este procedimento culturas das três linhas celulares de cancro do cólon foram preparadas de modo semelhante ao descrito para a avaliação da viabilidade celular. As suspensões celulares obtidas foram centrifugadas a 200 g

durante 5 minutos, e descartou-se o sobrenadante. Adicionaram-se ao *pellet* em agitação 200  $\mu$ L de etanol a 70 % e incubaram-se os tubos durante 30 minutos a 4 °C. Posteriormente procedeu-se à lavagem utilizando 2 mL de PBS com 2 % de albumina de soro bovino (BSA, do inglês *bovine serum albumin*) seguida de centrifugação a 200 g durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e procedeu-se à incubação com 500  $\mu$ L da solução PI/*RNase* (Immunostep), durante 15 minutos em ambiente escuro a 37 °C. A detecção foi realizada no citómetro FACSCalibur utilizando a combinação de excitação e emissão referida para o iodeto de propídeo. Os resultados foram obtidos em percentagem de células existentes em cada fase do ciclo celular: pré-Go, G0/G1, S e G2/M. Para a análise e quantificação da informação, utilizou-se *software* específico (ModFit LT™, Verity Software House).

Através do *western blot*, foi avaliada a expressão de p53 e HIF-2 $\alpha$ , proteínas que possuem um papel importante na resposta das células tumorais de cancro do cólon à hipoxia. Para esta avaliação foi necessário a preparação de extractos de proteína total das três linhas celulares de cancro do cólon cultivadas em concentração de glicose (25 mM e 5 mM) e incubadas durante 2 h, 24 h ou 48 h em condição de normoxia e em condição de hipoxia.

Para este fim utilizaram-se frascos de cultura de 75 cm<sup>2</sup> de células das três linhas celulares de cancro do cólon. Quando a confluência das culturas atingiu valores próximos de 90 %, o meio de cultura foi descartado e, em seguida, as células foram lavadas três vezes com PBS frio. A cada frasco de cultura foram adicionados 350  $\mu$ L de tampão de lise, neste caso RIPA (do inglês, *Radio-Immunoprecipitation Assay Buffer*), constituído por 150 mM de NaCl, 50 mM de Tris; 5 mM de ácido tetracético etileno glicol (EGTA), 1% de Triton, 0,5 % de desoxicolato de sódio e 1 % de dodecil sulfato de sódio (SDS), suplementado no momento de uso com um cocktail de inibidores de proteases, o cOmplete Mini na concentração recomendada (Roche 11836153001) e 1 mM de ditioneitol (DTT). Com o auxílio de raspadores, foi possível soltar e lisar as células da superfície do frasco e transferiu-se o lisado para microtubos que foram mantidos em gelo. Após agitação em vórtex as amostras foram sonicadas três vezes durante cerca de 10 segundos em cada sonicação, utilizando uma amplitude de 30 % de um sonicador *Vibra Cell* (*Sonic and Materials inc. EUA*, modelo: VC50 de 240 V, 50 W e 20 KHz). De seguida, centrifugaram-se as amostras a 14000 g, mantendo a temperatura a 4 °C durante 10 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para novos

microtubos, e depois de devidamente identificados, as amostras foram guardadas numa arca congeladora a uma temperatura de -80 °C.

A quantificação de proteína total foi realizada pelo método do ácido bicinconínico (BCA, do inglês *bicinchoninic acid* (BCA™ *Protein Assay kit*, Pierce). Posteriormente, as amostras foram desnaturadas a 100 °C durante 5 minutos após solubilização em solução desnaturante constituída por 250 mM de Tris-HCl, pH 7,4, 30 % de glicerol (V/V); 10 % de SDS (m/V), 10 mM de β-mercaptoetanol e 0,05 % de azul de bromofenol.

Para a realização da separação de proteínas em SDS-PAGE (do inglês, *Sodium dodecyl sulphate – poly-acrilamide gel electrophoresis*) foram preparados géis de 10 % de acrilamida para a proteína p53 e de 7 % de acrilamida para a proteína HIF-2α. Os géis anteriormente preparados foram posteriormente colocados na tina de electroforese com tampão constituído por 25 mM de Tris, 192 mM de glicina e 0,1 % de SDS, pH 8,3 (Bio-Rad, EUA). À *posteriori* procedeu-se à colocação das amostras e do padrão de pesos moleculares (Precision PlusStandards, Dual Color, Bio-rad, EUA). O protocolo de electroforese consistiu na aplicação de uma diferença de potencial de 80 V durante cerca de 30 minutos que passou depois a 150 V durante o resto do tempo. Terminado o período de electroforese os géis foram colocados em contacto direto com as membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF, do inglês *Polyvinylidene fluoride*; Bio-Rad, EUA) previamente ativadas com metanol.

A electrotransferência realizou-se em tampão 100 mM CAPS (ácido N-ciclohexil-3-aminopropanossulfónico) (Sigma), pH=11, e 10 % de metanol. com uma diferença de potencial de 100 V durante uma hora para a proteína p53, e com uma intensidade de corrente de 340 mA durante uma hora e vinte minutos para a proteína HIF-2α. Após este processo as membranas foram coradas com Ponceau S (P7170 – Sigma), em seguida lavadas para remoção do corante, bloqueadas com solução TBST-BSA a 4 % (do inglês *tris-buffered saline tween-20 – bovine serum albumine*) e, finalmente, digitalizadas.

Posteriormente as membranas foram incubadas com os anticorpos primários p53 (DO-7; Sc-47698 – Santa Cruz Biotech. California, EUA) ou HIF-2α (ab20654 - Abcam, Cambridge, UK) durante a noite a 4 °C, sob agitação constante. No dia seguinte as membranas foram lavadas com TBS-T a 1 % e incubadas com o anticorpo secundário apropriado durante uma hora à temperatura ambiente e sob agitação constante. No final da incubação com o anticorpo secundário as lavagens foram repetidas, e as membranas posteriormente incubadas com substrato

enzimático, ECF (ECF Western Blotting Reagent Pack, Amersham Biosciences, Reino Unido) durante aproximadamente cinco minutos e reveladas utilizando um leitor de fluorescência (Typhoon FLA 9000, Suécia).

As membranas referentes à proteína p53 foram posteriormente activadas e submetidas à imunodeteccção com o anticorpo anti-actina (clone AC-15, A5441 – Sigma) conforme o procedimento descrito para o anticorpo anterior.

Após a aquisição das imagens o processamento das bandas foi realizado recorrendo ao *software* ImageQuant 5.0 (Molecular Dynamics, EUA) através do desenho de regiões de interesse sobre as bandas com peso molecular correspondente às proteínas de interesse, p53 (53 KDa) e HIF-2 $\alpha$  (96 KDa). Para além destas bandas também foram desenhadas regiões de interesse nas bandas de actina e no ponceau. Posteriormente foi realizado o cálculo da razão entre a intensidade da banda da proteína de interesse, p53 ou HIF-2 $\alpha$ , e a intensidade da banda da actina ou da área corada com ponceau (50-150 KDa), respectivamente. Para cada linha celular a condição de normoxia e elevada concentração de glicose (25 mM) foi considerada como padrão, sendo que para a mesma condição de concentração de glicose foram comparadas as diferentes condições de hipoxia durante 2 e 48 horas.

A determinação de peróxidos foi realizada recorrendo ao kit Oxiselect™ (Cell Biolabs). Este ensaio permite a medição de espécies reativas de oxigénio (ROS) nomeadamente os radicais hidroxilo e peróxido. Para a realização deste ensaio foi utilizada uma sonda não fluorescente, o diacetato 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH<sub>2</sub>-DA). Esta sonda atravessa facilmente as membranas biológicas, pelo que, por acção das esterasas intracelulares, os grupos éster são hidrolisados, dando origem a 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH<sub>2</sub>). Na presença de espécies reactivas de oxigénio intracelulares esta molécula é oxidada, libertando-se um composto fluorescente, a 2',7'-diclorofluoresceína (DCF). Neste método, a intensidade de fluorescência, é proporcional à produção de espécies reactivas de oxigénio pela célula, com um limite de sensibilidade de 10 pM.

Assim, para a realização destes estudos nas células das três linhas celulares de cancro do cólon foram distribuídas por placas de 96 poços. A suspensão utilizada continha 80 000 células/mL, sendo que o volume colocado em cada poço foi 300  $\mu$ L. As placas foram incubadas em diferentes condições de pressão parcial de oxigénio como a normoxia e a hipoxia durante 2, 24 e 48 horas. No fim da incubação nos diferentes ambientes, o meio foi retirado e as células foram lavadas

com três vezes com PBS gelado. Posteriormente as células foram incubadas com uma solução de 100  $\mu\text{L}$  de DCFH<sub>2</sub>-DA em meio de cultura durante 30 minutos a 37 °C. Após os 30 minutos de incubação as células foram lavadas novamente com PBS gelado e posteriormente adicionados 200  $\mu\text{L}$  de um tampão de lise celular com posterior agitação durante 5 minutos.

A quantificação foi realizada, após transferência de 150  $\mu\text{L}$  das suspensões anteriores para uma placa opaca de cor preta de 96 poços, utilizando um espectrofotómetro com possibilidade de medir a fluorescência com comprimento de onda de emissão de 480 nm após excitação com um laser de comprimento de onda de 530 nm. Os resultados obtidos foram apresentados para cada linha celular como a razão entre as espécies reactivas de oxigénio em hipoxia relativamente à normoxia, para as duas concentrações de glicose.

A análise estatística dos diversos resultados obtidos foi realizada com recurso ao *software* IBM® SPSS® v. 20.0 (IBM Corporation, Armonk, New York, EUA). Inicialmente foi avaliada a normalidade de distribuição das variáveis segundo o teste de Shapiro-Wilk. No caso de se verificar normalidade da distribuição foram utilizados testes paramétricos; no caso contrário foram usados testes não paramétricos.

Na avaliação da actividade metabólica, do ciclo celular e da produção de ROS, as diferentes condições de oxigenação, hipoxia e normoxia, foram comparadas utilizando o teste ANOVA de um factor, no caso de distribuição normal e homogeneidade de variâncias ou o teste de Kruskal-Wallis, caso contrário. As comparações múltiplas foram realizadas segundo a correcção de Bonferroni. A comparação de ROS com o controlo foi realizada de acordo com o teste t de Student para uma média.

Na avaliação da actividade metabólica e da síntese proteica a comparação entre concentrações de glicose foi realizada com o teste t de Student para amostras independentes (teste paramétrico) ou com o teste de Mann-Whitney (teste não paramétrico).

A comparação da expressão de p53 entre as diferentes condições de oxigenação e de concentração de glicose foi realizada segundo o teste ANOVA de um factor (teste paramétrico, utilizado no caso de normalidade e homogeneidade de variâncias) ou o teste de Kruskal-Wallis (teste não paramétrico), com correcção de Bonferroni aplicada às comparações múltiplas. As comparações com a elevada concentração de glicose e condição de normoxia (para a qual as restantes foram normalizadas) foram determinadas pelo teste t de Student para uma média.

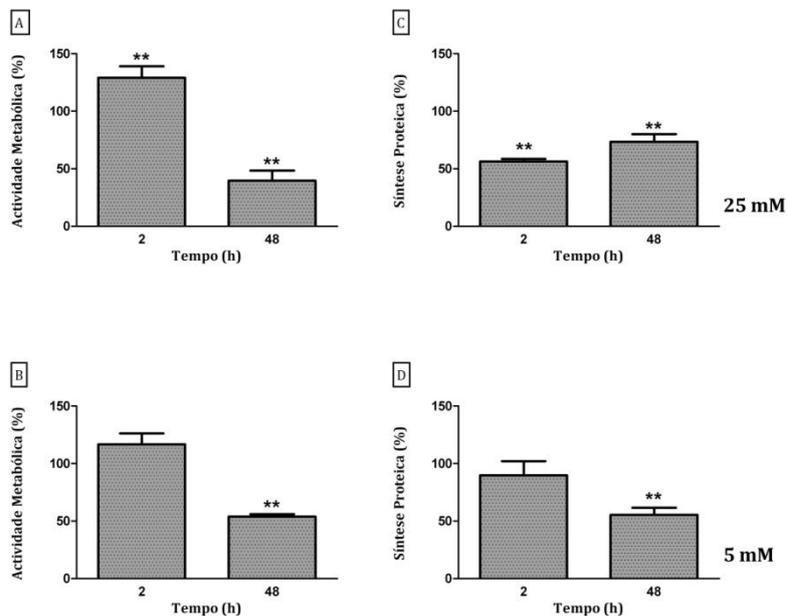
A expressão de HIF-2 $\alpha$  foi comparada entre as diferentes condições de oxigenação e de concentração de glicose utilizando o teste de Kruskal-Wallis, com comparações múltiplas realizadas segundo a correcção de Bonferroni. As comparações com a concentração de glicose e a condição de normoxia (para a qual os restantes valores foram normalizados) foram determinadas pelo teste t de Student para uma média. Considerou-se um erro tipo I de 0,05 para todas as comparações.

## Resultados

Com os métodos descritos anteriormente foi possível averiguar o efeito da hipoxia nas células das diferentes linhas celulares de cancro do cólon a nível da actividade metabólica, síntese proteica, viabilidade celular, ciclo celular e expressão de proteínas como p53e HIF-2 $\alpha$ .

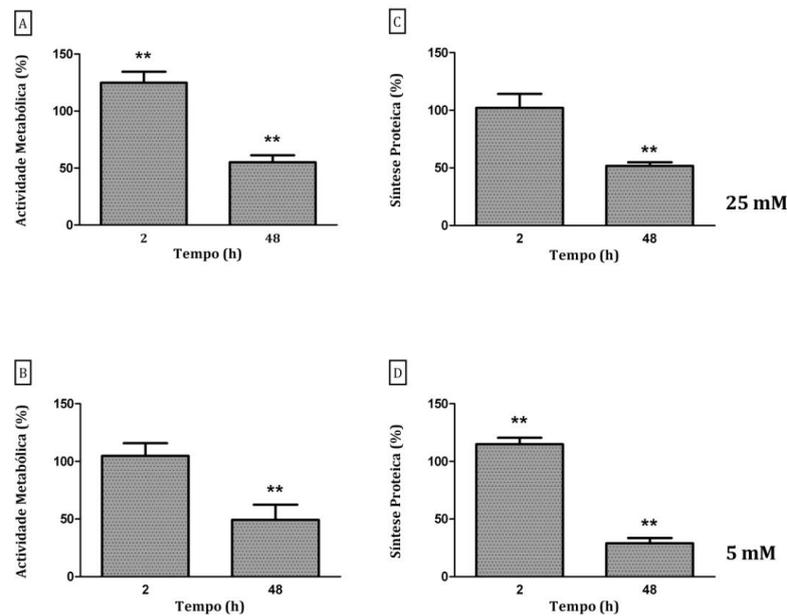
Em condições de elevada concentração de glicose (25 mM) observou-se que, a actividade metabólica da linha celular WiDr aumenta significativamente ( $p < 0,01$ ) 2 horas após a incubação em hipoxia em comparação com a condição de normoxia, no entanto, após 48 horas ocorre uma diminuição significativa ( $p < 0,01$ ) para cerca de 50 %, quando comparado com a condição de normoxia (figura 39-A).

Em condições de reduzida concentração de glicose, 5 mM, observa-se um pequeno aumento sem significância estatística após 2 horas de incubação e, à semelhança dos resultados descritos para 25 mM, ocorre uma diminuição da actividade metabólica ( $p < 0,01$ ) na condição de hipoxia em comparação com a condição de normoxia (figura 39-B). Relativamente à síntese proteica, em condições de elevada concentração de glicose no meio, verificou-se diminuição significativa tanto 2 como 48 horas após incubação em hipoxia quando comparada com a condição de normoxia (figura 39-C). No caso das células cultivadas em 5 mM de glicose verifica-se diminuição significativa da síntese proteica em hipoxia relativamente à condição de normoxia após 48 horas de incubação ( $p < 0,01$ ) (Figura 39-D).



**Figura 39** - Actividade metabólica (A) e (B) e síntese proteica (C) e (D) da linha celular WiDr em condições de elevada ((A) e (C)) e diminuída concentração ((B) e (D)) de glicose no meio, após 2 e 48h de incubação em hipoxia. Os resultados obtidos consideram a condição de normoxia como 100%, e representam a média e o desvio padrão de 4 experiências independentes em duplicado (n=8). As diferenças significativas em relação à condição de normoxia estão assinaladas com \* que corresponde a  $p < 0,05$  e \*\* que corresponde a  $p < 0,01$ .

A linha celular C2BBe1, de um modo geral, respondeu às diferentes condições de forma semelhante à linha celular WiDr. Assim, as células da linha celular C2BBe1 cultivadas em condições de hipoxia e de elevada concentração de glicose no meio (25 mM) 2 horas após a incubação verifica-se que a actividade metabólica aumenta significativamente ( $p < 0,01$ ) e que às 48 horas, existe uma diminuição significativa ( $p < 0,01$ ) em comparação com a condição de normoxia (figura 40-A).

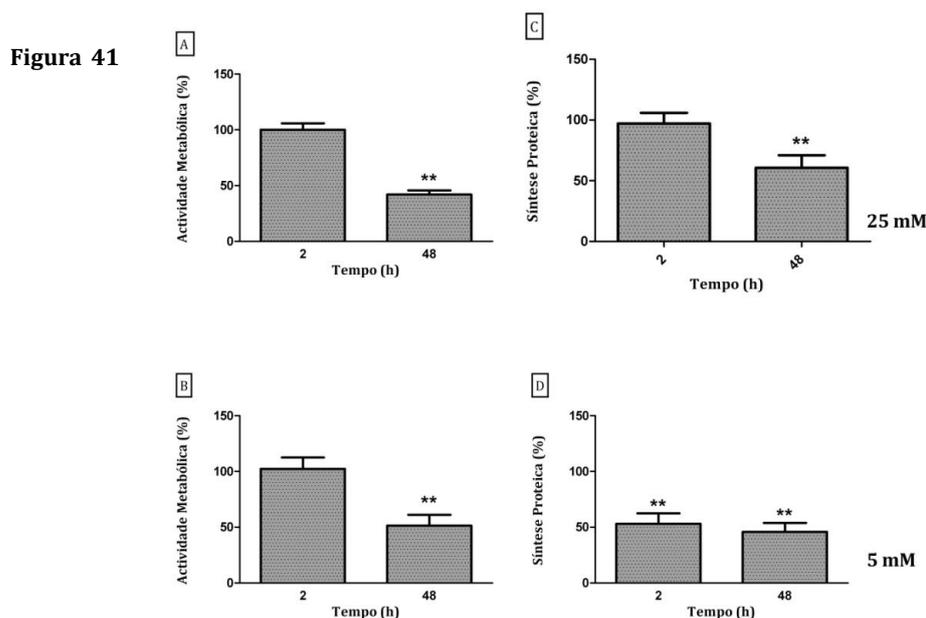


**Figura 40** - Actividade metabólica (A) e (B) e síntese proteica (C) e (D) da linha celular C2BBe1 em condições de elevada ((A) e (C)) e diminuída concentração ((B) e (D)) de glicose no meio, 2 e 48h após incubação em hipoxia. Os resultados obtidos consideram a condição de normoxia como 100%, e representam a média e o desvio padrão de 4 experiências independentes em duplicado (n=8). As diferenças significativas em relação à condição de normoxia estão assinaladas com \* que corresponde a  $p < 0,05$  e \*\* que corresponde a  $p < 0,01$ .

Em condições de diminuída concentração de glicose (5 mM), a actividade metabólica diminui significativamente ( $p < 0,01$ ) 48 horas após a incubação da linha celular C2Bbe1 em hipoxia quando comparada com a condição de normoxia (figura 40-B). No que diz respeito à síntese proteica, em elevada concentração de glicose (25 mM), observa-se diminuição significativa ( $p < 0,01$ ) após 48 horas de incubação em hipoxia (figura 40-C). Relativamente às células cultivadas com baixa concentração de glicose (5 mM) a síntese proteica aumenta significativamente após 2 horas em hipoxia ( $p < 0,01$ ), no entanto após 48 horas de incubação diminui também significativamente ( $p < 0,01$ ) relativamente à normoxia (figura 40-D).

Na figura 41 estão representados os resultados da linha celular LS1034 que revelaram, em ambas as concentrações de glicose no meio, (25 e 5 mM), uma diminuição significativa da actividade metabólica às 48 horas ( $p < 0,01$ ) em relação à normoxia (figura 41- A e B). Quanto à síntese proteica, a linha celular LS1034 não é afectada da mesma forma. Com elevada concentração de glicose, (25 mM), a síntese proteica diminui significativamente ( $p < 0,01$ ) após 48 horas de incubação

(figura 41-C), no entanto, com concentração de glicose diminuída (5 mM), a diminuição da produção de proteínas verifica-se logo após 2 horas de incubação e também 48 horas com significado estatístico ( $p < 0,01$ ) após a incubação em ambiente de hipoxia quando em comparação com a condição de normoxia (figura 41-D).

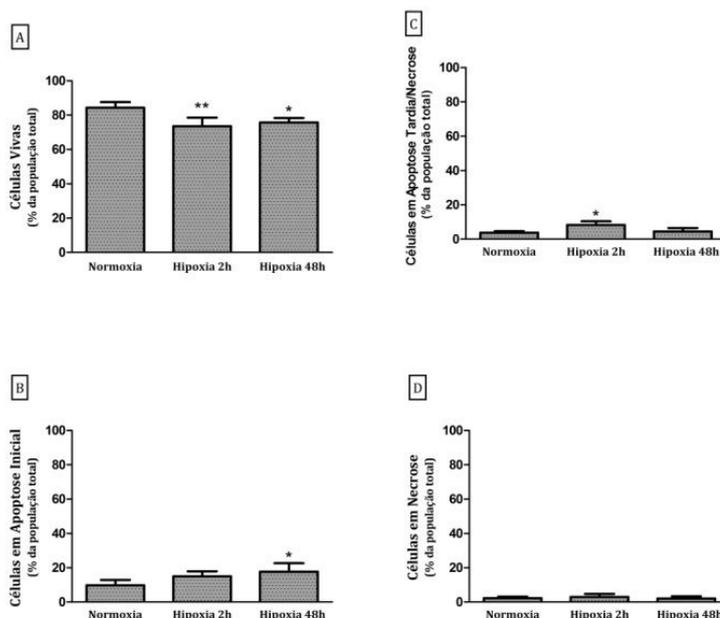


Actividade metabólica (A) e (B) e síntese proteica (C) e (D) da linha celular LS1034 em condições de elevada ((A) e (C)) e diminuída concentração ((B) e (D)) de glicose no meio, 2 e 48h após incubação em hipoxia. Os resultados obtidos consideram a condição de normoxia como 100%, representam a média e o desvio padrão de 4 experiências independentes em duplicado (n=8). As diferenças significativas em relação à condição de normoxia estão assinaladas com \* que corresponde a  $p < 0,05$  e \*\* que corresponde a  $p < 0,01$ .

A figura 42 representa a viabilidade e tipos de morte na linha celular WiDr, cultivada em condições de hipoxia, identificando quatro populações de células, as células vivas, as células em apoptose inicial, as células em apoptose tardia/necrose e as células em necrose. Nesta linha celular observou-se que as condições de hipoxia durante 2 e 48 horas diminuem significativamente ( $p = 0,01$  e  $p = 0,04$ ; respectivamente) a população de células vivas em comparação com a condição de normoxia (figura 42-A).

A diminuição da população de células vivas que se verificou, após 2 horas de incubação em ambiente de hipoxia repercute-se ao nível do aumento significativo

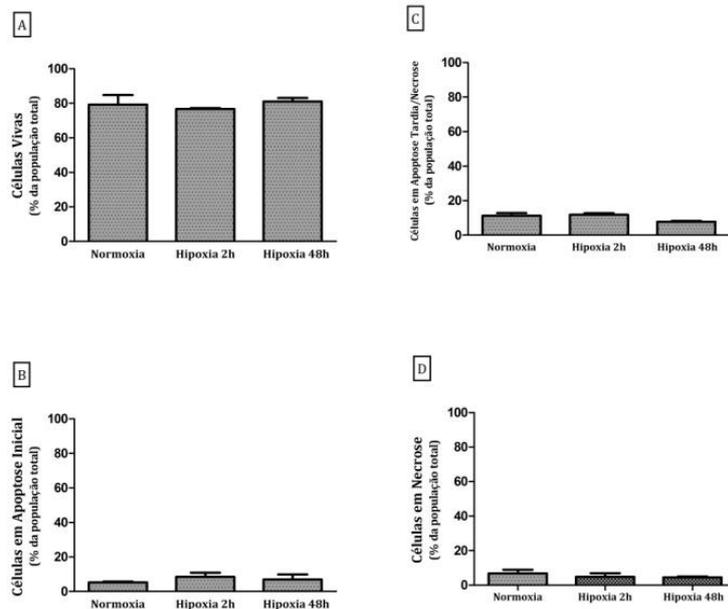
( $p=0,02$ ) da percentagem de células em apoptose tardia/necrose (figura 42-C). Por sua vez, a diminuição da viabilidade celular às 48 horas repercute-se no aumento significativo ( $p=0,048$ ) das células em apoptose inicial (figura 42-B).



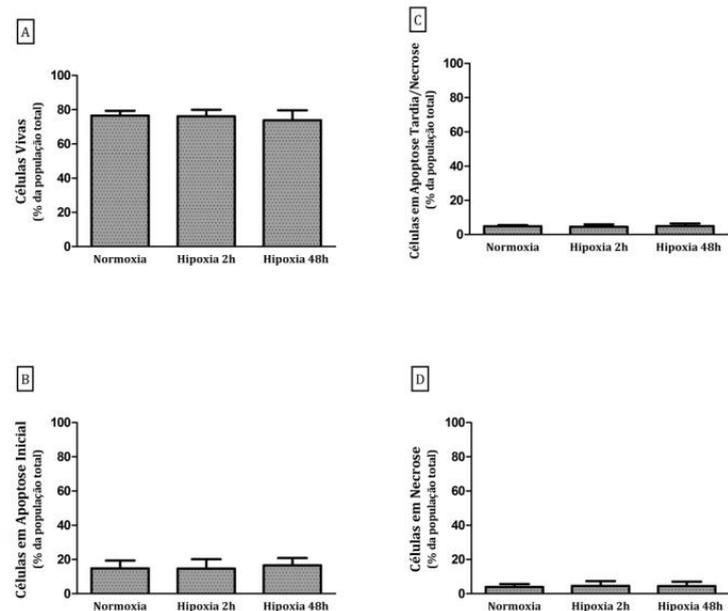
**Figura 42** - Viabilidade celular e tipos de morte da linha celular WiDr analisada na condição de hipoxia por citometria de fluxo recorrendo à dupla marcação com anexina-V e iodeto de propídeo. Os resultados estão representados na forma de percentagem de células vivas (A), em apoptose inicial (B), em apoptose tardia/necrose (C) e em necrose (D). Os resultados expressam a média e o desvio padrão de quatro experiências independentes em duplicado ( $n=8$ ). As diferenças significativas em relação às culturas controlo incubadas em normoxia, estão assinaladas com \* que corresponde a  $p<0,05$  e com \*\* que corresponde a  $p<0,01$ .

A linha celular C2BBE1 não apresenta qualquer alteração na viabilidade celular causada pelas diferentes condições de hipoxia. Desta forma, e tal como representado na figura 43, as diferentes populações de células, isto é, as células vivas, as em apoptose inicial, as em apoptose tardia/necrose e as em necrose não se apresentam diferenças entre a duração da condição de hipoxia e a condição de normoxia.

A linha celular LS1034, à semelhança da linha celular C2BBE1, não apresenta também alterações na viabilidade celular causada pela duração da condição de hipoxia, tal como representado na figura 44.

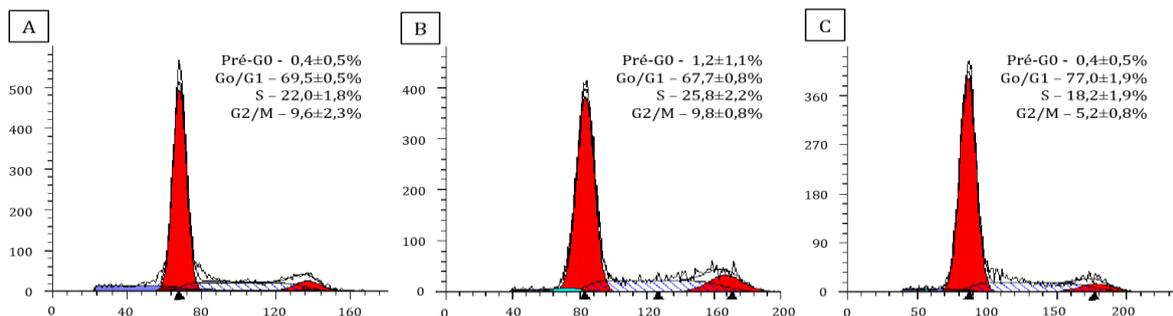


**Figura 43** – Viabilidade celular e tipos de morte da linha celular C2BBE1 analisada na condição de hipoxia por citometria de fluxo recorrendo à dupla marcação com anexina-V e iodeto de propídeo. Os resultados estão representados na forma de percentagem de células vivas (A), em apoptose inicial (B), em apoptose tardia/necrose (C) e em necrose (D). Os resultados expressam a média e o desvio padrão de quatro experiências independentes realizadas em duplicado (n=8).



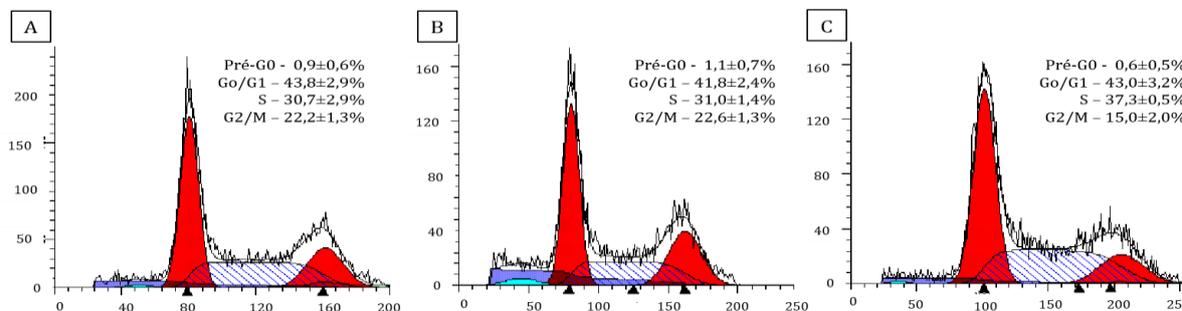
**Figura 44** – Viabilidade celular e tipos de morte da linha celular LS1034 analisada na condição de hipoxia por citometria de fluxo recorrendo à dupla marcação com anexina-V e iodeto de propídeo. Os resultados estão representados na forma de percentagem de células vivas (A), em apoptose inicial (B), em apoptose tardia/necrose (C) e em necrose (D). Os resultados expressam a média e o desvio padrão de quatro experiências independentes realizadas em duplicado (n=8).

A análise do ciclo celular mostrou que a hipoxia possui efeitos ao nível do ciclo celular da linha WiDr. Assim, relativamente ao período de incubação mais prolongado, 48 horas, verifica-se relativamente à condição de normoxia uma diminuição significativa do número de células em fase S ( $p=0,02$ ) e G2/M ( $p=0,031$ ), relativamente à condição de normoxia (figura 45).



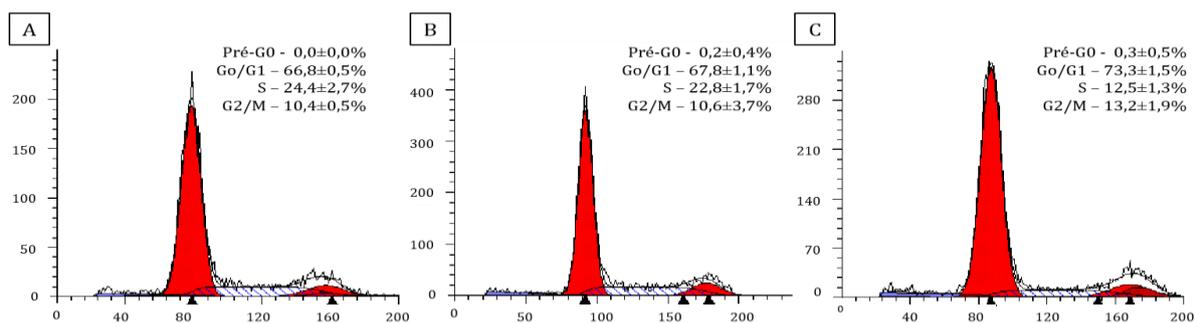
**Figura 45** – Avaliação das populações de células em cada uma das fases do ciclo celular para a linha celular WiDr em condições de normoxia (A), 2 horas de hipoxia (B) e 48 horas de hipoxia (C). Os resultados expressam a média e o desvio padrão de pelo menos quatro experiências independentes realizadas em duplicado ( $n=8$ ). As diferenças significativas em relação ao controlo estão assinaladas com \* que corresponde a  $p<0,05$  e \*\* que corresponde a  $p<0,01$ .

Os resultados obtidos para a linha celular C2BBE1 estão representados na figura 46 e mostram que o efeito da hipoxia é notório após 48 horas de incubação uma vez que ocorre um aumento, com significado estatístico, da população celular em fase S ( $p=0,009$ ) e uma diminuição significativa ( $p<0,001$ ) das células em fase G2/M.



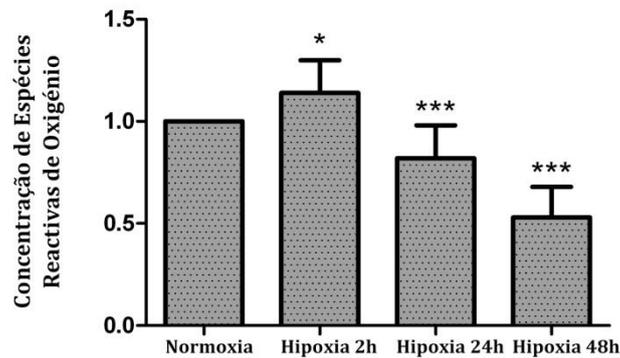
**Figura 46** – Avaliação das populações de células em cada uma das fases do ciclo celular para a linha celular C2BBE1 em condições de normoxia (A), 2 horas de hipoxia (B) e 48 horas de hipoxia (C). Os resultados expressam a média e o desvio padrão de pelo menos quatro experiências independentes realizadas em duplicado ( $n=8$ ). As diferenças significativas em relação ao controlo estão assinaladas com \* que corresponde a  $p<0,05$ , \*\* que corresponde a  $p<0,01$  e \*\*\* que corresponde a  $p<0,001$ .

O ciclo celular da linha celular LS1034, à semelhança da linha celular C2BBE1, é influenciado pela hipoxia durante 48 horas, onde se observa um bloqueio com significado estatístico ( $p=0,008$ ) na fase G0/G1, verificando-se simultaneamente uma redução significativa ( $p<0,001$ ) das células em fase S, tal como representado na figura 47.



**Figura 47** – Avaliação das populações de células em cada uma das fases do ciclo celular para a linha celular LS1034 em condições de normoxia (A), 2 horas de hipoxia (B) e 48 horas de hipoxia (C). Os resultados expressam a média e o desvio padrão de pelo menos quatro experiências independentes realizadas em duplicado ( $n=8$ ). As diferenças significativas em relação ao controlo estão assinaladas com \* que corresponde a  $p<0,05$ , \*\* que corresponde a  $p<0,01$  e \*\*\* que corresponde a  $p<0,001$ .

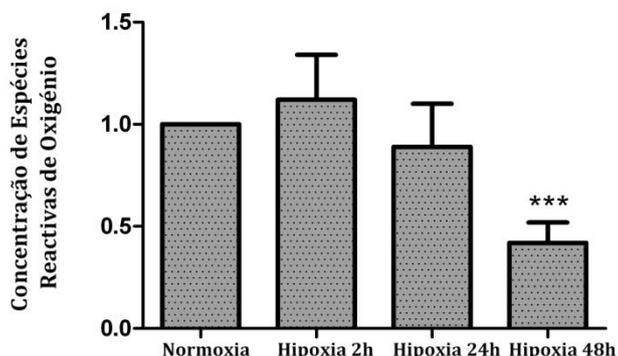
Na avaliação da produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS), verificou-se que na linha celular WiDr, ocorre um aumento significativo ( $p=0,03$ ) duas horas após a incubação desta linha celular em hipoxia, quando comparada com a produção na condição de normoxia. No entanto, com o aumento do tempo de incubação em condição de hipoxia a produção de ROS diminui significativamente em comparação com a produção em ambiente de normoxia quer após 24 horas ( $p=0,001$ ) quer após 48 horas ( $p<0,001$  de incubação em ambiente de hipoxia, quando comparado com o ambiente de normoxia (figura 48).



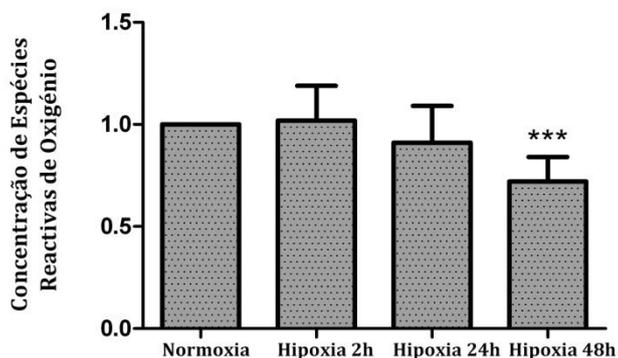
**Figura 48** – Produção de espécies reativas de oxigênio pelas células da linha celular WiDr, 2, 24 e 48 após a incubação em ambiente de hipoxia. Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão de no mínimo 5 experiências independentes em duplicado ( $n=10$ ). As diferenças significativas em relação ao controlo estão assinaladas com \* que corresponde a  $p<0,05$ , \*\* que corresponde a  $p<0,01$  e \*\*\* que corresponde a  $p<0,001$

Quanto à linha celular C2BBE1, observa-se uma tendência para um aumento da produção de ROS após 2 horas de hipoxia, diminuindo depois progressivamente a produção de espécies reativas de oxigênio à medida que aumenta o tempo de incubação. A diminuição da produção de ROS após 48 horas de incubação em ambiente de hipoxia é estatisticamente significativa ( $p<0,001$ ) quando comparada com a condição de normoxia (figura 49).

A linha celular LS1034, ao contrário das restantes linhas celulares, 2 horas de incubação em ambiente de hipoxia não provoca aumento das espécies reativas de oxigênio. No entanto, com o aumento do tempo de incubação na condição de hipoxia, observa-se uma diminuição da produção de ROS, que é estatisticamente significativa ( $p<0,001$ ) para as 48 horas após a incubação em ambiente de hipoxia quando comparada com a produção em condições de normoxia (figura 50).

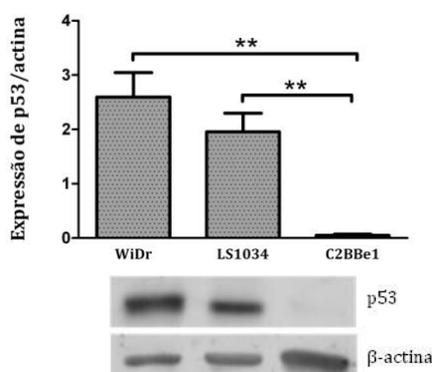


**Figura 49** – Produção de espécies reativas de oxigênio pelas células da linha celular C2BBE1, 2, 24 e 48 após a incubação em ambiente de hipoxia. Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão de 5 experiências independentes em duplicado (n=10). As diferenças significativas em relação ao controle estão assinaladas com \* que corresponde a  $p < 0,05$ , \*\* que corresponde a  $p < 0,01$  e \*\*\* que corresponde a  $p < 0,001$ .



**Figura 50** – Produção de espécies reativas de oxigênio pelas células da linha celular LS1034, 2, 24 e 48 após a incubação em ambiente de hipoxia. Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão de 5 experiências independentes em duplicado (n=10). As diferenças significativas em relação ao controle estão assinaladas com \* que corresponde a  $p < 0,05$ , \*\* que corresponde a  $p < 0,01$  e \*\*\* que corresponde a  $p < 0,001$ .

A expressão de proteína p53 nas três linhas celulares está representada na figura 51. A expressão da p53 na linha celular C2BBE1 é significativamente mais baixa, quase inexistente, quando comparada com as linhas celulares WiDr ( $p < 0,001$ ) e LS1034 ( $p < 0,001$ ). Quando comparada a expressão de p53 entre as duas linhas com maior expressão (WiDr e LS1034) não se verificaram diferenças significativas.

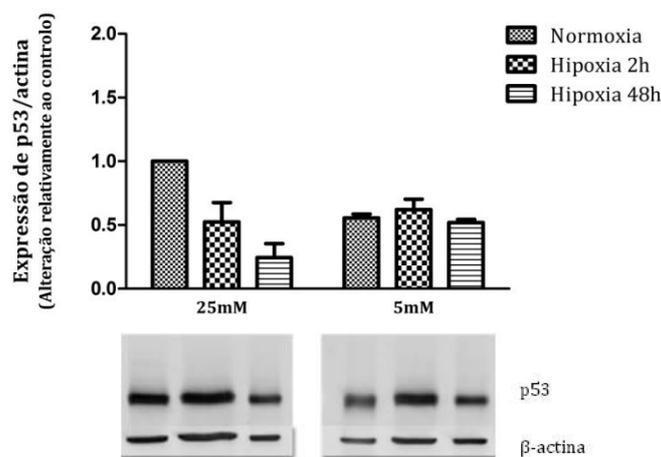


**Figura 51** – Expressão da proteína p53 nas linhas celulares WiDr, LS1034 e C2BBe1. Os resultados expressam a média e o desvio padrão de pelo menos quatro experiências independentes. As diferenças significativas em relação ao controlo estão assinaladas com \* que corresponde a  $p < 0,05$ , \*\* que corresponde a  $p < 0,01$  e \*\*\* que corresponde a  $p < 0,001$ .

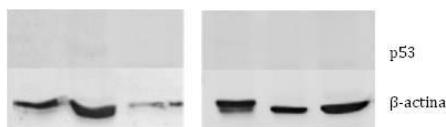
Quando avaliada a influência da hipoxia na expressão da proteína p53 em cada linha celular tendo em conta diferentes concentrações de glicose no meio, verificou-se que a expressão desta proteína pode ser alterada.

A figura 52 mostra o que acontece nas células da linha celular WiDr nas condições de elevada concentração de glicose. Nesta condição (25 mM de glicose no meio) há uma tendência para a diminuição da expressão da p53 com o aumento do tempo de exposição à hipoxia, no entanto, esta diminuição não tem significado estatístico. Em condições de diminuída concentração de glicose no meio (5 mM) também ocorre diminuição, embora sem significado estatístico, da expressão p53, qualquer que tenha sido a duração da condição de hipoxia.

Na linha celular C2BBe1, cuja expressão de p53 está representada na figura 53, todas as condições de oxigenação conduzem a uma praticamente ausência da expressão de p53. Desta forma as imagens obtidas não foram quantificadas.

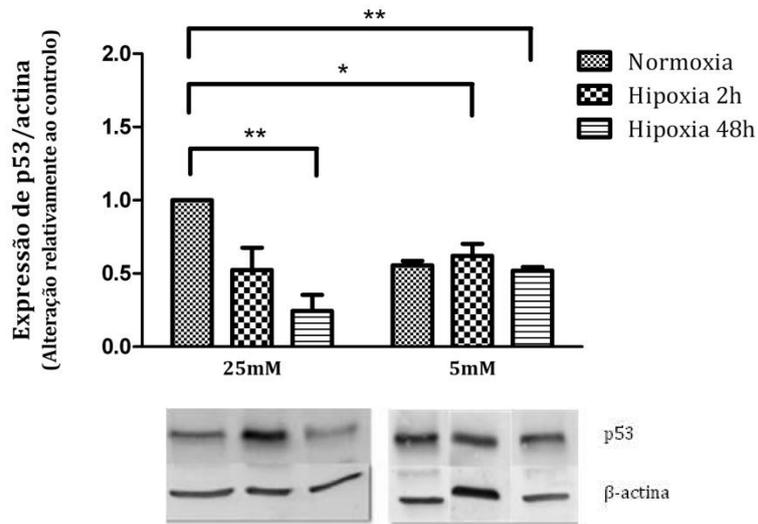


**Figura 52** – Expressão da proteína p53 na linha celular WiDr. Os resultados expressam a alteração da expressão da p53 em relação à actina relativamente à condição de normoxia. O gráfico representa a média e o desvio padrão de pelo menos três experiências independentes.



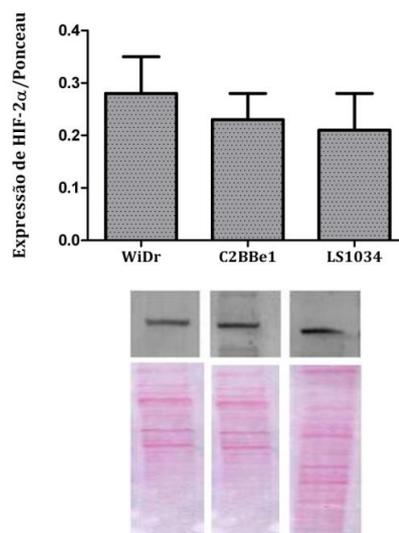
**Figura 53** – Expressão da proteína p53 na linha celular C2BBE1. Os resultados expressam a alteração da expressão da p53 em relação à actina relativamente à condição de normoxia em concentração elevada de glicose. O gráfico representa a média e o desvio padrão de pelo menos três experiências independentes.

A linha celular LS1034, revela uma diminuição consistente da expressão da proteína p53 em todas as condições quando comparada com a expressão na condição de normoxia e com a concentração de 25 mM de glicose no meio. Porém a diminuição só é significativa, quando a concentração de glicose no meio é de 25 mM e com a condição de hipoxia de 48 horas ( $p=0,002$ ) e quando a concentração de glicose no meio foi de 5 mM e a duração da hipoxia foi de 2 horas ( $p=0,015$ ) e de 48 horas ( $p=0,005$ ) (figura 54).



**Figura 54** – Expressão da proteína p53 na linha celular LS1034. O gráfico representa a média  $\pm$  desvio padrão de pelo menos três experiências independentes. As diferenças significativas estão assinaladas com \* que corresponde a  $p < 0,05$  e com \*\* que corresponde a  $p < 0,01$ .

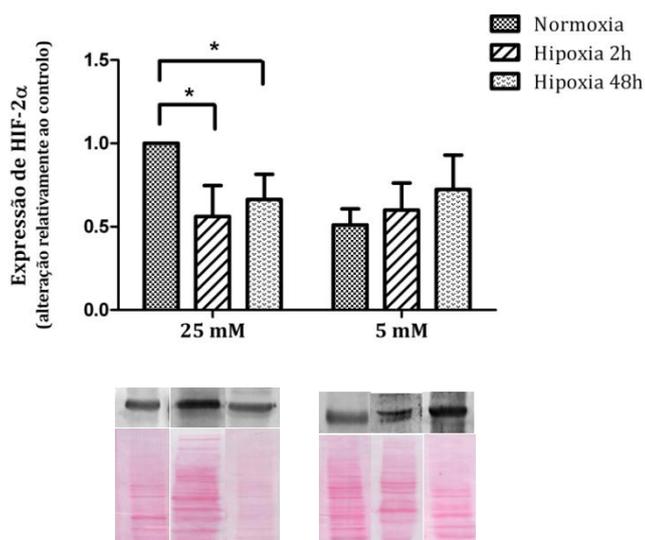
Quando avaliada a expressão da proteína HIF-2 $\alpha$ , á semelhança do sucedido para a proteína p53, foi avaliada a expressão da proteína HIF-2 $\alpha$  nas três linhas celulares. Assim, e de acordo com figura 55 observou-se que relativamente à expressão da proteína HIF-2 $\alpha$  não existem diferenças de expressão nas três linhas celulares.



**Figura 55** – Expressão da proteína HIF-2 $\alpha$  nas linhas celulares WiDr, LS1034 e C2BBE1. Os resultados expressam a média e o desvio padrão de pelo menos quatro experiências independentes.

Quando avaliada o efeito das diferentes condições de hipoxia e das concentrações de glicose no meio, relativamente à linha celular WiDr, observou-se que com a concentração de glicose no meio de 25 mM, para qualquer condição de hipoxia 2 ou 48 horas, a expressão da proteína HIF-2 $\alpha$  é sempre inferior à condição de normoxia, tendo essa diferença significado estatístico para ambas as condições de hipoxia 2 ( $p=0,035$ ) e 48 horas ( $p=0,025$ ).

Quando a concentração de glicose no meio é de 5 mM verifica-se um progressivo aumento da expressão de HIF-2 $\alpha$ , à medida que aumenta o tempo de incubação em hipoxia, no entanto relativamente à condição de elevada concentração de glicose, 25 mM e de normoxia não existem diferenças com significado estatístico (figura 56).

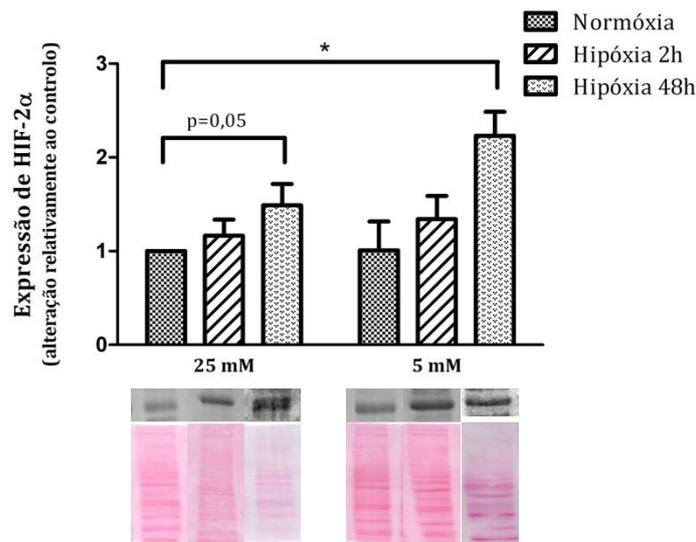


**Figura 56** – Expressão da proteína HIF-2 $\alpha$  nas células da linha celular WiDr. O gráfico representa a média  $\pm$  desvio padrão de pelo menos três experiências independentes. As comparações efectuadas das condições de hipoxia foram realizadas considerando como controlo a condição de normoxia da mesma concentração de glicose no meio. As diferenças significativas estão assinaladas com \* que corresponde a  $p < 0,05$ .

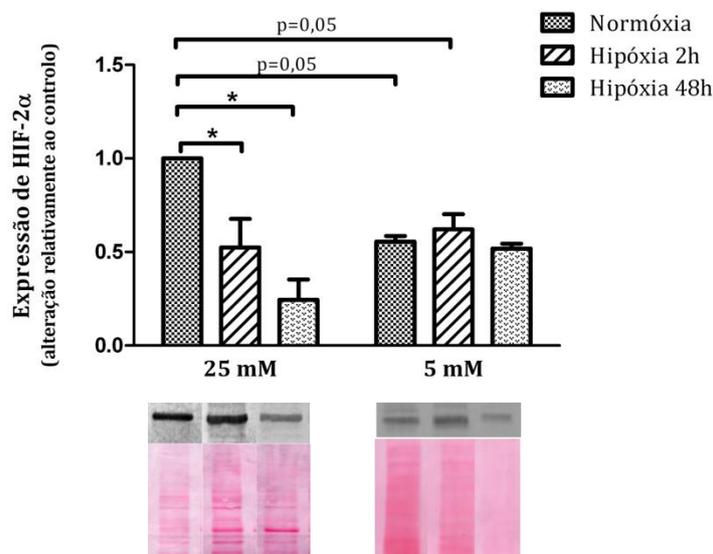
Na linha celular C2BBE1 a expressão de HIF-2 $\alpha$  possui um perfil distinto da linha celular WiDr, como representado na figura 57. Quando a concentração de glicose no meio é de 25 mM a expressão do Hif-2 $\alpha$  tem tendência a aumentar com o aumento do tempo de incubação em hipoxia, sendo o aumento significativo para 48 horas de incubação em ambiente de hipoxia ( $p=0,05$ ). O mesmo acontece quando a concentração de glicose no meio é de 5 mM sendo que após 48 horas de

incubação na condição de hipoxia este aumento torna-se significativo, relativamente à condição de normoxia e 25 mM de concentração de glicose no meio ( $p=0,035$ ).

A expressão de HIF-2 $\alpha$  na linha celular LS1034, representada na figura 58, quando a concentração de glicose no meio foi de 25 mM diminui significativamente após 2 horas ( $p=0,025$ ) e 48 horas ( $0,035$ ) de incubação em hipoxia. Quando a concentração de glicose no meio é de 5 mM observou-se que em relação à condição de normóxia 25 mM ocorre a diminuição da expressão da proteína HIF-2 $\alpha$ . A diminuição verifica-se com significado estatístico nas condições de normóxia ( $p=0,05$ ) e 2 horas em condição de hipoxia ( $p=0,05$ ).



**Figura 57** – Expressão da proteína HIF-2 $\alpha$  nas células da linha celular C2BBE1. O gráfico representa a média  $\pm$  desvio padrão de pelo menos três experiências independentes. As diferenças significativas estão assinaladas com \* que corresponde a  $p<0,05$ .



**Figura 58** – Expressão da proteína HIF-2 $\alpha$  na linha celular LS1034. O gráfico representa a média  $\pm$  desvio padrão de pelo menos três experiências independentes. As diferenças significativas estão assinaladas com \* que corresponde a  $p < 0,05$  e com \*\* que corresponde a  $p < 0,01$ .

## Discussão

A proliferação e viabilidade da célula tumoral podem ser influenciadas por inúmeros factores que podem alterar o seu comportamento, modificando assim a sua resposta a diferentes estímulos.

A proliferação celular é um dos objectivos da vida de uma célula tumoral. Este propósito inclui diferentes processos, que são influenciados por inúmeros factores, entre eles o ambiente em que a célula se encontra. A hipóxia constitui uma condição decisiva quando a célula tumoral é parte integrante de um tumor sólido que se caracteriza essencialmente por um microambiente heterogéneo.

A actividade metabólica, assim como a síntese proteica, constituem processos que podem ser afectados pela hipóxia, dependendo do tempo durante o qual as células estão expostas a essa condição.

De acordo com a bibliografia, a hipóxia por um período prolongado, 48 horas, parece contribuir para a diminuição da proliferação celular enquanto que a hipóxia por um período mais curto, 2 horas, condiciona a migração celular, a

invasão e a sobrevivência clonogénica. Estas alterações funcionais têm implicações, pois curtos períodos de privação de oxigénio são mais eficientes no incremento do fenótipo metastático (Stempien-Otero, 1999; Dai *et al.*, 2011;). Assim, e tendo em conta os resultados obtidos neste trabalho, para a incubação de hipoxia durante o período de 48 horas, era de esperar redução notória ao nível do conteúdo proteico e da actividade metabólica o que se verificou nas três linhas celulares para ambas as concentrações de glicose no meio de cultura. No entanto, e reportando ao período de incubação de 2 horas em hipoxia, o que acontece é a conservação ou mesmo aumento da actividade metabólica e da síntese proteica.

São escassas as referências de trabalhos realizados com estas técnicas em células submetidas a um período de hipoxia considerado curto, no entanto, pensa-se que o aumento que se verifica consiste numa resposta imediata ao stress causado pela hipoxia, sendo que na maioria das vezes não existe alteração da actividade metabólica nem da síntese proteica. A maioria dos estudos reporta resultados na alteração destas actividades celulares para períodos de incubação superiores a 24 horas (Wickramasinghe *et al.*, 2005).

Delineando os mecanismos através dos quais a hipoxia afecta a fisiologia tumoral a nível celular e molecular é de salientar que, uma das bem caracterizadas consequências da hipoxia é a pronunciada diminuição da taxa de consumo de oxigénio e do *turnover* energético (Koumenis *et al.*, 2002). Estima-se que em condições de hipoxia severa, a necessidade de ATP para a síntese proteica diminua em cerca de 7% comparativamente com as células em normoxia. Esta diminuição está relacionada com uma diminuição rápida e substancial na taxa de síntese proteica, que ocorre inicialmente ao nível da translação e mais tarde se estende ao nível da transcrição. No entanto, todos estes processos, durante as primeiras duas horas em que uma célula está sujeita à hipoxia podem ainda não ser afectados. Também as alterações proteómicas induzidas pela hipoxia, no tumor e nas respectivas células do estroma, podem promover a propagação do tumor, não permitindo que as células se adaptem à privação de nutrientes ou então permitindo que escapem ao ambiente hostil, muitas vezes estimulando a transcrição de enzimas glicolíticas, transportadores de glicose, factores angiogénicos e factores de sobrevivência e de crescimento celular (Pettersen *et al.*, 1986; Höckel & Vaupel, 2001; Koumenis *et al.*, 2002).

Tendo em conta a linha celular WiDr, 2 horas após a incubação em hipoxia verificou-se uma diminuição significativa do conteúdo proteico. Este resultado parece estar relacionado com os resultados obtidos para a viabilidade nos quais se

verifica um aumento de morte por apoptose tardia/necrose. Apesar desta diminuição se verificar apenas para a condição de elevada concentração de glicose no meio de cultura, a linha celular WiDr é a única em que este efeito se verifica logo após duas horas em hipóxia. Esta diminuição do conteúdo proteico é certamente devida à diminuição da viabilidade celular em cerca de 10 % que se traduz em morte por apoptose tardia/necrose. Por outro lado, em resposta à condição de hipoxia de 48 horas de incubação nesta condição, o tipo de morte que se verifica é a apoptose. A justificação deste facto deverá estar na dependência das características próprias de cada tipo de morte. Sendo a necrose resultado de uma perturbação metabólica aguda na célula, a apoptose, em contraste, representa uma forma de execução de um programa de morte celular iniciada por um estímulo específico. Apesar destes dois tipos de morte serem distintos, existem factos que apontam para que possam constituir frequentemente consequência dos mesmos factores que iniciam o processo e das mesmas vias de sinalização (Lemasters, 1999; 2005). Assim, e de acordo com os resultados obtidos nesta linha celular para a condição de 48 horas de incubação em hipoxia ocorre diminuição do conteúdo proteico e da actividade metabólica, que possuem relação com a diminuição da viabilidade provocando morte das células. A diminuição da concentração de proteínas assim como da actividade enzimática podem constituir condicionantes dos *checkpoints* do ciclo celular que levam ao bloqueio da progressão do ciclo celular na fase G0/G1.

As alterações induzidas pela hipoxia podem conduzir à paragem no ciclo celular, diferenciação, apoptose e necrose, o que pode explicar as micrometástases quiescentes ou o retardamento do desenvolvimento de um tumor de grande massa (Höckel & Vaupel, 2001; Vaupel & Harrison, 2004).

Outra consequência *major* da hipoxia é a paragem na proliferação das células tal como ficou subentendido pela diminuição da actividade metabólica, nas três linhas celulares no período de incubação das 48 horas de hipoxia, revelada pelo ensaio do MTT e a diminuição do conteúdo proteico revelado pelo ensaio do SRB. Para além da viabilidade também o ciclo celular foi analisado com concentração de 25 mM de glicose no meio de cultura. Confirmou-se que, como descrito, a hipoxia constitui uma condição que provoca alterações no ciclo celular (Graeber *et al.*, 1994b; Webster *et al.*, 1998; Chan *et al.*, 2007).

O ciclo celular é constituído por duas fases, a interfase e a mitose. A interfase por sua vez é dividida em três fases. A fase G1 é a fase em que ocorre a síntese de inúmeras proteínas, enzimas e RNA, para além da formação de

organelos celulares, o que conseqüentemente, provoca o crescimento da célula. Na fase S ocorre a auto-replicação das moléculas de DNA. Na última fase, a fase G2 dá-se a síntese de moléculas necessárias à divisão celular, como são exemplo os centríolos. A mitose, fase M, ocorre posteriormente, e durante esta fase o crescimento da célula cessa e o gasto de energia encontra-se focado na divisão de uma célula em duas. Uma vantagem da célula tumoral é a capacidade de reter a sua viabilidade mesmo num ambiente de stresse como o que é causado pela hipoxia. Assim, tendo em conta os resultados já discutidos, esta característica é parcialmente controlada por alterações na proliferação celular que incluem processos como a síntese proteica e a actividade metabólica. De acordo com a necessidade de diminuir a utilização de energia em condições de baixa concentração de oxigénio, a hipoxia induz paragem no ciclo celular, preferencialmente na fase G1 ou na transição da fase G1 para a S (Green & Giaccia, 1998). As células na fase S tardia, G2 ou M finalizarão a divisão celular e posteriormente, irão parar na fase G1, a menos que a hipoxia seja durante um longo período de tempo – hipoxia severa (Box & Demetrick, 2004; Kondoh, 2008). Nesta situação de hipoxia severa ocorre paragem total do ciclo celular em dois pontos: na metáfase e na pré-fase S (Douglas *et al.*, 2005). As células na fase G1 ou na fase S inicial permanecerão nestas fases, já que a paragem na fase S inicial é obrigatória tendo em conta a necessidade de energia para a finalização da síntese de DNA (Green & Giaccia, 1998). Para além disto, de acordo com diferentes autores, as células que se encontram nas fases inicial e intermédia da fase S não progridem no ciclo face à diminuição da pressão parcial de oxigénio. No entanto, quando as células se encontram numa fase mais tardia da fase S, G2 ou mitose, reúnem condições para progridirem no ciclo até à divisão (Amellem & Pettersen, 1991; Pires *et al.*, 2010). É de ter em conta que a metodologia utilizada para a avaliação do ciclo celular, baseia-se na quantificação do conteúdo de DNA em cada célula. A análise realizada permitiu verificar para a linha celular WiDr, diminuição das populações de células em fase S e em G2, certamente conseqüente do bloqueio de células na fase G1 ou em fase S inicial. Também na linha celular LS1034, os resultados vão de encontro ao descrito anteriormente por vários autores, na medida em que se verificou aumento da população de células em G1 e diminuição da população em fase S, que também se pode associar ao impedimento da progressão do ciclo celular de células em G1 e fase S inicial, causado pela hipóxia. Em oposição, na linha celular C2BBE1, verificou-se um aumento da população de células em fase S e diminuição da população em G2/M, compatível com a paragem

do ciclo durante a síntese do DNA. O facto da linha celular C2BBe1 possuir um comportamento distinto das restantes em resposta à hipóxia pode dever-se ao facto desta linha celular possuir uma baixa, ou quase inexistente, expressão de p53. Esta proteína como reguladora do ciclo celular na presença de alguma alteração na célula faz com que ocorra paragem no ciclo celular na fase G1 e S (Agarwal *et al.*, 1995). Assim, perante esta resposta, poder-se-à especular que a linha celular C2BBe1, terá uma sensibilidade inferior à hipóxia, e, mesmo quando exposta a uma pressão parcial de oxigénio baixa igual à das outras linhas celulares, ignora e progride no ciclo celular vendo-se mais tarde, incapaz de finalizar o processo crítico que é a síntese de DNA, por falta de ATP.

Espécies reactivas de oxigénio é um conceito que engloba uma variedade de moléculas e radicais livres derivados do oxigénio e que possuem na célula um papel controverso. O stresse oxidativo descreve um desequilíbrio entre a formação excessiva de ROS e/ou espécies reactivas de nitrogénio e defesas antioxidantes limitadas. Desta forma, pequenas oscilações nas concentrações do estado basal destes oxidantes possuem um papel importante na sinalização intracelular (Turrens, 2003). Aquando da diminuição dos níveis intracelulares de oxigénio, a produção de energia está comprometida e, desta forma a redução do oxigénio é incompleta e pode ocorrer uma diminuição do potencial de membrana mitocondrial. Desta maneira, é justificado o aumento das ROS em condições de hipoxia, o que ocorre nas três linhas celulares apenas para o período de incubação de 2h, com significado para a linha celular WiDr (Abrantes *et al.*, 2010). Uma possível justificação para este aumento em hipoxia aguda reside no facto de que a produção de ROS pode acontecer simultaneamente através da NADPH oxidase membranar ou pelo citocromo P450, responsáveis pela transferência de electrões capazes de formar espécies reactivas de oxigénio (Bell *et al.*, 2007) O aumento significativo na linha celular WiDr pode estar relacionado com o facto de que esta constitui a única linha celular em que é observada morte celular 2 horas a incubação em ambiente de hipóxia. A produção de espécies reactivas de oxigénio, 48 h após a incubação em ambiente de hipoxia, diminui significativamente em todas as linhas celulares estudadas. Assim, e de acordo com Turrens *et al.* 1982, a taxa de formação de pela cadeia respiratória é controlada essencialmente pela presença de oxigénio, aumentando quando o fluxo de electrões diminui, por aumento da concentração de dadores de electrões, e quando a concentração de oxigénio aumenta (Turrens *et al.*, 1982). Para além deste factor, 48 horas de incubação em ambiente de hipoxia possivelmente proporciona a conversão destas

espécies em outras não mensuráveis com a técnica utilizada, o que explica a diminuição com significado estatístico obtido.

Outros estudos defendem que a diminuição dos níveis de oxigénio intracelulares, que provoca a diminuição das espécies reactivas de oxigénio, tem como consequência a regulação de uma resposta programada que permite que a célula permaneça num estado de latência, promovendo assim a senescência celular (Packer & Fuehr, 1977; Parrinello *et al.*, 2003; Welford & Giaccia, 2011). Esta teoria pode estar em concordância com os resultados obtidos, nomeadamente, a diminuição na actividade metabólica e na síntese proteica, para além da alteração ao nível do ciclo celular. Assim, e tendo em conta os controlos, células em normoxia, das experiências de determinação da actividade metabólica e do conteúdo proteico, a diminuição observada em condições de hipoxia, em relação a uma população de células não sofreram qualquer estímulo, pode simplesmente significar o estado quiescente das células em condições de hipoxia relativamente à normoxia. Este estado quiescente pode ser corroborado pela paragem no ciclo celular, em fase G0/G1, das linhas celulares WiDr e LS1034.

Na verdade, existem inúmeros factores que podem alterar a resposta de uma célula a um determinado estímulo. A hipoxia constitui um estímulo capaz de despoletar diferentes respostas em linhas celulares do mesmo tipo de cancro, como é o caso do cancro do cólon. Subjacente a este facto está o *background* genético de cada linha celular em estudo, sendo que neste trabalho foram estudadas três linhas celulares de cancro do cólon com diferentes características.

A p53 constitui uma das proteínas mais estudadas ao nível do seu papel no cancro. Tem vindo a ser demonstrado que mutações associadas à proteína p53 podem provocar alterações na célula que são muito diferentes relativamente às alterações causadas pela simples perda da função supressora da proteína p53 *wild-type*. Muitas destas proteínas com mutações adquirem propriedades oncogénicas que permitem à célula adquirir capacidades para a invasão, metastização, proliferação e sobrevivência celular (Muller & Vousden, 2013). As linhas celulares utilizadas neste trabalho, tal como descrito no subcapítulo anterior apresentam mutações nesta proteína. A linha celular WiDr possui uma mutação ao nível do codão 273 do gene TP53 que origina a substituição do aminoácido arginina por histidina na proteína p53, mutação não tão frequente como a do codão 175 que provoca a mesma substituição de aminoácido e em que a função biológica desta proteína é alterada (Garcia-Barreno *et al.*, 1992). A linha celular LS1034, tal como a linha celular WiDr, possui uma mutação, mas neste caso na posição 245 que se

traduz na substituição da glicina por serina. Esta mutação é bastante frequente em tumores e tornar a proteína inactiva (Casalta-Lopes, 2011; Liu & Bodmer, 2006; Suardet *et al.*, 1992). A terceira linha celular utilizada é a linha celular C2BBe1, clone da linha celular Caco-2 obtida por diluição limitante. Relativamente a esta linha celular, a informação acerca da p53 não está descrita, no entanto, para a linha celular que lhe deu origem, a CaCo-2, está descrita mutação no codão 204, que se traduz na substituição da glicina por timina. Esta mutação conduz à paragem da síntese da proteína pela tradução de um codão *stop*. De acordo com os resultados obtidos, a linha celular C2BBe1 apresenta uma expressão da proteína p53 muito inferior à das restantes linhas celulares, considerada quase como inexistente. Desta forma, esta linha celular revela que a mutação presente, a qual provoca paragem na síntese da proteína, poderá justificar a quase inexistente expressão da proteína.

Relativamente às linhas celulares WiDr e LS1034, observou-se que a condição de reduzida pressão parcial de oxigénio provoca uma diminuição na expressão de p53. Relativamente à expressão do HIF-2 $\alpha$  nestas linhas celulares observa-se também que em hipoxia ocorre uma diminuição da sua expressão, Ao contrário, na linha celular C2Bbe1 em condições de hipoxia a expressão de HIF-2 $\alpha$  aumenta.

A proteína HIF-2 $\alpha$ , constitui uma proteína moduladora chave da resposta transcripcional do stresse causado pela hipoxia. Para além da sua função adaptativa na resposta ao stresse da célula, alguns estudos revelaram o papel importante da proteína HIF nos processos fisiológicos e fisiopatológicos. Apesar de existirem alguns estudos, não há evidências de que a expressão da proteína p53 promova a expressão de HIF-2 $\alpha$  e vice-versa. São conhecidos resultados em linhas celulares em que a diminuição da expressão de HIF-2 $\alpha$  induz o aumento de espécies reactivas de oxigénio, a activação da p53 e a morte celular. Estes efeitos são incrementados pelos efeitos da radiação ionizante, terapêutica, que tendo em conta o seu princípio da acção, aumenta significativamente a produção de espécies reactivas de oxigénio a partir da radiólise da água e da presença de oxigénio (Majmundar *et al.*, 2010). Assim, em condições de diminuída pressão parcial de oxigénio, ou até mesmo na sua ausência, e tendo em conta os resultados obtidos poderá fazer sentido existir uma regulação da proteína HIF-2 $\alpha$  pela p53 ou vice-versa, verificando-se que aquando da ausência desta proteína, como é o caso da linha celular C2BBe1, não ocorre a regulação descrita anteriormente, favorecendo o aumento da expressão de HIF-2 $\alpha$  em condições de hipóxia.

## Capítulo VI

# Metabonómica da Hipoxia



## Introdução

Há quase 90 anos atrás, que Otto Warburg (1930) descreveu pela primeira vez a preferência das células tumorais para converter a glicose em lactato, mesmo na presença de oxigénio. No entanto e apesar de este assunto ser alvo de estudo aprofundado permanecem ainda muitas dúvidas.

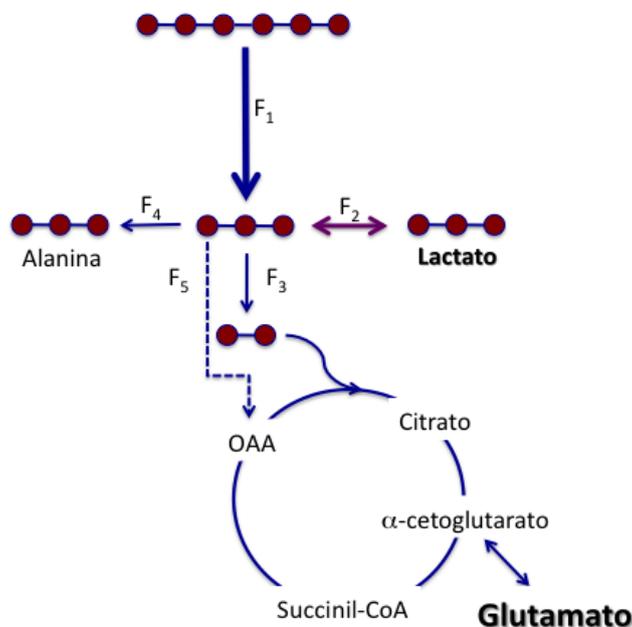
Como observado nos capítulos anteriores apesar das três linhas celulares serem de cancro do cólon, a expressão de proteínas, a captação de radiofármacos, a viabilidade celular e mesmo a actividade metabólica diferem entre as diferentes linhas quando expostas a ambiente de baixa pO<sub>2</sub>. Neste sentido este capítulo através da espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear, tem como objectivo a quantificação da resposta metabólica dinâmica das células do cancro do cólon ao estímulo que constitui a alteração das condições do microambiente tumoral dos tumores sólidos, como é exemplo a hipoxia.

## Métodos e Material

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) assumiu um papel de destaque na análise metabólica tanto *in vivo* como *in vitro* e *ex vivo*. Este protagonismo advém, essencialmente, do seu carácter não destrutivo, possibilitando a sua utilização em estudos clínicos e também da informação única, que providencia acerca de vias metabólicas específicas quando associada à utilização de marcadores isotópicos estáveis, nomeadamente metabolitos enriquecidos em carbono-13 (<sup>13</sup>C) e/ou em deutério (<sup>2</sup>H). Esta metodologia de análise de isótopos estáveis por RMN é frequentemente referida como análise de isotopómeros (isómeros de isótopos) por RMN na medida em que o que efectivamente é quantificado são as populações de isotopómeros de diversos intermediários metabólicos mais abundantes como sejam o lactato, o glutamato e a glicose (Chance *et al.*, 1983; Malloy, *et al.*, 1988; Jeffrey, *et al.*, 1991; Carvalho *et al.*, 2004; Sherry *et al.*, 2004). Esta informação permite analisar os possíveis fluxos metabólicos que se geram (Fan *et al.*, 2009; Cline *et al.*, 2011; Nargund *et al.*, 2013).

No que diz respeito à utilização desta metodologia para estudos de células em cultura, os substratos enriquecidos mais frequentemente utilizados são a glicose enriquecida em carbono-13 em que o átomo de <sup>13</sup>C se encontra diferentes

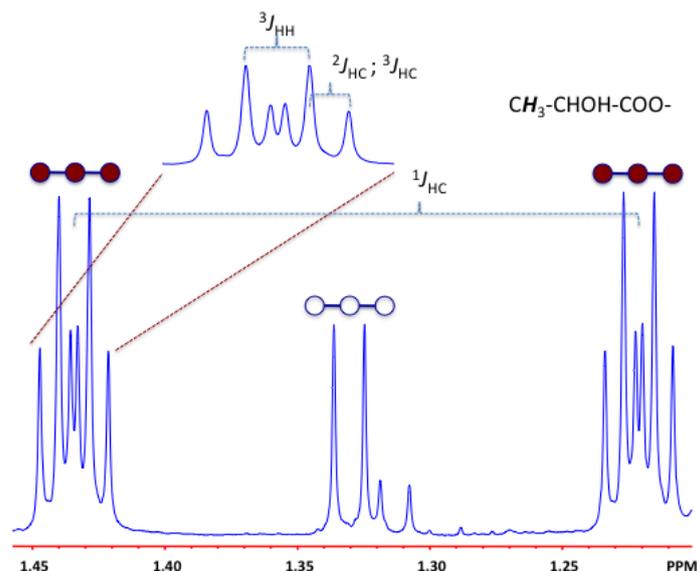
posições da molécula de glicose. Assim é possível ter a glicose enriquecida na posição 1 ([1-<sup>13</sup>C]glicose), nas posições 1 e 6 ([1,6-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]glicose), e em todas as posições, ou seja glicose uniformemente marcada ([U-<sup>13</sup>C]glicose). Para além da glicose, também a glutamina pode ser enriquecida em carbono 13 e em diferentes posições; na posição 1 ([1-<sup>13</sup>C]-, na posição 5 [5-<sup>13</sup>C]- e uniformemente marcada [U-<sup>13</sup>C]glutamina). A utilização de glicose enriquecida em carbono-13 possibilita a análise da via glicolítica, do ciclo de Krebs ou ciclo TCA (do inglês, *tricarboxylic acid cycle*) bem como da interacção entre estas duas vias metabólicas mediante a análise das taxas de enriquecimento de metabolitos intermediários das duas vias (figura 59).



**Figura 59** – Esquema representativo das possíveis vias de utilização da [U-<sup>13</sup>C]glicose. Os fluxos designados  $F_i$  ( $i=1,2,3,4,5$ ) definem os possíveis destinos do esqueleto carbonado da glicose:  $F_1$  – via glicolítica;  $F_2$  – fermentação láctica (LDH);  $F_3$  – oxidação no ciclo de Krebs (CS);  $F_4$  – transaminação (ALT);  $F_5$  – carboxilação (PC).

Na glicólise, cada molécula de glicose é convertida em duas moléculas de piruvato. Se usarmos glicose marcada com <sup>13</sup>C, a marcação do piruvato será um reflexo da marcação inicial glicose. Como as *pools* intracelulares de piruvato e lactato se encontram em equilíbrio, por acção da LDH (do inglês, *lactate dehydrogenase*), verifica-se que o lactato, entretanto produzido, será também ele um reflexo do tipo de marcação isotópica do precursor que lhe deu origem. Esta marcação possibilita uma distinção entre lactato originário de metabolitos não

marcados, endógenos ou constituintes do meio de cultura, pois o espectro RMN de protão do meio de cultura possibilita tal separação, com base nas constantes de acoplamento heteronucleares  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  como representado na figura 60.



**Figura 60** – Expansão da região do espectro RMN relativa ao grupo metilo do lactato. O duplete central é referente ao lactato não enriquecido presente no meio de cultura, enquanto os dois satélites são respeitantes ao lactato produzido por fermentação láctica da  $[U-^{13}\text{C}]$ glicose.

Com efeito, o lactato originado a partir de  $[U-^{13}\text{C}]$ glicose surge no espectro de  $^1\text{H}$ -RMN como dois satélites, em que cada um deles é um multipletos (duplete de tripletos) fruto de três constantes de acoplamento, uma homo- ( $^3J_{\text{HH}}=7,0\text{Hz}$ ) e duas heteronucleares ( $^2J_{\text{HC}}$  e  $^3J_{\text{HC}}$ , de magnitudes muito similares,  $\sim 4,2\text{ Hz}$ ). A análise do meio de cultura celular em função do tempo de incubação em hipoxia permite a quantificação do lactato produzido pelas células e, dessa forma, uma quantificação, se bem que indireta, do fluxo glicolítico da linha celular em estudo.

O piruvato entretanto obtido pelo processo glicolítico pode seguir para a mitocôndria e ser convertido em acetil-CoA por acção da enzima PDH (do inglês, *pyruvate dehydrogenase*). A subsequente oxidação no ciclo de Krebs resulta na produção de  $\text{CO}_2$  e de equivalentes redutores que alimentam a cadeia transportadora de electrões. A incorporação da marcação nos intermediários do ciclo pode ser seguida, de forma indireta, pela detecção de incorporação de  $^{13}\text{C}$  no glutamato, que se encontra em equilíbrio com a *pool* de  $\alpha$ -cetogluturato. A escolha deste intermediário metabólico, em detrimento de intermediários do próprio ciclo, resulta da sua maior concentração intracelular e, subsequente, melhor detecção

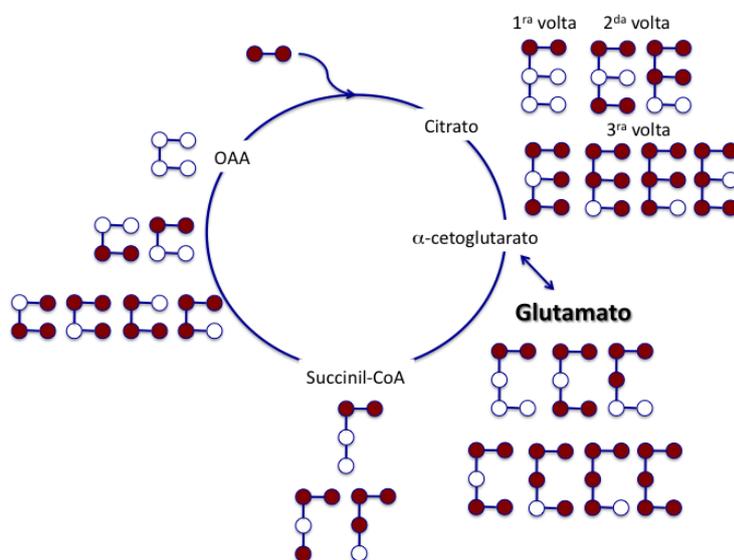
pela técnica de RMN.

A taxa de incorporação de  $^{13}\text{C}$  nos intermediários do ciclo de Krebs e no glutamato é função da velocidade do mesmo ( $v_{\text{TCA}}$ ) e do tamanho das *pools* de intermediários metabólicos. Sucede também que o padrão de marcação detectado nesses intermediários metabólicos é igualmente função da marcação escolhida para o precursor metabólico adoptado.

O precursor metabólico mais frequentemente utilizado em culturas celulares é a glicose uniformemente enriquecida em carbono-13 ([U- $^{13}\text{C}$ ]glicose) por duas razões essenciais, pelo preço e pela informação isotopomérica fornecida. De facto, constitui um dos substratos enriquecidos mais baratos no mercado, e a informação isotopomérica fornecida é de interpretação relativamente fácil, na medida em que proporciona enriquecimentos em carbonos consecutivos de intermediários metabólicos, facilmente discerníveis de enriquecimentos devido a abundância natural. Este substrato, ao ser metabolizado, origina piruvato, também ele uniformemente enriquecido e, subsequentemente, por acção da PDH, acetil-CoA com o acetil também ele enriquecido nos seus dois carbonos (figura 59). A incorporação no ciclo de Krebs leva a marcação nos carbonos 4,5 do  $\alpha$ -cetoglutarato que, por equilíbrio com a *pool* de glutamato, conduz a equivalente marcação no glutamato (figura 61).

Assim, temos que numa primeira volta do ciclo são originados intermediários duplamente marcados. No entanto, se estes intermediários, numa volta subsequente, forem combinados com outra unidade de acetil-CoA enriquecida, outros tipos de marcação são obtidos, conduzindo ao aparecimento de intermediários triplamente enriquecidos. A quantificação por RMN destes intermediários marcados com  $^{13}\text{C}$  possibilita uma avaliação da velocidade do ciclo, pois uma maior actividade será compatível com uma maior abundância de intermediários mais enriquecidos em  $^{13}\text{C}$ . Os estudos da cinética do ciclo de Krebs baseiam-se nesta possibilidade de identificação e quantificação por RMN de isotopómeros de  $^{13}\text{C}$  de glutamato (Chance *et al.*, 1983). O esquema representado na figura 61 permite uma elucidação da forma como ocorre a incorporação de marcação nos intermediários do ciclo de Krebs em função do número de voltas desse mesmo ciclo. Assim, de acordo com a figura 61, a reacção, catalizada pela citrato sintetase, junta o carbono 2 do acetil da acetil-CoA ao carbonilo (carbono 2) do oxaloacetato (OAA). Assumindo-se a entrada de acetil-CoA com o acetil marcado (círculos a vermelho) nos seus dois carbonos, resulta que, à medida que o ciclo evolui, maior percentagem de intermediários multi-enriquecidos passa a existir.

Uma medição da razão de multi-enriquecidos vs. duplamente enriquecidos providencia uma medida da velocidade do ciclo de Krebs.



**Figura 61** – Esquema representativo das possíveis marcações com carbono-13 de intermediários do ciclo de Krebs e do glutamato em função do número de voltas do ciclo de Krebs.

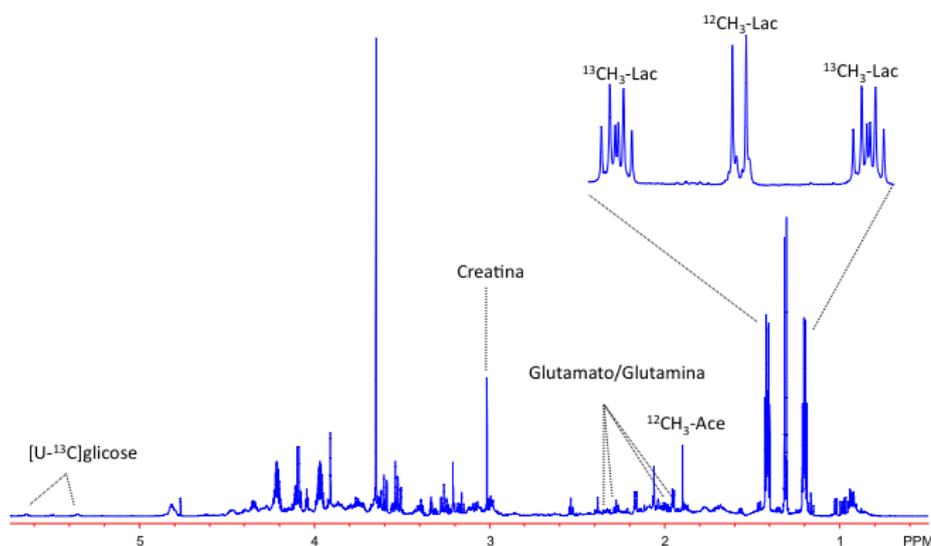
Em estudos metabólicos envolvendo linhas celulares esta metodologia possibilita a averiguação da importância do metabolismo oxidativo, por comparação ao metabolismo glicolítico, e também uma apreciação do grau de acoplamento entre estas duas vias metabólicas. Na verdade, a taxa de incorporação de carbono-13 nos intermediários do ciclo será tanto maior quanto mais célere for a “canalização do piruvato”, produto da glicólise, para o ciclo de Krebs. Numa primeira volta do ciclo de Krebs ocorre incorporação de  $^{13}\text{C}$  nas posições 4 e 5 do  $\alpha$ -cetogluturato e, conseqüentemente, do glutamato, dado a acetil-CoA estar duplamente enriquecida. A continuação no ciclo com este padrão de marcação conduz ao aparecimento de dois possíveis tipos de marcação ao nível do oxaloacetato (OAA), numa proporção de 50% cada, que são o  $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ - e o  $[3,4-^{13}\text{C}_2]$ OAA. A subsequente condensação destas moléculas com uma nova unidade de acetil-CoA enriquecida nos carbonos 1 e 2 do acetil implica a formação de intermediários mais enriquecidos que os anteriores, nomeadamente o  $[3,4,5-^{13}\text{C}_3]$ - e o  $[1,2,4,5-^{13}\text{C}_4]$ glutamato. O padrão de marcação complica-se nas voltas seguintes do ciclo mas os padrões de marcação observados são facilmente antecipáveis (figura 61). Na prática, é importante perceber que, à medida que o ciclo de Krebs

evolui, as espécies duplamente enriquecidas nos carbonos 4 e 5 vão dando lugar a espécies multi-enriquecidas, facilmente detectáveis e distinguíveis e que permitem uma análise tanto qualitativa como quantitativa do metabolismo oxidativo das células em cultura. Uma análise da razão das marcações nos carbonos C3 do lactato (C3-Lac) e C4 do glutamato (C4-Glu) providencia uma medida efectiva da extensão do acoplamento entre a glicólise e o ciclo de Krebs. Esta relação é tanto maior quanto menor for esse acoplamento e mais dependente estiver a linha celular do processo glicolítico para a obtenção de energia.

A medição do fluxo glicolítico foi feita de forma indirecta mediante a quantificação do aparecimento de lactato no meio de cultura. A metabolização da [U-<sup>13</sup>C]glicose conduz ao aparecimento de [U-<sup>13</sup>C]lactato no meio de cultura que é, como referimos anteriormente, distinguível do lactato não enriquecido por <sup>1</sup>H-RMN. Diversas amostras de 160 µL do meio suplementadas com 40 µL de solução de fumarato de sódio de concentração de 10 mM em D<sub>2</sub>O (99,9%), usada como padrão, foram analisadas por <sup>1</sup>H-RMN com uma sonda de detecção indirecta de 3 mm. Cada espectro de <sup>1</sup>H-RMN consiste em 64 k pontos a definir uma largura espectral de 7200 Hz. Para a obtenção de uma razão sinal/ruído adequada para análise quantitativa foram adquiridos um total de 16 transientes (*scans*), com um pulso de radiofrequências equivalente a 45° e um tempo total de repetição interpulsos de 10 segundos, para possibilitar a completa relaxação nuclear de todos os metabolitos presentes. Uma expansão da região respeitante ao lactato está representada na figura 62 para elucidação das ressonâncias utilizadas na quantificação do processo glicolítico.

A análise do metabolismo oxidativo foi realizada com recurso a extratos perclóricos celulares. Após incubação das células por um período de 24 horas em meio de cultura suplementado com [U-<sup>13</sup>C]glicose, as células foram sujeitas a uma extracção com ácido perclórico. Adicionou-se o equivalente de 2 mL de ácido perclórico a 7 % (V/V) por grama de *pellet* celular e procedeu-se a homogenização em vórtex. Esta concentração de ácido permitiu a ruptura de todas as estruturas membranares celulares e a desnaturação proteica. A centrifugação desta mistura (5600 g durante 5 minutos) permitiu a separação do sobrenadante, onde se encontram todos os metabolitos solúveis em água. Posteriormente seguiu-se a neutralização com KOH até atingir um pH de 6,8-7,0, o que possibilitou a precipitação de um sal de KClO<sub>4</sub>. Após nova centrifugação (5600 g durante 5 minutos), o sobrenadante neutralizado resultante foi sujeito a liofilização e posterior dissolução em D<sub>2</sub>O com pureza de 99,9 %, para análise por <sup>1</sup>H- e

$^{13}\text{C}$ -RMN. Os espectros de  $^1\text{H}$ -RMN dos extractos celulares foram adquiridos nos mesmos moldes que os espectros do meio de cultura, mas com maior número de transientes ( $n=128$ ) para possibilitar a análise de metabolitos presentes em menores concentrações. Os espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN foram adquiridos numa sonda de 3 mm de banda larga com detecção directa de heteronúcleo, utilizando desacoplamento de banda larga de protão. Um total de 128 k pontos foram adquiridos para definir uma região espectral de 35 kHz. Para a obtenção de uma razão sinal/ruído compatível com a análise metabólica foram adquiridos entre 15000 e 20000 transientes, utilizando um pulso de radiofrequências de  $45^\circ$  e um tempo de repetição de interpulsos de 3 segundos. Este período de interpulsos é o suficiente para permitir total relaxação dos carbonos alifáticos, os quais são o principal alvo do estudo aqui realizado. Através do espectro de  $^1\text{H}$ -RMN obtido na linha celular WiDr, figura 62, pode avaliar-se a variação nas *pools* de metabolitos intermediários, como sejam as *pools* de certos aminoácidos e cetoácidos, bem como o consumo de um determinado substrato e a síntese de um determinado produto. Através deste espectro obtém-se uma imagem estática do metabolismo. A expansão apresenta as ressonâncias relativas ao lactato enriquecido em carbono-13 ( $^{13}\text{CH}_3\text{-Lac}$ ) produzido a partir de  $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ glicose e não enriquecido ( $^{12}\text{CH}_3\text{-Lac}$ ). Outros metabolitos identificados são a  $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ glicose, o glutamato, a glutamina e a creatina.



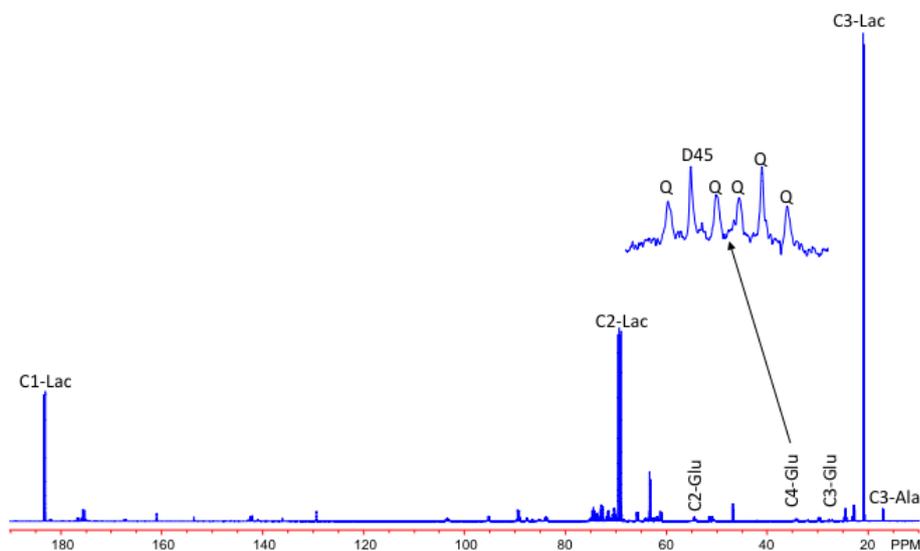
**Figura 62** – Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN do extrato perclórico de células WiDr. A expansão apresenta as ressonâncias relativas ao lactato enriquecido em carbono-13 ( $^{13}\text{CH}_3\text{-Lac}$ ) produzido a partir de  $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ glicose e não enriquecido ( $^{12}\text{CH}_3\text{-Lac}$ ).

A ressonância do acetato aparece essencialmente como proveniente do acetato não enriquecido, o que denota uma pool de acetyl-CoA pouco enriquecida e pouco activa nestas células, compatível com metabolismo pouco oxidativo. Para uma imagem dinâmica das vias metabólicas envolvidas, a informação está contida no espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN (figura 63) o qual reflecte a maior ou menor incorporação de isótopo estável na *pool* de determinado intermediário metabólico.

Como metabolitos essenciais na análise metabólica temos o lactato, dado ser o produto final do processo de fermentação láctica, intimamente associado ao processo glicolítico. Uma maior exportação de lactato para o meio de cultura é sinónimo de uma maior actividade do processo glicolítico, pelo que a quantificação do lactato produzido é frequentemente utilizada como medida da glicólise.

Um outro metabolito de extrema importância é o glutamato pelo papel metabólico que desempenha e, no respeitante à metodologia aqui adoptada, pela sua elevada concentração celular. Com efeito, a pouca sensibilidade da técnica de RMN impede a detecção de metabolitos presentes em baixas concentrações e possibilita apenas a detecção da incorporação de  $^{13}\text{C}$  nos metabolitos cujas *pools* intracelulares são mais significativas.

No espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN do extrato celular da linha celular WiDr representado na figura 62 podemos identificar as ressonâncias relativas aos carbonos do lactato (C3, C2 e C1), da alanina (C3) e do glutamato (C2, C3 e C4). Em particular, as ressonâncias relativas aos carbonos do glutamato surgem como um conjunto de multipletos que possuem importante informação metabólica. A ressonância C4-Glu, (figura 62) possui um duplete, designado D45, que reflecte a população de moléculas de glutamato com os carbonos 4 e 5 simultaneamente enriquecidos, e um quarteto/pseudoquarteto, designado Q, que é devido às moléculas de glutamato com os carbonos 3, 4 e 5 simultaneamente enriquecidos. O aparecimento deste último multiplete denota a ocorrência de, pelo menos, duas voltas no ciclo de Krebs e preconiza a actividade do mesmo ciclo. Assim, a razão entre os multipletos Q/D45 será tanto maior quanto mais oxidativo for o tecido e/ou célula, ou seja, quanto maior for a dependência do ciclo de Krebs para a obtenção de equivalentes redutores que subsequentemente originam a energia necessária. Em linhas celulares é espectável a competição entre glicólise e ciclo de Krebs na bioenergética celular pelo que, em princípio, um fenótipo mais glicolítico terá associado uma menor componente oxidativa.



**Figura 63** – Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN do extrato perclórico de células WiDr. Como ressonâncias principais temos as respeitantes aos carbonos do lactato (C3, C2 e C1) e as relativas aos carbonos do glutamato (C3, C4 e C2). Na expansão está representado o multipletto respeitante ao carbono C4 do glutamato com a designação dos respectivos multipletos (Q – quarteto/pseudoquarteto; D45 – dupletto).

Neste trabalho foram caracterizadas linhas de cancro do cólon em termos de fluxos glicolíticos e oxidativos no sentido de correlacionar a remodelação metabólica e a tumorigenicidade.

Os espectros de RMN foram processados por recurso a um *software* designado NUTS<sup>pro</sup> (Acorn NMR Inc., Livermore, CA). Este *software* possibilita a desconvolução das ressonâncias constantes em cada espectro/multipletto e, dessa forma, fornece dados que permitem a análise de isotopómeros de carbono-13 e a subsequente interpretação metabólica.

No sentido de correlacionar os parâmetros metabólicos atrás referidos com as actividades de enzimas-chave em cada processo, realizaram-se ensaios de medição de actividade das enzimas lactato desidrogenase (LDH, do inglês *lactate dehydrogenase*), citrato sintetase (CS, do inglês *citrate synthase*) e do complexo IV da cadeia respiratória mitocondrial.

A actividade da enzima citosólica LDH permite inferir acerca da integridade membranar das células e pode ser usada como indicador da actividade anaeróbia do tecido estudado. De facto, a LDH pode, na ausência de oxigénio, regenerar o coenzima  $\text{NAD}^+$ , por conversão do piruvato em lactato, de modo a que possa ocorrer a sua redução na glicólise para produção de ATP. A medição da actividade da enzima LDH por espectrofotometria pode ser efectuada na presença de elevada

concentração do substrato piruvato (4 mM), seguindo a sua redução a lactato na presença de NADH (0,2 mM), mediante observação da oxidação desta coenzima com um comprimento de onda ( $\lambda$ ) entre os 340 e os 380 nm (Grazina, 2006).

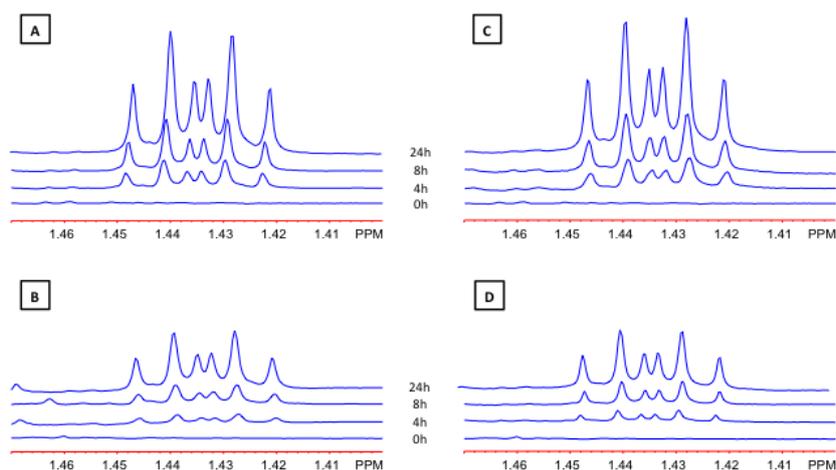
A enzima citrato sintetase, CS, tem sido usada como uma enzima marcadora de preparações mitocondriais dada a sua estabilidade e o seu papel regulador no ciclo de Krebs. A sua actividade pode fornecer uma estimativa do número de mitocôndrias de uma suspensão celular e pode ser usada com o objetivo de uniformizar os resultados das atividades das enzimas da cadeia respiratória mitocondrial (Wong, 2012). Na medida em que a CS é uma enzima da matriz mitocondrial, é muitas vezes utilizada como um marcador da integridade da mitocôndria (Heerlein *et al.*, 2005). A atividade desta enzima constitui também um indicador da “proliferação” mitocondrial. A avaliação da actividade da enzima citrato sintetase pode ser realizada por espectrofotometria com um  $\lambda$  de 412 nm, pois a reacção de condensação da acetil-CoA (0,2 mM) com o oxaloacetato (8 mM), que é catalizada pela CS, resulta na libertação de coenzima A (CoA) que reage com o 5,5'-ditio-bis-(2-ácido nitrobenzóico) (DNTB) numa concentração de 2 mM que foi adicionado ao meio, o que possibilita a leitura a 412 nm. Para permitir o acesso dos substratos à enzima foi utilizado Triton X-100 a 0,1 %.

O equivalente a 50  $\mu$ g de proteína foram adicionados a 1 mL de solução tampão constituída por 10 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM de sacarose, 5mg/mL de BSA a pH 6,5, que se encontrava numa cuvete. Iniciou-se a análise com a realização de um traçado basal de leitura de densidade óptica a 550 nm, e adicionaram-se em seguida 10  $\mu$ L do detergente n-dodecil- $\beta$ -D-maltosídeo, perfazendo uma concentração de 125 mM. Este detergente promove a formação de poros na membrana externa da mitocôndria o que permite a entrada do citocromo c reduzido. Este vai transferir os seus electrões ao citocromo c da cadeia respiratória mitocondrial localizado na membrana interna da mitocôndria, sem que haja compromisso da membrana interna. Na análise da fracção mitocondrial é possível avaliar a qualidade da preparação através da avaliação da razão da actividade do complexo IV na presença e na ausência do detergente. Mediante a adição de citocromo c reduzido de forma a perfazer uma concentração de 10  $\mu$ M, torna-se possível registar as alterações através da leitura da densidade óptica a 550 nm. No final, foram adicionados 2  $\mu$ L de uma solução de cianeto de potássio (KCN) numa concentração de 80 mM para inibir o complexo IV.

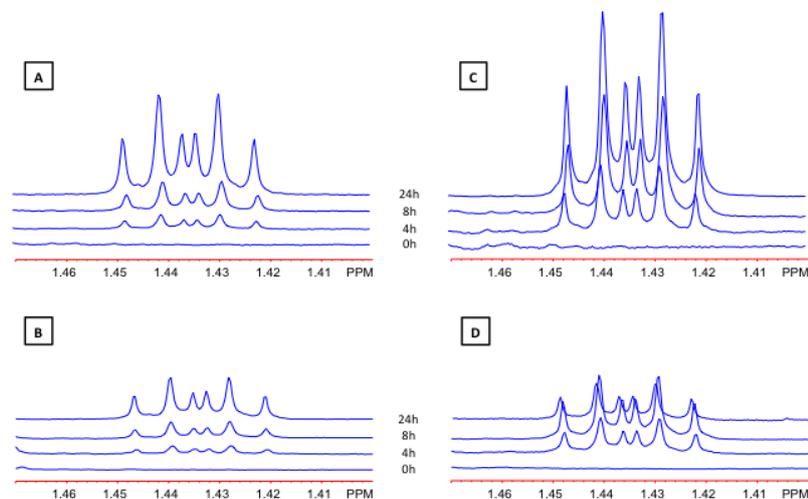
## Resultados

As diversas linhas celulares foram caracterizadas em termos dos fluxos glicolíticos e do *turnover* no ciclo de Krebs, com recurso a [U-<sup>13</sup>C]glicose, utilizada como metabolito precursor para incorporação da marcação, e a posterior detecção de metabolitos intermediários enriquecidos em <sup>13</sup>C, presentes no meio de cultura ou nas próprias células, mediante a análise dos extractos perclóricos celulares.

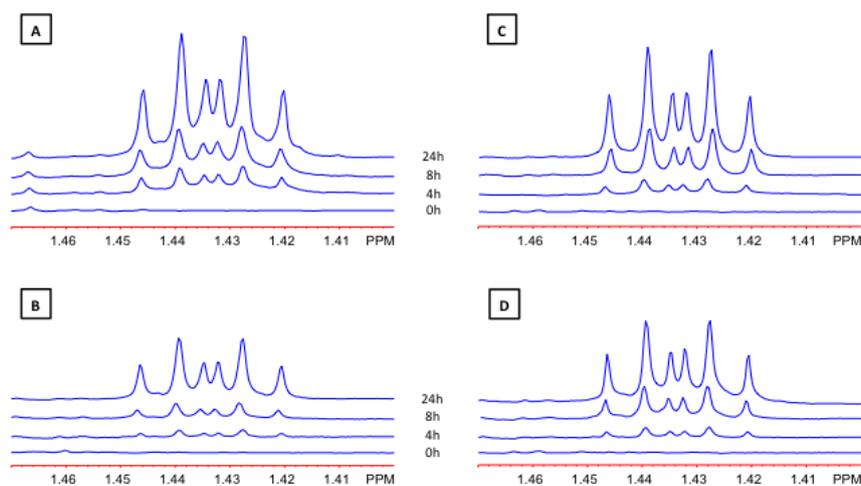
Relativamente à produção de [U-<sup>13</sup>C]lactato as figuras 64-66 apresentam expansões da ressonância respeitante a [U-<sup>13</sup>C]lactato produzido pelas diversas linhas celulares e presente no meio de incubação, em diversos períodos, após início da incubação das células com meio de cultura suplementado com [U-<sup>13</sup>C]glicose, em condições de normoxia e de hipoxia e na presença de duas concentrações distintas de glicose, 25 mM e 5 mM. Uma comparação das três linhas celulares permitiu de imediato constatar que as células LS1034 são as que se apresentam mais sensíveis à hipoxia, tanto na presença de 25 mM como de 5 mM de glicose. Com efeito, poderemos verificar que para as concentrações mais baixas de glicose e para tempos de incubação superiores a 8 horas, ocorreu uma redução dos níveis de lactato no meio de incubação, resultado do consumo de lactato entretanto produzido e do desaparecimento da glicose do meio (figura 65).



**Figura 64** – Expansões do espectro de <sup>1</sup>H-RMN do meio de cultura de células WiDr, respeitantes a um dos satélites da ressonância de [U-<sup>13</sup>C]lactato. A ressonância é composta por 6 picos, resultado da existência de acoplamentos homo- (<sup>3</sup>J<sub>HH</sub>) e heteronucleares (<sup>2</sup>J<sub>HC</sub> e <sup>3</sup>J<sub>HC</sub>). A evolução temporal (0, 4, 8 e 24 horas) dos conteúdos em lactato para as 4 condições descritas: normoxia e 25 mM (A), normoxia e 5 mM de glicose (B), hipoxia e 25 mM glicose (C) e hipoxia e 5 mM de glicose (D).



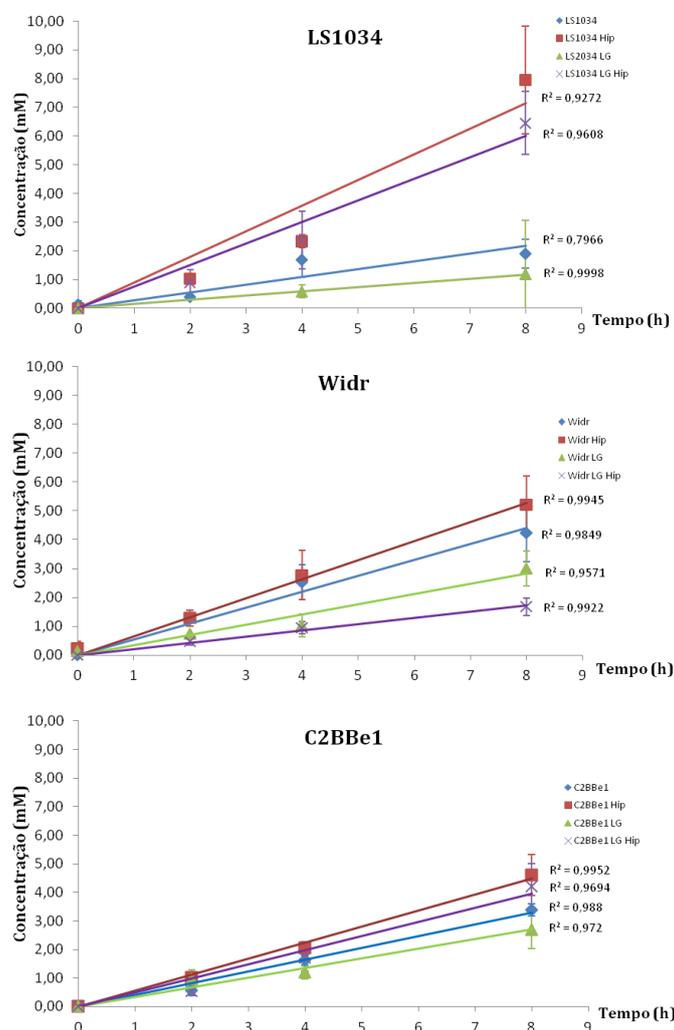
**Figura 65** – Expansões do espectro de  $^1\text{H}$ -RMN do meio de cultura de células LS1034, respeitantes a um dos satélites da ressonância de  $[\text{U-}^{13}\text{C}]\text{lactato}$ . A ressonância é composta por 6 picos, resultado da existência de acoplamentos homo- ( $^3J_{\text{HH}}$ ) e heteronucleares ( $^2J_{\text{HC}}$  e  $^3J_{\text{HC}}$ ). A evolução temporal (0, 4, 8 e 24 horas) dos conteúdos em lactato para as 4 condições descritas: normoxia e 25 mM (A), normoxia e 5 mM de glicose (B), hipoxia e 25 mM glicose (C) e hipoxia e 5 mM de glicose (D).



**Figura 66** – Expansões do espectro de  $^1\text{H}$ -RMN do meio de cultura de células C2BBE1, respeitantes a um dos satélites da ressonância de  $[\text{U-}^{13}\text{C}]\text{lactato}$ . A ressonância é composta por 6 picos, resultado da existência de acoplamentos homo- ( $^3J_{\text{HH}}$ ) e heteronucleares ( $^2J_{\text{HC}}$  e  $^3J_{\text{HC}}$ ). A evolução temporal (0, 4, 8 e 24 horas) dos conteúdos em lactato para as 4 condições descritas: normoxia e 25 mM (A), normoxia e 5 mM de glicose (B), hipoxia e 25 mM glicose (C) e hipoxia e 5 mM de glicose (D).

A avaliação dos fluxos glicolíticos pode ser efectuada, pelo menos de forma indirecta, mediante uma análise da taxa de produção de lactato nas primeiras 8 horas de incubação. Na figura 67, temos a produção de lactato em função do tempo de incubação para as linhas celulares WiDr (A), LS1034 (B) e C2BBE1 (C),

em normoxia ou em hipoxia e na presença de meio de cultura com concentrações de glicose 25 mM ou 5 mM. Os efeitos das concentrações de glicose e da hipoxia foram distintos nas diversas linhas celulares em termos da quantidade de lactato produzida e exportada para o meio de cultura. A análise das primeiras 8 horas permitiu uma comparação mais adequada das taxas de produção de lactato pois é um período suficientemente curto para que se possa considerar uma resposta linear. Esta resposta linear é menos plausível para períodos de tempo mais longos devido às alterações significativas na actividade metabólica e à diminuição na disponibilidade de substrato no meio de cultura.



**Figura 67** – Evolução da concentração de [U-<sup>13</sup>C]lactato no meio de cultura nas primeiras 8 horas para as diferentes linhas celulares em condições de elevada (25 mM) ou diminuída concentração de glicose (5 mM) e em normóxia ou hipoxia. Os resultados obtidos representam, para cada tempo, a média  $\pm$  desvio padrão de pelo menos quatro experiências independentes.

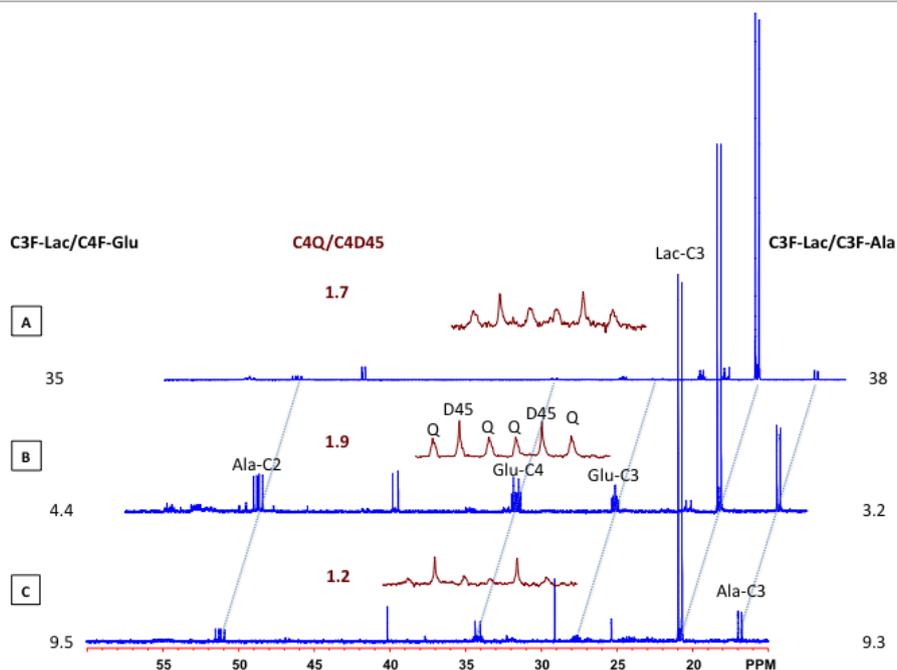
A análise dos gráficos e dos espectros de  $^1\text{H}$ -RMN dos meios de cultura permitiram concluir que a hipoxia conduziu, em todas as linhas celulares, a incrementos das taxas de síntese de lactato quando incubadas em glicose na concentração de 25 mM. Com concentrações mais baixas de glicose, 5 mM, a resposta foi distinta pois as células WiDr apresentaram uma redução na produção de lactato enquanto as LS1034 e as C2BBE1 registaram incrementos (figura 67).

O efeito da hipoxia foi também distinto em termos de intensidade. As células LS1034 foram as que mais sofreram o seu efeito, seguindo-se as WiDr e, finalmente, as C2BBE1.

Ao avaliarmos as células incubadas com elevada concentração de glicose e em condição de normoxia, concluímos que a linha celular mais glicolítica é a WiDr, seguida da C2BBE1 e, em último, a LS1034. Já em condição de hipoxia, a linha celular LS1034 assume-se como a mais glicolítica. Efectivamente, a indução de hipoxia nesta linha celular levou a um consumo tão elevado de glicose que obrigou a mesma a recorrer a outras fontes energéticas por ausência de glicose no meio por períodos de 24 horas.

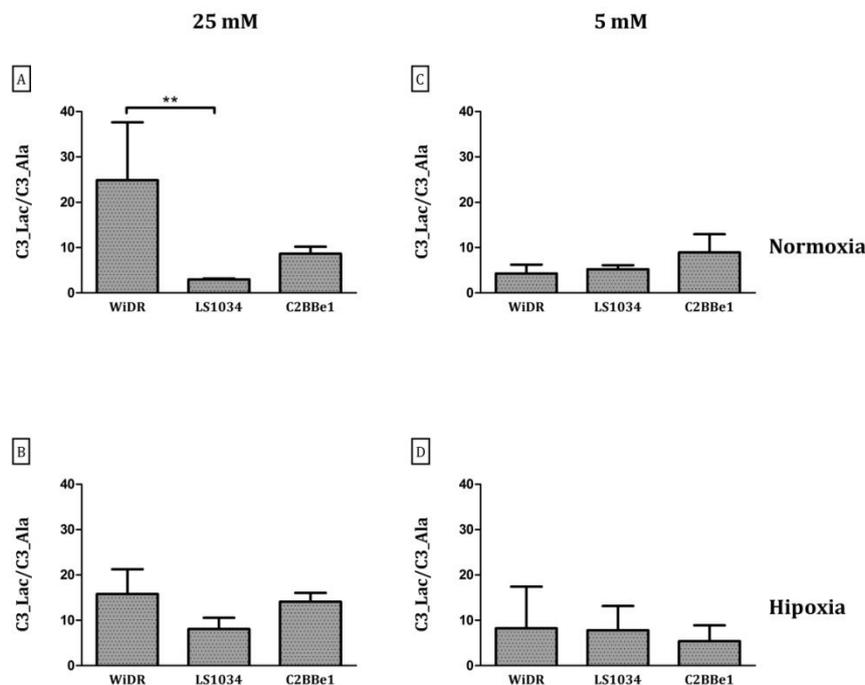
Após síntese de piruvato pelo processo glicolítico, este pode ser convertido em lactato por redução pela LDH, conforme referido na secção anterior. Alternativamente, o piruvato pode ser sujeito a posterior oxidação pela PDH (piruvato desidrogenase) e pelo conjunto de etapas metabólicas que constituem o ciclo de Krebs. A análise do fluxo no ciclo de Krebs pode ser feita mediante a análise da incorporação de  $^{13}\text{C}$  em intermediários metabólicos do próprio ciclo ou intermediários metabólicos em equilíbrio directo com estes e cujas *pools* sejam mais significativas, nomeadamente o glutamato.

A figura 68 apresenta os espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN de extractos perclóricos das três linhas celulares em análise. Os metabolitos mais abundantes nesses extractos celulares, em termos de enriquecimento em  $^{13}\text{C}$ , são como podemos averiguar, a alanina (carbono C3;  $\delta=16,8$  ppm), o lactato (carbono C3,  $\delta=20,8$  ppm), e o glutamato (carbonos C3, C4 e C2 com  $\delta=27,6$ ; 34,2 e 55,5 ppm, respectivamente). Com estes valores é possível calcular as razões C3-Lac/C4-Glu, C3-Lac/C3-Ala e dos multipletos de glutamato C4Q/C4D45. O cálculo destes índices metabólicos é muito importante na análise do (des)acoplamento metabólico entre a via glicolítica e o ciclo de Krebs, pois traduzem a interacção entre as duas vias metabólicas e também a dependência bioenergética das células.



**Figura 68** – Espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN de extratos perclóricos de células WiDr (A), LS1034 (B) e C2BBel (C). As razões C3F-Lac/C4F-Glu, C3F-Lac/C3F-Ala e dos multipletos de glutamato C4Q/C4D45, estão apresentadas à esquerda, direita e ao centro respectivamente.

A análise de isotopómeros de metabolitos intermediários consiste na determinação das quantidades de múltiplas espécies enriquecidas em  $^{13}\text{C}$  (isotopómeros) para assim poder inferir acerca das vias metabólicas que lhes dão origem. Um primeiro parâmetro a levar em consideração prende-se com a avaliação dos níveis de lactato comparativamente aos níveis de alanina intracelulares. Efectivamente, é reconhecido que a razão lactato/alanina pode ser vista como uma medida do redox citosólico (Williamson *et al*, 1967; Nunes *et al*, 2011). A conversão de piruvato, resultante do processo glicolítico, em lactato é tanto mais extensa quanto maior for a quantidade de NADH citosólico, resultante do processo glicolítico. Numa situação de redução dos níveis de NADH, o piruvato pode sofrer outro tipo de acção enzimática, nomeadamente pela alanina aminotransferase (ALT), com consequente aumento dos níveis de alanina. Os destinos do piruvato intracelular são, assim, elementos passíveis de interpretação metabólica de relevo. Na figura 69 verifica-se que as razões C3-Lac/C3-Ala são muito diferentes, o que é indicativo de estados de redox citosólicos muito distintos.

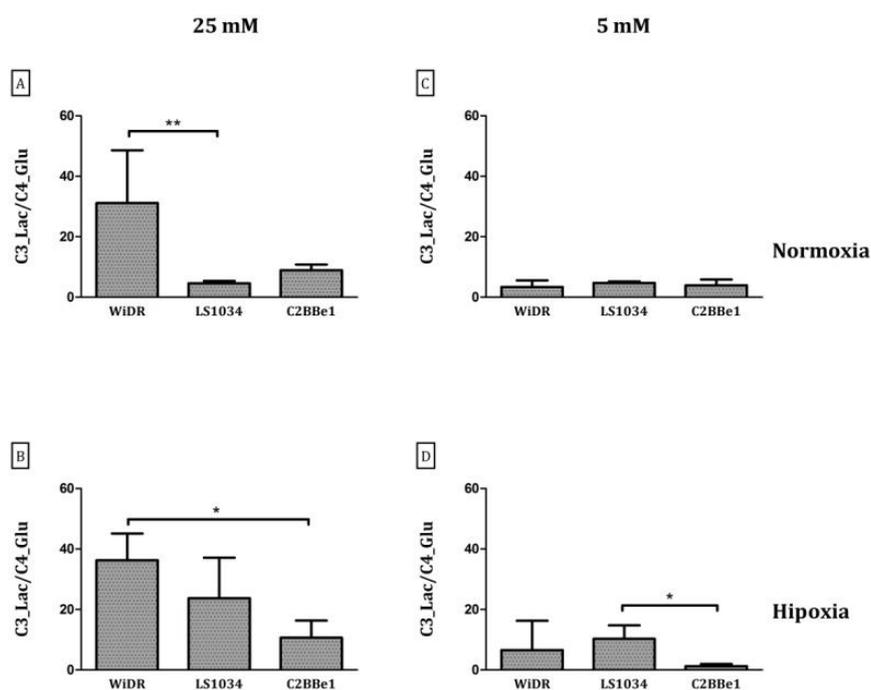


**Figura 69** - Razões C3-Lac/C3-Ala para as diversas linhas celulares em cada uma das condições experimentais: normoxia e 25 mM de glicose (A); hipoxia e 25 mM de glicose (B), normoxia e 25 mM de glicose (C) e hipoxia e 5 mM de glicose (D). Os resultados obtidos representam a média  $\pm$  desvio padrão de pelo três experiências independentes. As diferenças significativas estão assinaladas com \* que corresponde a  $p < 0,05$  e com \*\* que corresponde a  $p < 0,01$ .

Em condições de normoxia e com concentração de 25 mM de glicose as células WiDr são as que apresentam maior razão com significado estatístico ( $p < 0,01$ ) destes dois metabolitos, o que sugere que a via glicolítica está muito incrementada nestas células. Seguem-se as células C2BBE1 e, por fim, as LS1034. Já para as outras condições experimentais as diferenças não são tão marcantes.

Uma outra relação bastante relevante é a razão C3-Lac/C4-Glu. Com efeito, a marcação ao nível de C3-Lac pode conduzir ao aparecimento de marcação no C4-Glu desde que ocorra a sua conversão em piruvato e, subsequentemente, em acetil-CoA para entrar no ciclo de Krebs. Esta razão pode assim dar uma ideia do acoplamento existente nas células entre a glicólise e o ciclo de Krebs, pois a razão será tanto maior quanto menor for a oxidação de piruvato no ciclo e, consequentemente, quanto menor for o acoplamento metabólico entre as duas vias. Na figura 70 verifica-se que essa razão apresenta idênticos valores aos da razão C3-Lac/C3-Ala, pelo que se verifica uma correlação directa entre o estado

redox citosólico e o fluxo oxidativo no ciclo de Krebs (Carvalho *et al.*, 2004) que, naturalmente, não surpreende. Quanto mais elevada a razão C3-Lac/C3-Ala, maior quantidade de NADH existe no citosol e menos necessidade haverá de vias metabólicas alternativas para a sua produção, ou seja, menor necessita de ser a actividade no ciclo de Krebs.

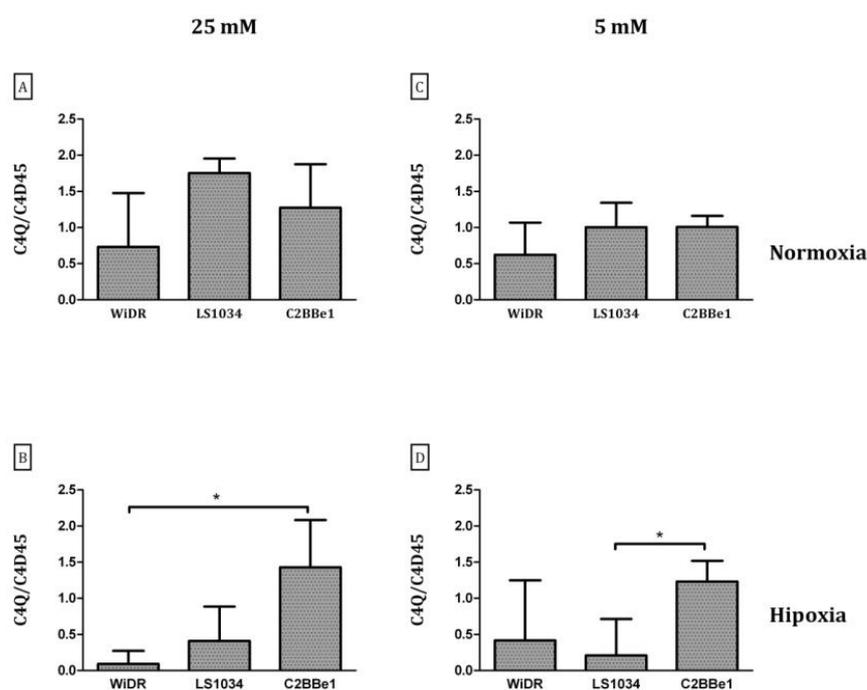


**Figura 70**– Razões C3-Lac/C4-Glu para as diversas linhas celulares em cada uma das condições experimentais: normoxia e 25 mM de glicose (A); hipoxia e 25 mM de glicose (B), normoxia e 25 mM de glicose (C) e hipoxia e 5 mM de glicose (D). Os resultados obtidos representam a média  $\pm$  desvio padrão de pelo menos três experiências independentes. As diferenças significativas estão assinaladas com \* que corresponde a  $p < 0,05$  e com \*\* que corresponde a  $p < 0,01$ .

As células WiDr assumem-se também aqui como as que apresentam o menor acoplamento entre o processo glicolítico e o ciclo de Krebs tanto na condição de normoxia como na condição de hipoxia, quando na presença de elevada concentração de glicose. Com concentração de 25 mM de glicose e na condição de normoxia há diferenças significativas entre as células WiDr e LS1034 ( $p < 0,01$ ), enquanto que na condição de hipoxia as diferenças são entre as células WiDr e C2BBE1 ( $p < 0,05$ ). O mesmo não sucede na concentração de 5 mM de glicose. Nessas circunstâncias as células WiDr, ao contrário das LS1034, conseguem promover um melhor acoplamento entre as vias metabólicas e não

esgotar tão rapidamente os nutrientes disponíveis. Aqui as diferenças significativas só se verificam quando a concentração de glicose no meio é de 5 mM e entre as células LS1034 e C2BBE1 ( $p < 0,05$ ).

A outra medida bastante importante na análise metabólica por recurso a substratos enriquecidos com carbono-13 é a do *turnover* do ciclo de Krebs. Este *turnover* do ciclo confere uma medida da dependência dos tecidos do processo oxidativo e pode ser quantificado pela análise da razão C4Q/C4D45 (figura 71).

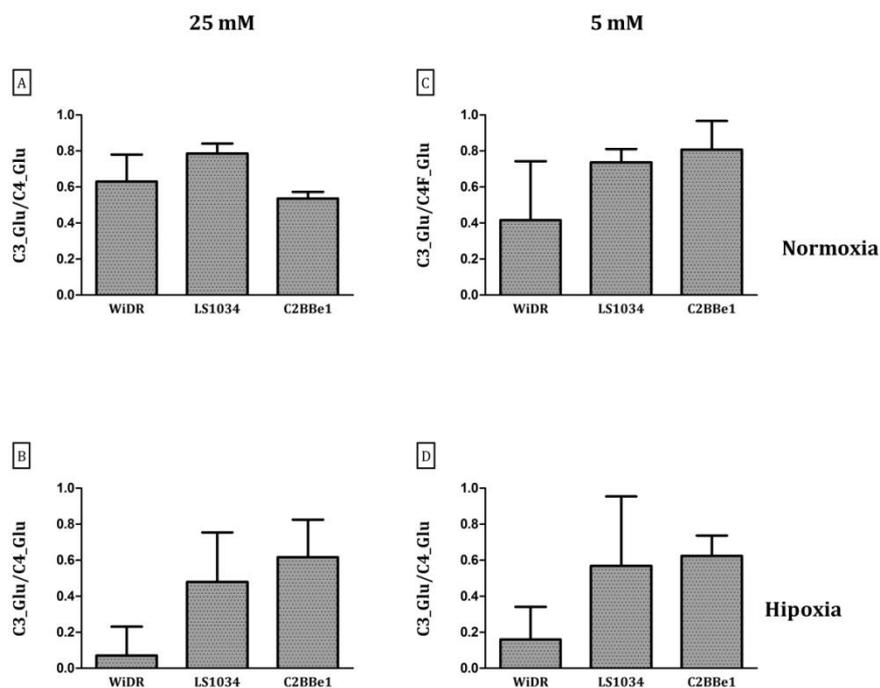


**Figura 71** – Razões entre multipletos de glutamato no carbono 4, C4Q/C4D45, para as diversas linhas celulares em cada uma das condições experimentais: normoxia e 25 mM de glicose (A); hipoxia e 25 mM de glicose (B), normoxia e 25 mM de glicose (C) e hipoxia e 5 mM de glicose (D). Os resultados obtidos representam a média  $\pm$  desvio padrão de pelo três experiências independentes. As diferenças significativas estão assinaladas com \* que corresponde a  $p < 0,05$ .

Os isotómeros de  $^{13}\text{C}$  de glutamato que contribuem para o multipletto C4Q são aqueles que em simultâneo apresentam os carbonos 3, 4 e 5 enriquecidos em  $^{13}\text{C}$ . Sucede que esses isotómeros só são produzidos após a primeira volta no ciclo de Krebs, ao contrário do que sucede com o C4D45 que resulta da imediata entrada de  $[1,2-^{13}\text{C}_2]\text{acetil-CoA}$  no ciclo. A razão entre estes dois multipletos será tanto maior quanto maior for o fluxo no ciclo de Krebs e quanto menores forem as *pools* de intermediários metabólicos nas quais possa ocorrer diluição de marcação

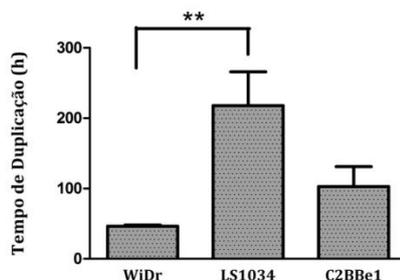
isotópica, de acordo com a figura 61 (Carvalho *et al.*, 2001). Numa situação de hipoxia, como espectável, verifica-se uma redução bastante significativa da razão C4Q/C4D45 tanto nas células WiDr como nas LS1034, quando comparada com a condição de normoxia, o que não se verifica nas células C2BBe1. Com efeito, a razão permanece aproximadamente constante para estas células tanto com elevada como com baixa concentração de glicose e em condição de normoxia ou de hipoxia. Desta forma, constata-se uma insensibilidade deste parâmetro nas células C2BBe1, o que pode ser explicado pelo facto de elas serem já pouco oxidativas mesmo em condições de normoxia, como representado na figura 68. Com efeito, uma análise do metabolismo das células C2BBe1 revela já um forte carácter glicolítico.

Um outro parâmetro de importância significativa no contexto da análise de metabolismo intermediário é a frequentemente designada anaplerose. É reconhecido que as células em rápida replicação têm de sintetizar um conjunto de compostos necessários a essa mesma divisão celular, nomeadamente DNA, proteínas e lípidos. Se é certo que muitos desses compostos estão disponíveis no meio de cultura, outros há que têm de ser sintetizados *de novo* a partir dos nutrientes disponíveis. A activação de processos biossintéticos pode, em termos de análise de isotopómeros e de carbono-13, ser apreciada pela análise de uma simples razão de aumento de marcação. Com efeito, a razão C3-Glu/C4-Glu permite aferir da maior ou menor envolvimento de fluxos biossintéticos na célula. A glicose, providenciada na forma de [U-<sup>13</sup>C]glicose conduz à obtenção de [U-<sup>13</sup>C]piruvato que pode seguir diversas vias metabólicas, algumas já referidas anteriormente. Uma via alternativa é a catalisada pela enzima piruvato carboxilase (PC) que conduz à formação de oxaloacetato. Tratando-se de piruvato enriquecido em carbono-13, o resultado prático é que a marcação ao nível dos carbonos 2 e 3 do glutamato se torna superior comparativamente ao espectável pela acção única do *turnover* do ciclo de Krebs. Assim sendo, uma maior razão de C3-Glu/C4-Glu implica necessariamente um maior fluxo pela acção da enzima PC e uma maior actividade biossintética associada. À partida, seria espectável que células com tempos de duplicação mais curtos possuíssem uma maior razão C3-Glu/C4-Glu. A figura 72 apresenta as alterações nas razões em análise para as três linhas celulares nas diversas condições experimentais.



**Figura 72**– C3-Glu/C4-Glu para as diversas linhas celulares em cada uma das condições experimentais: normoxia e 25 mM de glicose (A); hipoxia e 25 mM de glicose (B), normoxia e 5 mM de glicose (C) e hipoxia e 5 mM de glicose (D). Os resultados obtidos representam a média  $\pm$  desvio padrão de pelo menos três experiências independentes.

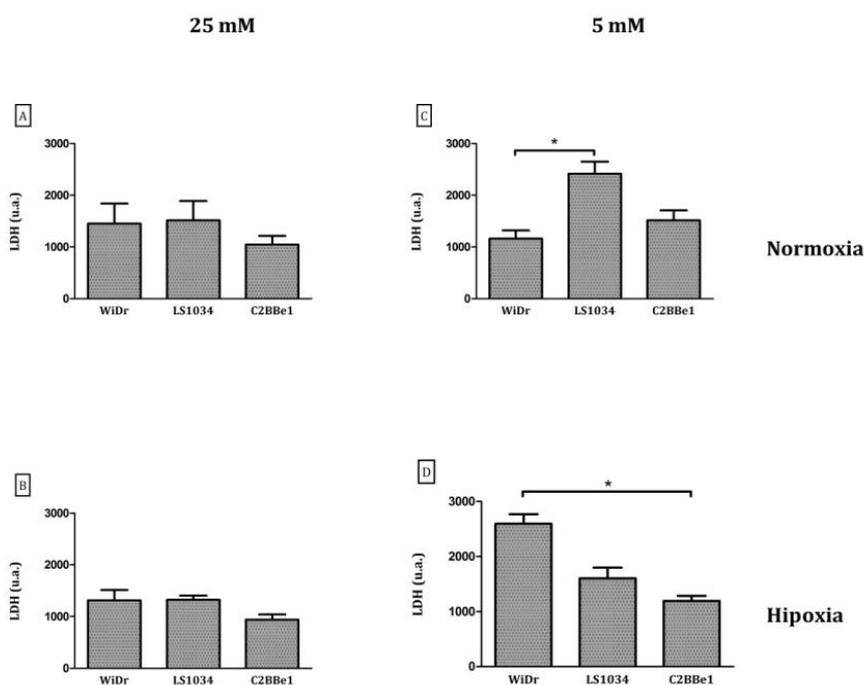
De imediato se pode observar que a dedução atrás explicitada não se aplica às células em estudo. Com efeito, uma análise dos tempos de duplicação (figura 73) mostra que as células WiDr são as que apresentam tempos mais curtos, seguidas das C2BBE1 e, por fim, as LS1034. Já a razão C3-Glu/C4-Glu em condição de normoxia e 25 mM de glicose mostra que não há essencialmente diferenças significativas nesta razão e, quando muito, haveria uma razão maior nas células da linha LS1034 do que nas outras duas linhas celulares, em contraste com o que era espectável.



**Figura 73**– Tempo de duplicação das diversas linhas celulares. Os resultados expressam a média e o desvio padrão de pelo menos quatro experiências independentes. As diferenças significativas estão assinaladas com \* que corresponde a  $p < 0,05$  e com \*\* que corresponde a  $p < 0,01$ .

Há contudo um parâmetro que tem de ser englobado nesta análise e que não foi até ao momento equacionado. O meio de cultura destas células é um meio muito rico em intermediários metabólicos, incluindo a glutamina e muitos outros aminoácidos, cuja biossíntese não é necessária e que, pelo contrário, os torna possíveis fontes de carbono para os processos biossintéticos. Como os diversos metabolitos disponibilizados no meio não são enriquecidos em carbono-13, a sua incorporação no ciclo Krebs resulta, necessariamente, numa diluição da marcação dos intermediários. Consequentemente verifica-se uma interferência na cinética de aparecimento de intermediários multi-enriquecidos em carbono-13. Este factor parece ser o responsável pelos aparentes resultados contraditórios associados a esta razão C3-Glu/C4-Glu.

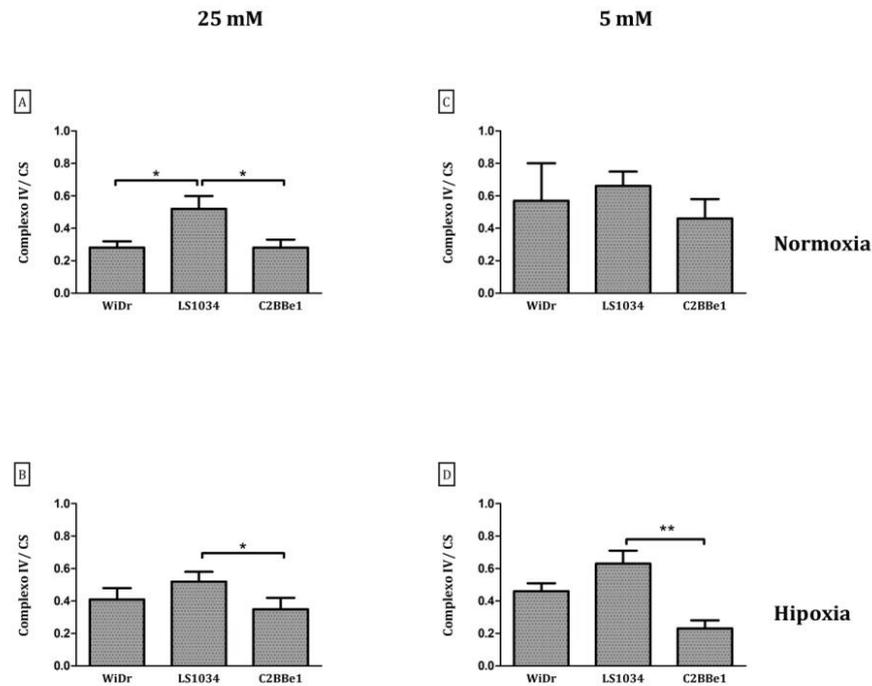
As atividades enzimáticas da LDH foram medidas para diversos períodos de hipoxia nas diversas linhas celulares tanto em elevada (25 mM) como em reduzida concentração de glicose (5 mM) no meio, como representado na figura 74.



**Figura 74** – Atividade enzimática da LDH (unidades arbitrárias) para as diversas linhas celulares: A) glicose 25 mM + normoxia; B) glicose 25 mM + hipoxia; C) 5 mM glicose + normoxia; D) 5 mM glicose + hipoxia. Os resultados obtidos representam a média  $\pm$  desvio padrão de três experiências independentes realizadas em duplicado (n=6). As diferenças significativas estão assinaladas com \* que corresponde a  $p < 0,05$ .

Nas células WiDr com 5 mM de glicose, verifica-se um aumento progressivo da atividade da LDH em função da duração do período de hipoxia, com aumentos de atividade superiores a 100 % para a hipoxia durante 48 h. No entanto, nestas mesmas células, não se regista qualquer aumento dessa mesma atividade com concentrações de glicose de 25 mM. Para as células LS1034 temos um aumento da atividade de LDH nos períodos iniciais de hipoxia quando a concentração de glicose era de 25 mM, a que se seguiu uma redução dessa atividade quando a hipoxia se prolongou até 24 horas. Relativamente à concentração de 5 mM de glicose, o comportamento é distinto, com uma redução de atividade nos períodos iniciais de hipoxia e um subsequente aumento para períodos mais prolongados. Os valores de atividade de LDH são, no entanto, mais elevados e com significado estatístico ( $p < 0,05$ ) em condição de normoxia nas células LS1034 do que nas células WiDr, principalmente quando incubadas com 5 mM de glicose, facto que poderá interferir com a resposta das células ao diferente período de hipoxia. As células C2BBE1 não mostraram efeitos muito significativos na atividade da LDH devidos à sujeição a hipoxia, tanto com concentração de glicose de 25 mM como de 5 mM. O único factor digno de registo foi a maior actividade que estas células apresentaram para as concentrações de glicose mais baixas no meio de cultura com diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em comparação com as células WiDr. Não é simples correlacionar estes níveis de atividade com os níveis de lactato medidos no meio de incubação em condição de normoxia, pois maiores atividades de LDH nas LS1034 não correspondem a maiores níveis de lactato. Já em condição de hipoxia verificamos que foram as células LS1034 que apresentaram maior produção de lactato e que essas células são também as que tinham maior actividade da LDH.

Em termos da actividade do complexo IV da cadeia respiratória, normalizada para a actividade da citrato sintetase, representada na figura 75, verifica-se que em condição de normoxia e elevada concentração de glicose (25 mM) as células LS1034 são as que se apresentam mais activas, em concordância com a menor razão C3-Lac/C4-Glu observada para estas células. Com efeito, uma maior actividade oxidativa estava patente nestas células nas referidas condições (ver espectros na figura 68 e razões C3-Lac/C4-Glu na figura 72). Com esta concentração de glicose verificam-se diferenças estatisticamente significativas entre as células LS1034 e C2BBE1 tanto em normoxia ( $p < 0,05$ ) como em hipoxia ( $p < 0,05$ ). Para a concentração de glicose mais reduzida verificam-se igualmente diferenças significativas ( $p < 0,01$ ) entre as mesmas linhas celulares.



**Figura 75** – Atividade do complexo IV da cadeia respiratória, normalizada para a actividade da citrato sintetase, para as diversas linhas celulares: A) glicose 25 mM + normoxia; B) glicose 25 mM + hipoxia; C) 5 mM glicose + normoxia; D) 5 mM glicose + hipoxia. Os resultados obtidos representam a média  $\pm$  desvio padrão de três experiências independentes realizadas em duplicado (n=6). As diferenças significativas estão assinaladas com \* que corresponde a  $p < 0,05$  e com \*\* que corresponde a  $p < 0,01$ .

## Discussão

Os estudos aqui apresentados para as diversas linhas celulares, em termos de fluxos glicolíticos e oxidativos assim como a sua correlação com as actividades da enzima LDH e do complexo IV da cadeia respiratória, permitem uma avaliação bastante robusta das alterações metabólicas envolvidas e que estarão correlacionadas com o fenótipo tumorigénico. O incremento na produção de lactato, mesmo em condições aeróbias, é algo já há muito reconhecido como sendo um dos aspectos mais marcantes de uma grande generalidade de linhas tumorais, sendo mesmo vulgarmente designado por “efeito de Warburg” (Warburg, 1956a, 1956b). De facto, inúmeras células tumorais fazem uso do processo glicolítico como principal via para a produção de energia, a que se segue o processo de fermentação láctica, com conseqüente aumento dos níveis intracelulares de lactato (Griffin & Shockcor, 2004; Chun *et al.*, 2009). Os elevados níveis de lactato

produzidos e detectados no meio de cultura das linhas celulares avaliadas neste trabalho eram em larga medida esperados, uma vez que esse é um fenótipo metabólico bastante comum em células cancerígenas em geral (Lunt & Vander Heiden, 2011) e também já detectados em biópsias de cancro colorretal (Moreno & Arús, 1996; Chun *et al.*, 2009; Ong *et al.*, 2010). Os elevados níveis de lactato produzidos não podem ser considerados como um produto supérfluo. Com efeito, assistimos actualmente ao desenvolvimento do conceito de “simbiose metabólica” no cancro (Nakajima & Van Houten, 2012). Esta simbiose aponta para uma diversidade metabólica no tumor, com diversas populações de células, umas com carácter mais glicolítico que produzem elevados níveis de lactato e outras com carácter mais oxidativo que usam esse lactato. Este conceito de heterogeneidade metabólica tumoral é muito importante no âmbito do desenvolvimento de alvos terapêuticos.

A metodologia aqui empregue para análise do metabolismo das células do cancro é particularmente única na sua capacidade de avaliar um possível (des)acoplamento entre o processo glicolítico/fermentação láctica e o processo oxidativo através do ciclo de Krebs. São múltiplos os parâmetros avaliados que permitem inferir acerca da interacção entre os dois processos metabólicos. As diversas razões de enriquecimentos de carbonos dos metabolitos intermediários analisadas são bastante elucidativas da predominância de metabolismo glicolítico nas diversas linhas celulares em estudo. Um elevado enriquecimento nos carbonos do intermediário metabólico lactato denota, não só, um fluxo glicolítico acentuado mas também o direccionar do piruvato gerado para o processo fermentativo, em vez de prosseguir para uma completa oxidação no ciclo de Krebs. A conversão de piruvato em lactato é tanto mais extensa quanto mais elevados forem os níveis de NADH citosólicos e também, certamente, quanto maiores forem os níveis da LDH (Williamson *et al.*, 1967; Fan *et al.*, 2011;). Na medida em que a medição dos níveis de piruvato é algo dificultada no espectro de RMN de extractos perclóricos de células, devido à resolução espectral e à estabilidade do metabolito, optou-se pela análise dos níveis de alanina, que são um reflexo bastante fidedigno dos níveis tecidulares de piruvato. Assim, a razão C3-Lac/C3-Ala foi, neste trabalho, olhada como uma medida do redox citosólico, pois a uma maior razão correspondem maiores razões NADH/NAD<sup>+</sup> e, logo, um citosol mais reduzido (Alves, Oliveira, & Carvalho, 2011; Nunes *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2011). De entre as várias linhas celulares estudadas as células da linha WiDr são as que em condição de normoxia e de elevada concentração de glicose

apresentaram as razões C3-Lac/C3-Ala mais elevadas, seguidas das C2BBe1 e, por fim, as LS1034. A razão C3-Lac/C3-Ala pode ser correlacionada com o tempo de duplicação das células de cada linha celular estudada. Neste contexto, a uma maior razão C3-Lac/C3-Ala deverá corresponder um menor tempo de duplicação celular pois estarão mais acauteladas as necessidades biossintéticas, quer mediante maiores quantidades de intermediários, que podem ser usados como fontes de carbono, quer pelo facto de existir maior potencial redutor citosólico passível de ser utilizado na biossíntese dos intermediários biossintéticos requeridos para o processo de divisão celular. O excesso de NADH citosólico pode ser convertido em NADPH mediante a acção de transhidrogenases (Gameiro *et al.*, 2013), providenciando dessa forma o potencial redutor biossintético. Como podemos apreciar, as células WiDr são as que apresentam menores tempos de duplicação, o que é concordante com a maior razão C3-Lac/C3-Ala. No extremo oposto temos as células LS1034 que são as que possuem tempos de duplicação mais longos assim como menores razões C3-Lac/C3-Ala.

A razão C3-Lac/C4-Glu é a mais representativa do acoplamento entre o processo glicolítico e o processo oxidativo através do ciclo de Krebs. Um maior enriquecimento no intermediário lactato, que não seja traduzido num maior enriquecimento no intermediário glutamato, denota, por si só, um desacoplamento notório entre os dois processos metabólicos. A razão que deveria ser aqui utilizada seria a C3F-Lac/C4F-Glu pois comportaria a informação do enriquecimento fraccionário, crucial para uma adequada avaliação do estado estacionário metabólico. Em virtude de não se possuir a componente C4F-Glu devido à resolução e sensibilidade espectrais, optou-se por medir as áreas absolutas das respectivas ressonâncias, o que não deixa de ser uma medição alternativa de enorme importância. Conforme podemos apreciar na figura 70, as razões C3-Lac/C4-Glu seguem de muito perto as razões C3-Lac/C3-Ala, o que traduz uma correlação directa entre metabolismo mais glicolítico/fermentativo e maior redox citosólico. Temos pois que as duas razões providenciam uma mesma leitura metabólica, que é a de que a maiores taxas oxidativas correspondem maiores tempos de duplicação celular e, logo, menor proliferação celular.

Um outro parâmetro de enorme importância é a razão C4Q/C4D45 pois providencia uma medida da actividade do ciclo de Krebs. O multipletto C4Q, que apenas surge numa segunda volta do ciclo e em voltas subsequentes (figura 71), é tanto mais significativo quanto mais oxidativo for o metabolismo celular. Podemos apreciar, pelos histogramas da figura 71A, que ocorre uma significativa

variabilidade nos valores desta razão, manifestando-se no entanto uma tendência concordante com o acima referido para a razão C3-Lac/C4-Glu. Com efeito a razão é em média mais pequena para as células WiDr e maior para as células LS1034 em condição de normoxia e de elevada concentração de glicose. A um maior fluxo oxidativo no ciclo de Krebs está associado uma menor taxa proliferativa, pelo que esta razão traduz que quanto mais carbono é eliminado na forma de CO<sub>2</sub> menor é a quantidade disponível para os processos biossintéticos. Esta maior actividade oxidativa no ciclo de Krebs tem correlação directa com uma maior actividade do complexo IV da cadeia respiratória (figura 75).

Os efeitos da hipoxia em termos dos parâmetros metabólicos atrás discutidos são bastante distintos nas três linhas celulares. O aumento na produção de lactato induzido pela hipoxia (figura 67), como forma compensadora para a redução significativa de metabolismo oxidativo, é mais acentuado nas células LS1034 do que nas WiDr e C2BBe1, em conformidade com a menor dependência destas últimas da oxidação, através do ciclo de Krebs, em condição de normoxia e de elevada concentração de glicose. As mais afetadas são as células LS1034, que, como resposta a uma redução significativa nos teores de oxigénio, aumentam o metabolismo anaeróbio para suprir as suas necessidades energéticas. Nas primeiras 8 horas de hipoxia assistimos mesmo a uma triplicação da taxa fermentativa, ao ponto de praticamente se esgotar toda a glicose do meio em períodos tão curtos como 24 horas. A menor dependência do metabolismo oxidativo das outras duas linhas celulares torna-as menos susceptíveis à hipoxia, como seria de esperar.

Em termos de efeito da redução na concentração de glicose de 25 mM para 5 mM, observamos, essencialmente, uma redução do lactato produzido, consistente com um menor fluxo glicolítico. Tal está patente tanto na redução das razões C3-Lac/C3-Ala como das razões C3-Lac/C4-Glu. Em suma, estamos perante uma situação em que o metabolismo, no seu todo, está significativamente inibido.

## Capítulo VII

### Conclusões e Perspectivas Futuras



Ao longo dos diferentes capítulos da descrição do trabalho experimental deste projecto foram interpretados e discutidos os resultados obtidos. Assim, no final dos capítulos IV, V e VI da Parte II que integra o trabalho experimental foi apresentada a discussão parcelar de cada temática que integrou os diferentes resultados. Desde a síntese à marcação radioactiva de novos complexos detectores de hipoxia *in vivo* e por métodos imagiológicos, a caracterização da captação em diferentes linhas celulares de cancro do cólon destes radiofármacos sintetizados, para além do  $^{18}\text{F}$ -FDG, em ambiente de hipoxia, constituíram os objectivos do capítulo IV – Cinética de Radiofármacos em Hipoxia. A caracterização da resposta da célula tumoral do cólon ao ambiente de hipoxia ao nível da alteração de algumas funções como a actividade metabólica ou ciclo celular assim como na expressão de algumas proteínas constituíram objectivos do capítulo V – Hipoxia na Célula do Cancro do Cólon. Com o objectivo de perceber as alterações encontradas, o capítulo VI permitiu o aprofundar o estudo do metabolismo, através de espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear realizada nas três linhas celulares de cancro do cólon.

Assim, neste capítulo VII serão destacadas as conclusões de maior relevância assim como as perspectivas futuras mais importantes na continuação do estudo deste tema que de forma alguma se esgota no trabalho realizado.

1. O capítulo IV – Cinética de Radiofármacos em Hipoxia – propõe um complexo com características favoráveis para ser considerado como traçador de hipoxia. A discussão das diferentes características dos vários ligandos e complexos obtidos permitiu confirmar e reiterar as especificidades necessárias a um bom traçador de hipoxia.
2. Neste trabalho experimental foram sintetizados cinco ligandos (**17, 18, 21, 22 e 23**) para os quais foram testados diferentes procedimentos de marcação. No processo de radiomarkação, diferentes características foram testadas: concentração de ligando, o agente redutor e a sua concentração, actividade do radionuclídeo, temperatura da reacção e a utilização de agentes quelantes. De todos os ligandos testados só os ligandos **21, 22 e 23** conseguiram ser marcados com Tecnécio-99m com eficiência de marcação superior a 90%.

3. Através da estrutura química de cada ligando que foi estudado confirmou-se a adequação de ligandos bidentados para a realização do procedimento de radiomarcção com recurso ao *kit* comercial Isolink®. Depois de marcados e tendo em conta o ambiente de hipoxia, objectivo de estudo dos radiotraçadores desenvolvidos, concluiu-se que a lipofilicidade, inferida através do coeficiente de partição *n*-octanol/água, constitui uma característica de relevo que condiciona a captação dos radiotraçadores nas circunstâncias estudadas.
4. Os resultados obtidos com as diferentes linhas celulares de cancro do cólon com o <sup>18</sup>F-FDG revelaram que, apesar de ser considerado um radiofármaco de eleição para a detecção e estadiamento de diferentes tumores, este radiofármaco apresenta alterações na sua captação que estão relacionadas com a hipoxia, uma característica com relevância dos tumores sólidos.
5. Foi possível concluir, de acordo com os resultados obtidos, que a captação do <sup>18</sup>F-FDG, para além de ser influenciada por factores do microambiente tumoral, como a hipoxia, poderá ser também influenciada por alterações nas células tumorais como sejam a existência ou o desenvolvimento de resistência a multifármacos, outra das características que muito influencia a resposta à terapia por parte dos tumores.
6. Os resultados obtidos no capítulo V – Hipoxia na Célula de Cancro do Cólon – onde foram utilizadas diferentes técnicas na área da biologia celular e molecular, permitiram concluir que a resposta da célula do cancro do cólon é distinta, tendo em conta o período de tempo em que as células estão expostas à redução de oxigénio no microambiente. Assim, um período de incubação em ambiente de hipoxia de duas horas pode constituir para as células do cancro do cólon um estímulo à actividade metabólica e à síntese proteica, o que não acontece às 48 horas, situação em que estas funções celulares se encontram diminuídas.
7. Através dos resultados obtidos constatou-se também a distinção dos diferentes tipos de hipoxia, de 2 e 48 h, relativamente à produção de espécies reactivas de oxigénio. Com estes resultados, e de acordo com a conclusão anterior, a célula responde à hipoxia de 2 h como uma situação de

stresse provisória tentando ajustar-se à difícil alteração que é a redução drástica de oxigênio. No entanto, e tendo em conta a diminuição das espécies reactivas de oxigênio e os resultados referentes ao ciclo celular, conclui-se que a hipoxia de 48 horas promove na célula uma resposta mais “realista” e, por isso, a adaptação de todas as suas funções, inclusivamente a paragem no ciclo celular, para que possa ser possível “sobreviver” ao ambiente hostil.

8. A resposta à alteração do microambiente tumoral, pelas várias linhas celulares do mesmo tipo de tumor, não é semelhante. A alteração de expressão de diferentes proteínas parece condicionar as funções exercidas pela célula em resposta às alterações do microambiente tumoral. Com os resultados obtidos é possível concluir-se que a expressão da proteína p53 se relaciona com a expressão de HIF-2 $\alpha$ . Por sua vez, a expressão destas proteínas encontra-se relacionada com os parâmetros estudados neste capítulo, permitindo depreender que a resposta da célula tumoral do cólon à alteração do microambiente tumoral é influenciada pelo seu *background* genético.
9. Com os resultados dos capítulos atrás enumerados, o capítulo VI – Metabonómica da Hipoxia – surge pela necessidade de aprofundar o estudo do metabolismo das três linhas celulares de cancro do cólon. Assim, a utilização da Medicina Nuclear, uma técnica com elevada sensibilidade, aliada à Ressonância Magnética Nuclear, caracterizada pela especificidade de informação metabólica, permitiu aprofundar o conhecimento acerca do metabolismo da célula tumoral do cólon e, mais especificamente, ajudar a perceber a influência do *background* no metabolismo em resposta à alteração do microambiente tumoral.
10. Com a espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear confirmou-se a existência do efeito de Warburg nas linhas celulares estudadas. Ou seja, de acordo com os resultados obtidos em que se verifica um elevado enriquecimento nos carbonos do intermediário metabólico lactato, e de acordo com os pressupostos desta teoria ocorre um incremento da produção de lactato mesmo em condições aeróbias. Assim, as células optam por um metabolismo glicolítico em detrimento do metabolismo oxidativo.

11. A hipoxia provou possuir um efeito distinto nas três linhas celulares de cancro de cólon usadas ao nível do metabolismo estudado por Ressonância Magnética Nuclear. Esta alteração no microambiente demonstrou que a linha celular que possui características de resistência aos diferentes fármacos utilizados na quimioterapia, a linha celular LS1034, aumentou drasticamente o seu metabolismo anaeróbio para suprimir as necessidades energéticas.
12. Em relação às restantes linhas celulares, WiDr e C2BBE1, como são menos dependentes do metabolismo oxidativo, serão menos susceptíveis à alteração do microambiente aquando do abaixamento da  $pO_2$  na célula.

De acordo com o trabalho desenvolvido, este estudo experimental representa um contributo inovador nesta área. A hipoxia, característica dos tumores sólidos, constitui um entrave ao sucesso da terapêutica actualmente utilizada no cancro. Assim, e de acordo com os resultados obtidos este trabalho poderá constituir um ponto de partida para estudos posteriores com vista a aprofundar os conhecimentos já adquiridos. Assim, como perspectivas futuras propõe-se:

1. Relativamente aos radiofármacos desenvolvidos, a realização dos estudos de biodistribuição permitirá a caracterização da farmacocinética dos complexos, conhecendo-se o(s) órgão(s) alvo, assim como as vias de metabolização e de excreção. De acordo com a localização primária do cancro do cólon e das eventuais lesões secundárias que, na maioria das vezes, se localizam no fígado, o estudo da biodistribuição do radiofármaco, assim como dos parâmetros farmacocinéticos, constituem uma área de investigação de enorme importância.
2. Neste trabalho as linhas celulares de cancro do cólon foram obtidas a partir de tumores humanos. As inúmeras vantagens associadas ao

estudo com linhas celulares sobrepõem-se às desvantagens, já que as linhas celulares são muito bem caracterizadas, o que torna a amostra muito homogênea e, neste tipo de estudos, a homogeneidade da amostra é muito importante. Porém, os dados por obtidos permitem que pensar que estes métodos poderiam ser aplicados aos doentes portadores deste tipo de patologia. Assim, seria interessante a replicação destes estudos em biópsias de tumores primários e secundários do cólon de doentes. A realização deste tipo de estudo permitirá chegar o mais próximo possível da realidade, permitindo não só conhecer as características metabólicas do tumor em avaliação, como também inferir acerca da melhor abordagem no tratamento do doente dador.

3. Devido à heterogeneidade do tecido, e existindo a possibilidade do seu estudo em amostras de tumores colhidos por biópsias, com expansão *in vitro* através de culturas tridimensionais, poder-se-à aprofundar o conceito de “simbiose metabólica” no cancro do cólon. Assim, utilizando espectroscopia de Ressonância Magnética complementada com imagem molecular através da utilização de diferentes radiotraçadores, poder-se-á estender este conceito aos doentes e daí inferir acerca da melhor abordagem, não só para a terapêutica, como para o seguimento.



**PARTE III**  
**REFERÊNCIAS**



Abrantes AM, Serra E, Goncalves C, Oliveiros B, Laranjo M, Sarmento-Ribeiro AB, Rocha-Gonsalves A & Botelho MF (2012). Tumour hypoxia and technetium tracers: in vivo studies. *Current Radiopharmaceuticals*, 5(2), 99–105.

Abrantes AM. (2008). Avaliação da hipóxia tumoral em adenocarcinoma coloretal. *Tese de mestrado em Biologia Celular*. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Abrantes AM, Serra ME, Murtinho D, Gonsalves AR, & Botelho MF. (2009). An insight into tumoral hypoxia: the radiomarkers and clinical applications. *Oncology Reviews*, 3(1), 3–18.

Abrantes AM, Serra MES, Gonçalves AC, Rio J, Oliveiros B, Laranjo M, Rocha-Gonsalves A, Botelho MF. (2010). Hypoxia-induced redox alterations and their correlation with <sup>99m</sup>Tc-MIBI and <sup>99m</sup>Tc-HL-91 uptake in colon cancer cells. *Nuclear Medicine and Biology*, 37(2), 125–32.

Achison M, & Hupp TR. (2003). Hypoxia attenuates the p53 response to cellular damage. *Oncogene*, 22(22), 3431–40.

Agarwal ML, Agarwal A, Taylor WR, & Stark GR (1995). p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(18), 8493–7.

Agrawal JR; Anania FA; Banks PA; Bleday R; Blumberg RS, Burakoff R; Carr-Locke DL; Chan WW; Chaudhury A; Cohen DE; Conwell DL; Dienstag J; Friedamn S; Grace ND; Greenberger NJ; Irani JL; Jajoo K; Kastrinos F; Kumar S; Kuo TT; Lee LS; Levine JS, Lew E; Smith B; Snapper SB; Stoffel EM; Syngal S; Thompson CC; Travis AC; Trier JS; Ukomadu C; Wu BU & Zhu Z. (2012). *Current Diagnosis & Treatment. Gastroenterology, Hepatology & Endoscopy*. (N. J. Greenberger, Ed.) (Second., p. 570). McGraw Hill LangeTM.

Alberto R, Schibli R, Egli A, SA (1998). A novel organometallic aqua complex of technetium for the labeling of biomolecules: synthesis of [<sup>99m</sup>Tc(OH)<sub>2</sub>]<sub>3</sub>(CO)<sub>3</sub>]+ from [<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub>-] in aqueous solution and its reaction with a bifunctional ligand. *Journal of the American Chemical Society*, 120, 7987– 7988.

Alberto R, Egli A, Abram U, Hegetschweiler K, Gramlich V, & Schubiger, PA (1994). Synthesis and reactivity of [NEt<sub>4</sub>]<sub>2</sub>[ReBr<sub>3</sub>(CO)<sub>3</sub>]. Formation and structural

characterization of the clusters  $[\text{NEt}_4][\text{Re}_3(\mu_3\text{-OH})(\mu\text{-OH})_3(\text{CO})_9]$  and  $[\text{NEt}_4][\text{Re}_2(\mu\text{-OH})_3(\text{CO})_6]$  by alkaline titration. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, (19), 2815.

Alves MG, Oliveira PJ, & Carvalho RA (2011). Substrate selection in hearts subjected to ischemia/reperfusion: role of cardioplegic solutions and gender. *NMR in biomedicine*, 24(9), 1029–37.

Amellem O., & Pettersen E. O. (1991). Cell inactivation and cell cycle inhibition as induced by extreme hypoxia: the possible role of cell cycle arrest as a protection against hypoxia-induced lethal damage. *Cell Proliferation*, 24(2), 127–41.

Archer CM, Binke JF, Canning LR, Edwards B, & King AC. (1999). Radiometal complexes that localize in hypoxic tissue. Patent 5,997,843 - USA

Arnold CN, Goel A, Blum HE, & Boland CR. (2005). Molecular pathogenesis of colorectal cancer: implications for molecular diagnosis. *Cancer*, 104(10), 2035–47.

Aschele C, Bergamo F, & Lonardi S. (2009). Chemotherapy for operable and advanced colorectal cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 35(6), 509–16.

Axelsson H, Fredlund E, Ovenberger M, Landberg G, & Pählman S. (2005). Hypoxia-induced dedifferentiation of tumor cells - a mechanism behind heterogeneity and aggressiveness of solid tumors. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 16(4-5), 554–63.

Baggetto LG, & Lehninger AL. (1987a). Formation and utilization of acetoin, an unusual product of pyruvate metabolism by Ehrlich and AS30-D tumor mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(20), 9535–41.

Baggetto LG, & Lehninger AL. (1987b). Isolated tumoral pyruvate dehydrogenase can synthesize acetoin which inhibits pyruvate oxidation as well as other aldehydes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 145(1), 153–9.

Ballinger JR. (2001). Imaging hypoxia in tumors. *Seminars in Nuclear Medicine*, 31(4), 321–9.

Basson MD, Modlin IM, & Madri JA. (1992). Human enterocyte (Caco-2) migration is modulated in vitro by extracellular matrix composition and epidermal growth factor. *The Journal of Clinical Investigation*, 90(1), 15–23.

- Bell EL, Klimova TA, Eisenbart J, Schumacker PT, & Chandel NS. (2007). Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-inducible factor-dependent extension of the replicative life span during hypoxia. *Molecular and Cellular Biology*, 27(16), 5737–45.
- Ben-Haim S, & Ell P. (2009). 18F-FDG PET and PET/CT in the evaluation of cancer treatment response. *Journal of Nuclear Medicine*, 50(1), 88–99.
- Bensaad K, Tsuruta A, Selak MA, Vidal MNC, Nakano K, Bartrons R, Nakano M, Katsunori B, Ramon G & Vousden, KH. (2006). TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell*, 126(1), 107–20.
- Bensinger SJ, & Christofk HR. (2012). New aspects of the Warburg effect in cancer cell biology. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 23(4), 352–61.
- Billin AN, Eilers AL, Coulter KL, Logan JS, & Ayer DE. (2000). MondoA, a novel basic helix-loop-helix-leucine zipper transcriptional activator that constitutes a positive branch of a max-like network. *Molecular and Cellular Biology*, 20(23), 8845–54.
- Bormans G, Cleyhens B, De Groot TJ, Mortelmans L, Moretti JL, & Verbruggen A. (2003). Synthesis, radio-LC-MS analysis and biodistribution in mice of <sup>99m</sup>Tc-NIM-BAT. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 46(6), 575–585.
- Botelho MF, & Abrantes AM. (2012). Radiotracers in oncology. *Current Radiopharmaceuticals*, 5(2), 79–89.
- Box AH, & Demetrick DJ. (2004). Cell cycle kinase inhibitor expression and hypoxia-induced cell cycle arrest in human cancer cell lines. *Carcinogenesis*, 25(12), 2325–35.
- Brahimi-Horn MC, Bellot G, & Pouyssegur J. (2011). Hypoxia and energetic tumour metabolism. *Current Opinion in Genetics & Development*, 21(1), 67–72.
- Brahimi-Horn MC, Chiche J, & Pouyssegur J. (2007). Hypoxia signalling controls metabolic demand. *Current Opinion in Cell Biology*, 19(2), 223–9.
- Britz-Cunningham SH, & Adelstein SJ. (2003). Molecular targeting with radionuclides: state of the science. *Journal of Nuclear Medicine*, 44(12), 1945–61.
- Buck AK; Neske SN. (2004). Cellular Origin and Molecular Mechanisms of 18F-FDG Uptake: Is There a Contribution of the Endothelium? *Journal of Nuclear Medicine*, 45(3), 461–463.

Buerkle A, & Weber WA. (2008). Imaging of tumor glucose utilization with positron emission tomography. *Cancer Metastasis Reviews*, 27(4), 545–554.

Burgman P, Odonoghue JA, Humm JL, & Ling CC. (2001). Hypoxia-Induced increase in FDG uptake in MCF7 cells. *Journal of Nuclear Medicine*, 42(1), 170–5.

Buscombe JR, & Bombardieri E. (2005). Imaging cancer using single photon techniques. *The quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 49(2), 121–31.

Busk M, Horsman MR, Jakobsen S, Bussink J, Van der Kogel A, & Overgaard J. (2008). Cellular uptake of PET tracers of glucose metabolism and hypoxia and their linkage. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 35(12), 2294–303.

Busk M, Horsman MR, Kristjansen PEG, Van der Kogel AJ, Bussink J, & Overgaard J. (2008). Aerobic glycolysis in cancers: implications for the usability of oxygen-responsive genes and fluorodeoxyglucose-PET as markers of tissue hypoxia. *International Journal of Cancer*, 122(12), 2726–34.

Büttner S, Bitto A, Ring J, Augsten M, Zabrocki P, Eisenberg T, Jungwirth, H, Hutter S, Carmona-Gutierrez D, Kroemer G, Winderickx J & Madeo F. (2008). Functional mitochondria are required for alpha-synuclein toxicity in aging yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(12), 7554–60.

Calvert PM, & Frucht H. (2002). The genetics of colorectal cancer. *Annals of Internal Medicine*, 137(7), 603–12.

Carlin S, & Humm JL. (2012). PET of hypoxia: current and future perspectives. *Journal of Nuclear Medicine*, 53(8), 1171–4.

Carvalho RA, Zhao P, Wieggers CB, Jeffrey FM, Malloy CR, & Sherry AD. (2001). TCA cycle kinetics in the rat heart by analysis of (13)C isotopomers using indirect (1)H. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 281(3), H1413–21.

Carvalho RA, Rodrigues TB, Zhao P, Jeffrey FMH, Malloy CR, & Sherry AD. (2004). A (13)C isotopomer kinetic analysis of cardiac metabolism: influence of altered cytosolic redox and [Ca(2+)](o). *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 287(2), H889–95.

- Casalta-Lopes J, Abrantes AM, Laranjo M, Rio J, Gonçalves AC, Oliveiros B, Sarmiento-Ribeiro AB & Botelho MF. (2011). Efflux Pumps Modulation in Colorectal Adenocarcinoma Cell Lines: The Role of Nuclear Medicine. *Journal of Cancer Therapy*, 02(03), 408–417.
- Chan DA, Sutphin PD, Denko NC, & Giaccia AJ. (2002). Role of prolyl hydroxylation in oncogenically stabilized hypoxia-inducible factor-1alpha. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(42), 40112–7.
- Chan N, Milosevic M, & Bristow RG. (2007). Tumor hypoxia, DNA repair and prostate cancer progression: new targets and new therapies. *Future Oncology*, 3(3), 329–41.
- Chance EM, Seeholzer SH, Kobayashi K, & Williamson JR. (1983). Mathematical analysis of isotope labeling in the citric acid cycle with applications to <sup>13</sup>C NMR studies in perfused rat hearts. *The Journal of Biological Chemistry*, 258(22), 13785–94.
- Chapman JD. (1979). Hypoxic sensitizers--implications for radiation therapy. *The New England Journal of Medicine*, 301(26), 1429–32.
- Chapman JD, Engelhardt EL, Stobbe CC, Schneider RF, & Hanks GE. (1998). Measuring hypoxia and predicting tumor radioresistance with nuclear medicine assays. *Radiotherapy and Oncology*, 46(3), 229–37.
- Chapman JD, Zanzonico P, & Ling CC. (2001). On measuring hypoxia in individual tumors with radiolabeled agents. *Journal of Nuclear Medicine*, 42(11), 1653–5.
- Cheng T, Sudderth J, Yang C, Mullen AR, Jin ES, Matés JM, & DeBerardinis RJ. (2011). Pyruvate carboxylase is required for glutamine-independent growth of tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(21), 8674–9.
- Chiche J, Brahim-Horn MC, & Pouysségur J. (2010). Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: a common feature in cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(4), 771–94.
- Christian N, Deheneffe S, Bol A, De Bast M, Labar D, Lee JA, & Grégoire V. (2010). Is (18)F-FDG a surrogate tracer to measure tumor hypoxia? Comparison with the

hypoxic tracer (14)C-EF3 in animal tumor models. *Radiotherapy and Oncology*, 97(2), 183–8.

Chun E, Chan Y, Koh PK, Mal M, Cheah PY, Eu KW, Backshall, Cavill A, Nicholson R, Jeremy K & Keun HC. (2009). Metabolic Profiling of Human Colorectal Cancer Using High-Resolution Magic Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance (HR-MAS NMR) Spectroscopy and Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC / MS) research articles. *Journal of Proteome Research*, 352–361.

Cline GW, Pongratz RL, Zhao X, & Papas KK. (2011). Rates of insulin secretion in INS-1 cells are enhanced by coupling to anaplerosis and Krebs's cycle flux independent of ATP synthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 415(1), 30–5.

Correale P, Tagliaferri P, Fioravanti A, Del Vecchio MT, Remondo C, Montagnani F, Ginanneschi, C Martellucci, I Francini E, Cusi M, Tassone P & Francini G. (2008). Immunity feedback and clinical outcome in colon cancer patients undergoing chemoimmunotherapy with gemcitabine + FOLFOX followed by subcutaneous granulocyte macrophage colony-stimulating factor and aldesleukin (GOLFIG-1 Trial). *Clinical Cancer Research*, 14(13), 4192–9.

Couturier O, Luxen A, Chatal JF, Vuillez JP, Rigo P, & Hustinx R. (2004). Fluorinated tracers for imaging cancer with positron emission tomography. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 31(8), 1182–206.

Dai Y, Bae K, & Siemann DW. (2011). Impact of hypoxia on the metastatic potential of human prostate cancer cells. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 81(2), 521–8.

Dang CV. (2007). The interplay between MYC and HIF in the Warburg effect. *Ernst Schering Foundation Symposium Proceedings*, (4), 35–53.

Dang CV. (2012). Links between metabolism and cancer. *Genes & Development*, 26(9), 877–90.

Das T, Banerjee S, Samuel G, Sarma HD, Korde A, Venkatesh M, & Pillai MR.. (2003). <sup>99m</sup>Tc-labeling studies of a modified metronidazole and its biodistribution in tumor bearing animal models. *Nuclear Medicine and Biology*, 30(2), 127–34.

- Dayan F, Roux D, Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J, & Mazure NM. (2006). The oxygen sensor factor-inhibiting hypoxia-inducible factor-1 controls expression of distinct genes through the bifunctional transcriptional character of hypoxia-inducible factor-1alpha. *Cancer Research*, 66(7), 3688–98.
- De Dosso S, Sessa C, & Saletti P. (2009). Adjuvant therapy for colon cancer: present and perspectives. *Cancer Treatment Reviews*, 35(2), 160–6.
- De la Chapelle A. (2004). Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 4(10), 769–80.
- DeBerardinis RJ, & Cheng T. (2010). Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene*, 29(3), 313–24.
- DeBerardinis RJ, Mancuso A, Daikhin E, Nissim I, Yudkoff M, Wehrli S, & Thompson, CB. (2007). 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*, 104(49), 19345–50.
- Diaz-Ruiz R, Rigoulet M, & Devin A. (2011). The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1807(6), 568–76.
- Digenis GA. (1992). Textbook of Radiopharmacy. Theory and practice. In C. B. Sampson (Ed.), *Journal of Pharmaceutical Sciences* (Vol. 81, p. 730). New York.
- Douglas RM, Farahani R, Morcillo P, Kanaan A, Xu T, & Haddad GG. (2005). Hypoxia induces major effects on cell cycle kinetics and protein expression in *Drosophila melanogaster* embryos. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 288(2), R511–21.
- Eskola O, Grönroos TJ, Forsback S, Tuomela J, Komar G, Bergman J, Härkönen P, Haaparanta M, Minn H & Solin O. (2012). Tracer level electrophilic synthesis and pharmacokinetics of the hypoxia tracer [(18)F]EF5. *Molecular Imaging and Biology*, 14(2), 205–12.
- Fan J, Hitosugi T, Chung TW, Xie J, Ge Q, Gu TL, Polakiewicz R, Chen GZ, Boggon T, Lonial S, Khuri FR, Kang S & Chen J (2011). Tyrosine phosphorylation of lactate

dehydrogenase A is important for NADH/NAD(+) redox homeostasis in cancer cells. *Molecular and Cellular Biology*, 31(24), 4938–50.

Fan TWM, Lane AN, Higashi RM, Farag MA, Gao H, Bousamra M, & Miller DM. (2009). Altered regulation of metabolic pathways in human lung cancer discerned by (13)C stable isotope-resolved metabolomics (SIRM). *Molecular Cancer*, 8, 41.

Fauci A, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, & Loscalzo J (2008). *Harrison's Principles of Internal Medicine*. JAMA, 17th edition, Vol. 308,. MC Graw Hill.

Fearon ER, & Vogelstein B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61(5), 759–67.

Feron O. (2009). Pyruvate into lactate and back: from the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells. *Radiotherapy and Oncology*, 92(3), 329–33.

Ferlay J. (2008) GLOBOCAN v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase no.10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer (2010). Acedido pela última vez em 10.05.2013 às 11h00 at <<http://globocan.iarc.fr>>

Ferreira LMR, Hebrant A, & Dumont JE. (2012). Metabolic reprogramming of the tumor. *Oncogene*, 31(36), 3999–4011.

Freedman SJ, Sun ZYJ, Poy F, Kung AL, Livingston DM, Wagner G, & Eck MJ. (2002). Structural basis for recruitment of CBP/p300 by hypoxia-inducible factor-1 alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(8), 5367–72.

Frezza C, & Gottlieb E. (2009). Mitochondria in cancer: not just innocent bystanders. *Seminars in Cancer Biology*, 19(1), 4–11.

Gagel B, Reinartz P, Demirel C, Kaiser HJ, Zimny M, Piroth M, Pinkawa M, Stanzel S, Asadpour B, Hamacher K, Coenen H, Buell U & Eble MJ. (2006). [18F]fluoromisonidazole and [18F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography in response evaluation after chemo-/radiotherapy of non-small-cell lung cancer: a feasibility study. *BMC cancer*, 6, 51.

- Gameiro PA, Laviolette LA, Kelleher JK, Iliopoulos O & Stephanopoulos G (2013). Cofactor balance by nicotinamide nucleotide transhydrogenase (NNT) coordinates reductive carboxylation and glucose catabolism in the TCA cycle. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(8), 12967-77.
- Garcia-Barreno B, Delgado T, Akerlind-Stopner B, Norrby E, & Melero JA. (1992). Location of the epitope recognized by monoclonal antibody 63G on the primary structure of human respiratory syncytial virus G glycoprotein and the ability of synthetic peptides containing this epitope to induce neutralizing antibodies. *The Journal of General Virology*, 73(6), 2625-30.
- Gatenby RA, & Gillies RJ. (2004). Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nature Reviews. Cancer*, 4(11), 891-9.
- Gatenby RA, & Gillies RJ. (2007). Glycolysis in cancer: a potential target for therapy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(7-8), 1358-66.
- Goethals L, Debucquoy A, Perneel C, Geboes K, Ectors N, De Schutter H, Penninckx F, McBride WH, Begg AC & Haustermans KM. (2006). Hypoxia in human colorectal adenocarcinoma: comparison between extrinsic and potential intrinsic hypoxia markers. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 65(1), 246-54.
- Gonsalves ., Serra ., & Murtinh, D. (2006). Approach to a better understanding and modelling of Beta-pyrrolidinoalcohol ligands for enantioselective alkylation. *Journal of Molecular Catalysis*, 250, 104-113.
- Graeber TG, Peterson JF, Tsai M, Monica K, Fornace AJ, & Giaccia AJ.Ç (1994). Hypoxia induces accumulation of p53 protein, but activation of a G1-phase checkpoint by low-oxygen conditions is independent of p53 status. *Molecular and Cellular Biology*, 14(9), 6264-77.
- Grazina MM (2004) Genoma mitocondrial e déficit energético no diagnóstico das doenças da cadeia respiratória mitocondrial. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra
- Green SL, & Giaccia AJ. (1998). Tumor hypoxia and the cell cycle: implications for malignant progression and response to therapy. *The Cancer Journal*, 4(4), 218-23.

Griffin JL, & Shockcor, JP. (2004). Metabolic profiles of cancer cells. *Nature Reviews. Cancer*, 4(7), 551–61.

Grunbaum Z, Freauff SJ, Krohn KA, Wilbur DS, Magee S, & Rasey JS. (1987). Synthesis and characterization of congeners of misonidazole for imaging hypoxia. *Journal of Nuclear Medicine*, 28(1), 68–75.

Gudkov AV, & Komarova EA. (2003). The role of p53 in determining sensitivity to radiotherapy. *Nature Reviews. Cancer*, 3(2), 117–29.

Gudkov AV, & Komarova EA. (2010). Pathologies associated with the p53 response. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(7), 1–26.

Hammond EM, Denko NC, Dorie MJ, Abraham RT & Giaccia AJ. (2002). Hypoxia links ATR and p53 through replication arrest. *Molecular Cell Biology* 22(6), 1834-1843

Hammond EM, & Giaccia AJ. (2005). The role of p53 in hypoxia-induced apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 331(3), 718–25.

Hanahan D, & Weinberg RA. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57–70.

Hanahan D, & Weinberg RA. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–74.

Harrison L, & Blackwell K. (2004). Hypoxia and anemia: factors in decreased sensitivity to radiation therapy and chemotherapy? *The oncologist*, 9 (5), 31–40.

Harrison S, & Benziger H. (2011). The molecular biology of colorectal carcinoma and its implications: a review. *The Surgeon*, 9(4), 200–10.

Hector S, & Prehn JHM. (2009). Apoptosis signaling proteins as prognostic biomarkers in colorectal cancer: a review. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1795(2), 117–29.

Heerlein K, Schulze A, Hotz L, Bärtsch P, & Mairbäurl H. (2005). Hypoxia decreases cellular ATP demand and inhibits mitochondrial respiration of A549 cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 32(1), 44–51.

Hodgkiss RJ. (1998). Use of 2-nitroimidazoles as bioreductive markers for tumour hypoxia. *Anti-cancer Drug Design*, 13(6), 687–702.

Hoebbers FJP, Janssen HLK, Olmos AV, Sprong D, Nunn AD, Balm AJM, Hoefnagel C, Begg AC & Haustermans, KMG. (2002). Phase 1 study to identify tumour hypoxia in patients with head and neck cancer using technetium-99m BRU 59-21. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 29(9), 1206–11.

Holland JP, Lewis JS, & Dehdashti F. (2009). Assessing tumor hypoxia by positron emission tomography with Cu-ATSM. *The Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 53(2), 193–200.

Hsia CC, Huang FL, Lin CH, Shen LH, & Wang HE. (2010). The preparation and biological characterization of a new HL91-derivative for hypoxic imaging on stroke mice. *Applied Radiation and Isotopes*, 68(9), 1610–5.

Hsu PP, & Sabatini DM. (2008). Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell*, 134(5), 703–7.

Huang H, Zhou H, Li Z, Wang X, & Chu T. (2012). Effect of a second nitroimidazole redox centre on the accumulation of a hypoxia marker: synthesis and in vitro evaluation of <sup>99m</sup>Tc-labeled bisnitroimidazole propylene amine oxime complexes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22(1), 172–7.

Hung G, Weng Y, Wang L, Wang S, Hsia C, Wey S, Wang H, & Lin CL. (2002). Preliminary study of <sup>99m</sup>Tc-HL91 on a tumor mouse model. *Annals Nuclear Medicine Science*, 15, 85–91.

Hungerbuhler E, Naef R, Wasmuth D, Seebach D, Loosli HR, & Wehrli A. (1980). Synthese optisch aktiver 2-Methyl- und 2-ethyl-1, 6-dioxaspiro [4.4]-nonan- und -[4.5]decan-Pheromone aus einem gemeinsamen chiralen Vorlaufer. *Helvetica Chimica Acta*, 63(7), 1960–1970.

Hägg M, & Wennström S. (2005). Activation of hypoxia-induced transcription in normoxia. *Experimental Cell Research*, 306(1), 180–91.

Höckel M, & Vaupel P. (2001a). Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(4), 266–76.

Höckel, M., & Vaupel, P. (2001b). Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(4), 266–76.

Icard, P., Poulain, L., & Lincet, H. (2012). Understanding the central role of citrate in the metabolism of cancer cells. *BBA - Reviews on Cancer*, 1825(1), 111–116.

Imahashi K, Morishita K, Kusuoka H, Yamamichi Y, Hasegawa S, Hashimoto K, Shirakami Y, Kato-Azuma M & Nishimura T. (2000). Kinetics of a putative hypoxic tracer, <sup>99m</sup>Tc-HL91, in normoxic, hypoxic, ischemic, and stunned myocardium. *Journal of nuclear medicine*, 41(6), 1102–7.

Imam SK. (2010). Review of positron emission tomography tracers for imaging of tumor hypoxia. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 25(3), 365–74.

Jeffrey FM, Rajagopal A, Malloy CR, & Sherry AD. (1991). <sup>13</sup>C-NMR: a simple yet comprehensive method for analysis of intermediary metabolism. *Trends in Biochemical Sciences*, 16(1), 5–10.

Jones RG, & Thompson CB. (2009). Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes & Development*, 23(5), 537–48.

Jurisson SS, & Lydon JD. (1999). Potential Technetium Small Molecule Radiopharmaceuticals. *Chemical Reviews*, 99(9), 2205–2218.

Kaelin WG, & Thompson, CB. (2010). Q&A: Cancer: clues from cell metabolism. *Nature*, 465(7298), 562–4.

Kaira K, Endo M, Abe M, Nakagawa K, Ohde Y, Okumura T, Takahashi T, Murakami M, Tsuya A, Nakamura Y, Naito T, Hayashi I, Serizawa M & Yamamoto N. (2010). Biologic correlation of 2-[<sup>18</sup>F]-fluoro-2-deoxy-D-glucose uptake on positron emission tomography in thymic epithelial tumors. *Journal of Clinical Oncology*, 28(23), 3746–53.

Kaluzová M, Kaluz S, Lerman MI, & Stanbridge EJ. (2004). DNA damage is a prerequisite for p53-mediated proteasomal degradation of HIF-1α in hypoxic cells and downregulation of the hypoxia marker carbonic anhydrase IX. *Molecular and Cellular Biology*, 24(13), 5757–66.

Kasibhatla S, & Tseng B. (2003). Why target apoptosis in cancer treatment? *Molecular Cancer Therapeutics*, 2(6), 573–80.

Klimberg VS, & McClellan JL. (1996). Claude H. Organ, Jr. Honorary Lectureship. Glutamine, cancer, and its therapy. *American Journal of Surgery*, 172(5), 418–24.

- Kondoh H, Leonart ME, Bernard D, & Gil J. (2007). Protection from oxidative stress by enhanced glycolysis; a possible mechanism of cellular immortalization. *Histology and Histopathology*, 22(1), 85–90.
- Kondoh Hiroshi. (2008). Cellular life span and the Warburg effect. *Experimental Cell Research*, 314(9), 1923–8.
- Koumenis C, Naczki C, Koritzinsky M, Rastani S, Diehl A, Sonenberg N, Koromilas A & Wouters BG. (2002). Regulation of protein synthesis by hypoxia via activation of the endoplasmic reticulum kinase PERK and phosphorylation of the translation initiation factor eIF2alpha. *Molecular and cellular biology*, 22(21), 7405–16.
- Krebs HA, & Johnson WA. (1937). Metabolism of ketonic acids in animal tissues. *The Biochemical Journal*, 31(4), 645–60.
- Krohn KA, Link JM, & Mason RP. (2008). Molecular imaging of hypoxia. *Journal of Nuclear Medicine*, 49 Suppl 2, 129S–48S.
- Kumar P, Wiebe LI, Mannan RH, Zhang Z, Xia H, & McEwan AJ B. (2002). [99mTc]Technetium labelled PnAo-azomycin glucuronides: a novel class of imaging markers of tissue hypoxia. *Applied Radiation and Isotopes*, 57(5), 719–28.
- Kunz M, & Ibrahim S (2003). Molecular responses to hypoxia in tumor cells. *Molecular Cancer*, 2(1), 23.
- Lanza IR, & Nair KS. (2010). Mitochondrial function as a determinant of life span. *European Journal of Physiology*, 459(2), 277–89.
- Lee JW, Bae SH, Jeong JW, Kim SH, & Kim KW. (2004). Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions. *Experimental & Molecular Medicine*, 36(1), 1–12.
- Lee K, Roth RA, & LaPres JJ. (2007). Hypoxia, drug therapy and toxicity. *Pharmacology & Therapeutics*, 113(2), 229–46.
- Lemasters JJ. (1999). V. Necrapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. *The American Journal of Physiology*, 276(1 Pt 1), G1–6.
- Lemasters, JJ. (2005). Dying a thousand deaths: redundant pathways from different organelles to apoptosis and necrosis. *Gastroenterology*, 129(1), 351–60.

Levine AJ, & Puzio-Kuter AM. (2010). The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes. *Science*, 330, 1340–4.

Liang X, & Sadler PJ. (2004). Cyclam complexes and their applications in medicine. *Chemical Society Reviews*, 33(4), 246–266.

Linder K, Nunn A, Nowotnik D, Ramalingam K, DiRocco R, Rumsey W, & Pirro J. (2005). Rhenium and technetium complexes containing a hypoxia-localizing moiety. Patent 6,958,141 USA

Linder, KE, Chan YW, Cyr JE, Malley MF, Nowotnik, DP, & Nunn, AD. (1994). TcO(PnA.O-1-(2-nitroimidazole)) [BMS-181321], a new technetium-containing nitroimidazole complex for imaging hypoxia: synthesis, characterization, and xanthine oxidase-catalyzed reduction. *Journal of Medicinal Chemistry*, 37(1), 9–17.

Linder KE, Chan YW, Cyr JE, Nowotnik DP, Eckelman WC, & Nunn AD. (1993). Synthesis, characterization, and in vitro evaluation of nitroimidazole--BATO complexes: new technetium compounds designed for imaging hypoxic tissue. *Bioconjugate Chemistry*, 4(5), 326–33.

Linke SP, Clarkin KC, Di Leonardo A, Tsou A, & Wahl GM. (1996). A reversible, p53-dependent G0/G1 cell cycle arrest induced by ribonucleotide depletion in the absence of detectable DNA damage. *Genes & Development*, 10(8), 934–947.

Liu Y, & Bodmer WF. (2006). Analysis of P53 mutations and their expression in 56 colorectal cancer cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(4), 976–81.

Longley, DB, Harkin DP, & Johnston PG. (2003). 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature reviews. Cancer*, 3(5), 330–8.

Lunt SY, & Vander Heiden MG. (2011). Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27, 441–64.

Majmundar AJ, Wong WJ, & Simon MC. (2010). Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Molecular Cell*, 40(2), 294–309.

Mallia MB, Subramanian S, Banerjee S, Sarma HD, & Venkatesh M. (2006). Evaluation of <sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub> complex of 2-methyl-5-nitroimidazole as an agent for targeting tumor hypoxia. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14(23), 7666–7670.

- Malloy CR, Sherry AD, & Jeffrey FM. (1988). Evaluation of carbon flux and substrate selection through alternate pathways involving the citric acid cycle of the heart by <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(15), 6964–71.
- Martinez-Outschoorn UE, Balliet RM, Rivadeneira DB, Chiavarina B, Pavlides S, Wang C, Whitaker-Menezes D, Daumer KM, Lin Z, Witkiewicz A, Flomenberg N, Howell A, Pestell RG, Knudsen ES, Sotgia F & Lisanti MP. (2010). Oxidative stress in cancer associated fibroblasts drives tumor-stroma co-evolution: A new paradigm for understanding tumor metabolism, the field effect and genomic instability in cancer cells. *Cell Cycle*, 9(16), 3256–76.
- 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), 4777–86.
- Matoba S, Kang JG, Patino WD, Wragg A, Boehm M, Gavrilova O, Hurley PJ, Bunz F & Hwang, P. M. (2006). p53 regulates mitochondrial respiration. *Science*, 312(5780), 1650–3.
- Mavi A, Cermik TF, Urhan M, Puskulcu H, Basu S, Yu JQ, Zhuang H, Czerniecki B & Alavi, A. (2007). The Effects of Estrogen, Progesterone, and C-erbB-2 Receptor States on <sup>18</sup>F-FDG Uptake of Primary Breast Cancer Lesions. *J Nuc Med*, 48(8), 1266–72.
- Mayr M, Sidibe A, & Zampetaki A. (2008). The paradox of hypoxic and oxidative stress in atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology*, 51(13), 1266–7.
- McKeown SR, Cowen RL, & Williams KJ. (2007). Bioreductive drugs: from concept to clinic. *Clinical Oncology*, 19(6), 427–42.
- Medina, M. (2001). Glutamine and cancer. *The Journal of Nutrition*, 131(9 Suppl), 2539S–42S;
- Medina RA, & Owen GI. (2002, January). Glucose transporters: expression, regulation and cancer. *Biological Research*, 35(1), 9–26.
- Melo T, Duncan J, Ballinger JR, & Rauth AM. (2000). BRU59-21, a second-generation <sup>99m</sup>Tc-labeled 2-nitroimidazole for imaging hypoxia in tumors. *Journal of Nuclear Medicine*, 41(1), 169–76.

Mirković M, Janković D, Vranješ-Đurić S, Radović M, Stanković D, Mijin D, & Nikolić N. (2012). Novel tetradentate diamine dioxime ligands: synthesis, characterization and in vivo behavior of their <sup>99m</sup>Tc-complexes. *Applied Organometallic Chemistry*, 26(7), 347–355.

Moldéus P, Högberg J & Orrenius S. (1978). Isolation and use of liver cells. *Methods in Enzymology*, 52, 60–71.

Moreno A & Arús C. (1996). Quantitative and qualitative characterization of <sup>1</sup>H NMR spectra of colon tumors, normal mucosa and their perchloric acid extracts: decreased levels of myo-inositol in tumours can be detected in intact biopsies. *NMR in Biomedicine*, 9(1), 33–45.

Moro L, Arbini AA, Yao JL, Di Sant'Agnesse PA, Marra E, & Greco M. (2009). Mitochondrial DNA depletion in prostate epithelial cells promotes anoikis resistance and invasion through activation of PI3K/Akt2. *Cell Death and Differentiation*, 16(4), 571–83.

Mucaj V, Shay JES, & Simon MC. (2012). Effects of hypoxia and HIFs on cancer metabolism. *International Journal of Hematology*, 95(5), 464–70.

Muller PAJ, & Vousden KH. (2013). p53 mutations in cancer. *Nature Cell Biology*, 15(1), 2–8.

Murugesan S, Shetty SJ, Noronha OP, Samuel AM, Srivastava TS, Nair CK, & Kothari L. (2001). Technetium-99m-cyclam AK 2123: a novel marker for tumor hypoxia. *Applied Radiation and Isotopes*, 54(1), 81–88.

Nagel U, & Nedden H. (1997). Preparative and Structural Chemistry of Chiral 3-(Diphenylphosphanyl)-pyrrolidines and Their Palladium(II) Complexes. *Inorganic Chemistry*, 130, 385–397.

Nakajima EC, & Van Houten B. (2012). Metabolic symbiosis in cancer: Refocusing the Warburg lens. *Molecular Carcinogenesis*, (November), 1–9.

Nakamura S. (1955). Structure of Azomycin, a new antibiotic. *Pharmaceutical Bulletin*, 3(5), 379–83.

Nargund S, Joffe ME, Tran D, Tugarinov V, & Sriram G. (2013). Nuclear magnetic resonance methods for metabolic fluxomics. *Methods in Molecular Biology*, 985, 335–51.

- Narra RK, Nunn AD, Kuczynski BL, Feld T, Wedeking P, & Eckelman WC. (1989). A neutral technetium-99m complex for myocardial imaging. *Journal of Nuclear Medicine*, 30(11), 1830–1837.
- Noordhuis P, Holwerda U, Van der Wilt CL, Van Groeningen CJ, Smid K, Meijer S, Pinedo HM & Peters GJ. (2004). 5-Fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidylate synthase inhibition of human colorectal cancers. *Annals of Oncology*, 15(7), 1025–32.
- Nowotnik, D. (1989). Complexes of Technetium 99m with Propylene Amine Oxime. Patent 4,818,813, USA
- Nunes PM, Jones JG, Rolo AP, Palmeira CMM & Carvalho RA. (2011). Ursodeoxycholic acid treatment of hepatic steatosis: a (13)C NMR metabolic study. *NMR in Biomedicine*, 24(9), 1145–58.
- Nunn AD, Feld TA, & Treher EN. (1987). Boronic acid adducts of technetium-99m dioxime complexes. Patent 4705849, USA
- Nunn A, Linder K, & Strauss HW. (1995). Nitroimidazoles and imaging hypoxia. *European Journal of Nuclear Medicine*, 22(3), 265–280.
- Ong ES, Zou L, Li S, Cheah PY, Eu KW & Ong CN. (2010). Metabolic profiling in colorectal cancer reveals signature metabolic shifts during tumorigenesis. *Molecular & Cellular Proteomics in Press*
- Osthus RC, Shim H, Kim S, Li Q, Reddy R, Mukherjee M, Xu Y, Wonsey D, Lee LA, Dang CV. (2000). Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(29), 21797–800.
- Packer L, & Fuehr K. (1977). Low oxygen concentration extends the lifespan of cultured human diploid cells. *Nature*, 267(5610), 423–5.
- Padhani A. (2006). PET imaging of tumour hypoxia. *Cancer Imaging*, 6, S117–21.
- Papandreou I, Krishna C, Kaper F, Cai D, Giaccia AJ, & Denko NC. (2005). Anoxia is necessary for tumor cell toxicity caused by a low-oxygen environment. *Cancer Research*, 65(8), 3171–8.

Papazisis KT, Geromichalos GD, Dimitriadis KA, & Kortsaris AH. (1997). Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay. *Journal of Immunological Methods*, 208(2), 151–8.

Parrinello S, Samper E, Krtolica A, Goldstein J, Melov S, & Campisi J. (2003). Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nature Cell Biology*, 5(8), 741–7.

Pauwels EKJ, Sturm EJC, Bombardieri E, Cleton FJ & Stokkel MPM. (2000). Positron-emission tomography with [18F]fluorodeoxyglucose. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 126(10), 549–559.

Pauwels EK, Ribeiro MJ, Stoot JH, McCready VR, Bourguignon M, & Mazière B. (1998). FDG accumulation and tumor biology. *Nuclear Medicine and Biology*, 25(4), 317–22.

Pavlidis S, Whitaker-Menezes D, Castello-Cros R, Flomenberg N, Witkiewicz AK, Frank PG, Casimiro MC, Wang C, Fortina P, Addya S, Pestell RG, Martinez-Outschoorn UE, Sotgia F & Lisanti MP. (2009). The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell Cycle*, 8(23), 3984–4001.

Pereira SL, Ramalho-Santos J, Branco AF, Sardão VA, Oliveira PJ, & Carvalho RA. (2011). Metabolic remodeling during H9c2 myoblast differentiation: relevance for in vitro toxicity studies. *Cardiovascular Toxicology*, 11(2), 180–90.

Peterson MD, & Mooseker MS. (1992). Characterization of the enterocyte-like brush border cytoskeleton of the C2 BBe clones of the human intestinal cell line, Caco-2. *Journal of Cell Science*, 600, 581–600.

Pettersen EO, Juul NO, & Rønning OW. (1986). Regulation of protein metabolism of human cells during and after acute hypoxia. *Cancer Research*, 46(9), 4346–51.

Pillai MR, Kothari K, Banerjee S, Samuel G, Suresh M, Sarma HD, & Jurisson S. (1999). Radiochemical studies of 99mTc complexes of modified cysteine ligands and bifunctional chelating agents. *Nuclear Medicine and Biology*, 26(5), 555–61.

Pinto CG, Paquete AT, & Pissarra I. (2010). Colorectal cancer in Portugal. *The European Journal of Health Economics*, 10 Suppl 1, S65–73.

Pires IM, Bencokova Z, Milani M, Folkes LK, Li JL, Stratford MR, Harris AL & Hammond EM (2010). Effects of acute versus chronic hypoxia on DNA damage responses and genomic instability. *Cancer Research*, 70(3), 925–35.

Pugachev A, Ruan S, Carlin S, Larson SM, Campa J, Ling CC, & Humm JL. (2005). Dependence of FDG uptake on tumor microenvironment. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 62(2), 545–53.

Quintas, A., Freire, A. P., & Halpern, M. J. (2008). Bioquímica - Organização Molecular da Vida. (Lidel, Ed.) (2a ed., p. 784). Lisboa.

Rademakers SE, Lok J, Van der Kogel AJ, Bussink J, & Kaanders JHAM. (2011). Metabolic markers in relation to hypoxia; staining patterns and colocalization of pimonidazole, HIF-1 $\alpha$ , CAIX, LDH-5, GLUT-1, MCT1 and MCT4. *BMC Cancer*, 11, 167.

Rajagopalan KN, & Deberardinis RJ. (2011). Role of Glutamine in Cancer: Therapeutic and Imaging Implications. *Journal of Nuclear Medicine*, 1005–1008.

Rajagopalan KN, & DeBerardinis RJ. (2011). Role of glutamine in cancer: therapeutic and imaging implications. *Journal of Nuclear Medicine*, 52(7), 1005–8.

Rajendran JG, Mankoff DA, O'Sullivan F, Peterson LM, Schwartz DL., Conrad EU, Spence A, Muzi M, Farwell DG & Krohn KA. (2004). Hypoxia and glucose metabolism in malignant tumors: evaluation by [18F]fluoromisonidazole and [18F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography imaging. *Clinical Cancer Research*: 10(7), 2245–52.

Raju N, Ramalingam K, & Nowotnik DP. (1992). Syntheses of some Nitroimidazole substituted Boronic Acids: Precursors to Technetium-99m with Potential for Imaging Hypoxic Tissue. *Tetrahedron*, 48(47), 10233–10238.

Ramalingam K, Raju N, Nanjappan P, Linder KE, Pirro J, Zeng W, Rumsey W, Nowotnik DP & Nunn AD. (1994). The synthesis and in vitro evaluation of a 99mtechnetium-nitroimidazole complex based on a bis(amine-phenol) ligand: comparison to BMS-181321. *Journal of Medicinal Chemistry*, 37(24), 4155–4163.

Ramalingam K, Raju N, Nanjappan P, & Nowotnik D. (1995). Synthesis of nitroimidazole substituted 3,3,9,9-tetramethyl-4,8-diazaundecane-2,10-dione dioximes (propylene amine oximes, PnAOs): Ligands for technetium-99m

complexes with potential for imaging hypoxic tissue. *Tetrahedron*, 51(10), 2875–2894.

Rauth AM, Melo T, & Misra V. (1998). Bioreductive therapies: an overview of drugs and their mechanisms of action. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 42(4), 755–62.

Reichert DE, Lewis JS, & Anderson CJ. (1999). Metal Complexes as Diagnostic Tools. *Coordination Chemistry Reviews*, 184(1), 3–66.

Reischl G, Dorow DS, Cullinane C, Katsifis A, Roselt P, Binns D, & Hicks RJ. (2007). Imaging of tumor hypoxia with [124I]IAZA in comparison with [18F]FMISO and [18F]FAZA—first small animal PET results. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 10(2), 203–11.

Riché F, D’Hardemare AD, Sèpe S, Riou L, Fagret D, & Vidal M. (2001). Nitroimidazoles and hypoxia imaging: synthesis of three technetium-99m complexes bearing a nitroimidazole group: biological results. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 11(1), 71–4.

Riedl CC, Akhurst T, Larson S, Stanziale SF, Tuorto S, Bhargava A, Hricak h, Klimstra D & Fong, Y. (2007). 18F-FDG PET scanning correlates with tissue markers of poor prognosis and predicts mortality for patients after liver resection for colorectal metastases. *Journal of Nuclear Medicine*, 48, 771–775).

Sansome C, Zaika A, Marchenko ND, & Moll UM. (2001). Hypoxia death stimulus induces translocation of p53 protein to mitochondria. Detection by immunofluorescence on whole cells. *FEBS Letters*, 488(3), 110–5.

Segal NH, & Saltz LB. (2009). Evolving treatment of advanced colon cancer. *Annual Review of Medicine*, 60, 207–19.

Semenza GL, Artemov D, Bedi A, Bhujwala Z, Chiles K, Feldser D, Laughner E, Ravi R, Simons J, Taghavi P & Zhong, H. (2001). “The metabolism of tumours”: 70 years later. *Novartis Foundation Symposium*, 240, 251–60;

Semenza GL. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature Reviews. Cancer*, 3(10), 721–32.

Seo S, Hatano E, Higashi T, Hara T, Tada M, Tamaki N, Iwaisako K, Ikai I & Uemoto S. (2007). Fluorine-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography predicts

- tumor differentiation, P-glycoprotein expression, and outcome after resection in hepatocellular carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 13, 427–33.
- Seo S, Hatano E, Higashi T, Nakajima A, Nakamoto Y, Tada M, Tamaki N, Iwaisako K, Kitamura K, Ikai, I & Uemoto S. (2009). P-glycoprotein expression affects 18F-fluorodeoxyglucose accumulation in hepatocellular carcinoma in vivo and in vitro. *International Journal of Oncology*, 34(5), 1303–12.
- Serganova I, Humm J, Ling C, & Blasberg R. (2006). Tumor hypoxia imaging. *Clinical Cancer Research*, 12(18), 5260–4.
- Sermeus A & Michiels C (2011). Reciprocal influence of the p53 and the hypoxic pathways. *Cell Death & Disease*, 2(5), e164.
- Seyfried TN, & Shelton LM. (2010). Cancer as a metabolic disease. *Nutrition & Metabolism*, 7(7), 1–22.
- Shafee N, Kaluz S, Ru N, & Stanbridge EJ. (2009). PI3K/Akt activity has variable cell-specific effects on expression of HIF target genes, CA9 and VEGF, in human cancer cell lines. *Cancer Letters*, 282(1), 109–15.
- Shannon AM, Bouchier-Hayes DJ, Condrón CM, & Toomey D. (2003). Tumour hypoxia, chemotherapeutic resistance and hypoxia-related therapies. *Cancer Treatment Reviews*, 29(4), 297–307.
- Sharp PF & Gemmel HG. (2005). *Practical Nuclear Medicine*. (M. A. D. Sharp, Peter F. , Gemmel, Howard G., Ed.) (3rd ed., p. 382). Oxford: Springer Verlag.
- Sherry AD, Jeffrey FMH, & Malloy CR. (2004). Analytical solutions for (13)C isotopomer analysis of complex metabolic conditions: substrate oxidation, multiple pyruvate cycles, and gluconeogenesis. *Metabolic Engineering*, 6(1), 12–24.
- Sheta EA, Trout H, Gildea JJ, Harding MA, & Theodorescu D. (2001). Cell density mediated pericellular hypoxia leads to induction of HIF-1alpha via nitric oxide and Ras/MAP kinase mediated signaling pathways. *Oncogene*, 20(52), 7624–34.
- Siegel R, Naishadham D, & Jemal A (2012). Cancer statistics 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 62(1), 10–29.

Siegel R, Ward E, Brawley O, & Jemal A. (2011). Cancer statistics 2011: The impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61(4), 212–36.

Silva JM. (2010). Registo Oncológico Regional do Centro em 2010. Instituto Português de Oncologia.

Smith TAD. (2010). Influence of chemoresistance and p53 status on fluoro-2-deoxy-D-glucose incorporation in cancer. *Nuclear Medicine and Biology*, 37(1), 51–5.

Smith TAD, Sharma RI, Thompson AM, & Paulin FEM. (2006). Tumor 18 F-FDG Incorporation Is Enhanced by Attenuation of P53 Function in Breast Cancer Cells In Vitro. *Journal of Nuclear Medicine*, 47, 1525–1530.

Smolková K, & Ježek P. (2012). The Role of Mitochondrial NADPH-Dependent Isocitrate Dehydrogenase in Cancer Cells. *International Journal of Cell Biology*, 2012, 273947.

Souba, WW. (1993). Glutamine and cancer. *Annals of Surgery*, 218(6), 715–28.

Stempien-Otero A. (1999). Mechanisms of Hypoxia-induced Endothelial Cell Death. Role of p53 in apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 274(12), 8039–45.

Stubbs M, & Griffiths JR. (2010). The altered metabolism of tumors: HIF-1 and its role in the Warburg effect. *Advances in Enzyme Regulation*, 50(1), 44–55.

Suardet L, Gaide AC, Calmès JM, Sordat B, Givel JC, Eliason JF, & Odartchenko N (1992). Responsiveness of three newly established human colorectal cancer cell lines to transforming growth factors beta 1 and beta 2. *Cancer Research*, 52(13), 3705–12.

Sugimoto S, Katano K, Kanazawa A, Yoshimura H, Kidani A, Takeda H, Makino M, Ozaki N, Tanaka T & Ikeguchi, M. (2009). Multicenter safety study of mFOLF0X6 for unresectable advanced/recurrent colorectal cancer in elderly patients. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 28, 109.

Sun X, Chu T, & Wang X. (2010). Preliminary studies of <sup>99m</sup>Tc-BnAO and its analogues: synthesis, radiolabeling and in vitro cell uptake. *Nuclear Medicine and Biology*, 37(2), 117–23.

- Takei T, Kuge Y, Zhao S, Sato M, Strauss H W, Blankenberg FG, Tait J, Tamaki, N. (2004). Time course of apoptotic tumor response after a single dose of chemotherapy: comparison with  $^{99m}\text{Tc}$ -annexin V uptake and histologic findings in an experimental model. *Journal of Nuclear Medicine*, 45(12), 2083–7.
- Teicher BA, Holden SA, Al-Achi A, & Herman TS. (1990). Classification of antineoplastic treatments by their differential toxicity toward putative oxygenated and hypoxic tumor subpopulations in vivo in the FSaIIc murine fibrosarcoma. *Cancer Research*, 50(11), 3339–44.
- Teicher BA, Lazo JS, & Sartorelli AC. (1981). Classification of antineoplastic agents by their selective toxicities toward oxygenated and hypoxic tumor cells. *Cancer Research*, 41(1), 73–81.
- Thomlinson R, & Gray L. (1955). The histological structure of some human lung cancer and the possible implications for radiotherapy. *British Journal of Cancer*, 9(4), 539–549.
- Treher EN, Francesconi LC, Gougoutas JZ, Malley MF, & Nunn AD. (1989). Monocapped tris(dioxime) complexes of technetium(III): synthesis and structural characterization of  $\text{TcX}(\text{dioxime})_3\text{B-R}$  (X = Cl, Br; dioxime = dimethylglyoxime, cyclohexanedione dioxime; R = CH<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>). *Inorganic Chemistry*, 28(18), 3411–3416.
- Turrens, JF, Freeman BA, Levitt JG, & Crapo JD. (1982). The effect of hyperoxia on superoxide production by lung submitochondrial particles. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 217(2), 401–10.
- Turrens, JF. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology*, 552(Pt 2), 335–44.
- Van Baardwijk A, Doms C, Van Suylen RJ, Verbeken E, Hochstenbag M, Dehing-Oberije C, Rupa D, Pastorekova S, Stroobants S, Buell U, Lambin P, Vansteenkiste J, & De Ruyscher, D. (2007). The maximum uptake of  $^{18}\text{F}$ -deoxyglucose on positron emission tomography scan correlates with survival, hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  and GLUT-1 in non-small cell lung cancer. *European Journal of Cancer*, 43(9), 1392–8.

- Van de Wiele C, Lahorte C, Oyen W, Boerman O, Goethals I, Slegers G, & Dierckx R. A. (2003). Nuclear medicine imaging to predict response to radiotherapy: a review. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 55(1), 5–15.
- Vander Heiden MG, Cantley LC, & Thompson CB. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324(5930), 1029–33.
- Varghese AJ, Gulyas S, & Mohindra JK. (1976). Hypoxia-dependent reduction of 1-(2-nitro-1-imidazolyl)-3-methoxy-2-propanol by Chinese hamster ovary cells and KHT tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Research*, 36(10), 3761–5.
- Vaupel, P. (2004). The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. *The Oncologist*, 9 Suppl 5, 10–7.
- Vaupel P, & Harrison L. (2004). Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response. *The Oncologist*, 9 Suppl 5(suppl 5), 4–9.
- Vaupel P, Mayer A, & Höckel M. (2006). Impact of hemoglobin levels on tumor oxygenation: the higher, the better? *Strahlentherapie und Onkologie*, 182(2), 63–71.
- Vichai V & Kirtikara K. (2006) Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, 1, 1112-1116
- Voigt W. (2005). Sulforhodamine B assay and chemosensitivity. *Methods in Molecular Medicine*, 110, 39–48.
- Vāvere AL, & Lewis JS. (2007). Cu-ATSM: a radiopharmaceutical for the PET imaging of hypoxia. *Dalton Transactions*, (43), 4893–902.
- Wang JY, Shum AYC, & Wang JY. (2002). Hypoxia/reoxygenation induces cell injury via different mechanisms in cultured rat cortical neurons and glial cells. *Neuroscience Letters*, 322(3), 187–91.
- Warburg, O. (1925). On the formation of lactic acid with growth. *Biochemistry, Z*, (160), 307–311.
- Warburg, O. (1956a). Origin of cancer cells. *Oncologia*, 9(2), 75–83.
- Warburg O. (1956b). On respiratory impairment in cancer cells. *Science*, 124(3215), 267–272.

- Warburg O, Wind F, & Negelein E. (1927). The metabolism of tumors in the body. *The Journal of General Physiology*, 8(6), 519–530.
- Watson, AJM. (2006). An overview of apoptosis and the prevention of colorectal cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 57(2), 107–21.
- Webster L, Hodgkiss RJ, & Wilson GD. (1998). Cell cycle distribution of hypoxia and progression of hypoxic tumour cells in vivo. *British Journal of Cancer*, 77(2), 227–34.
- Welford SM, & Giaccia AJ. (2011). Hypoxia and senescence: the impact of oxygenation on tumor suppression. *Molecular Cancer Research*, 9(5), 538–44.
- Weljie AM, & Jirik FR. (2011). Hypoxia-induced metabolic shifts in cancer cells: moving beyond the Warburg effect. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 43(7), 981–9.
- Wickramasinghe NS, Banerjee K, Nagaraj NS, Vigneswaran N, & Zacharias W. (2005). Hypoxia alters cathepsin B / inhibitor profiles in oral carcinoma cell lines. *Anticancer Research*, 25(4), 2841–9.
- Williams KJ, Telfer BA, Airley RE, Peters HP, Sheridan MR, Van der Kogel AJ, Harris A & Stratford IJ. (2002). A protective role for HIF-1 in response to redox manipulation and glucose deprivation: implications for tumorigenesis. *Oncogene*, 21(2), 282–290.
- Williamson DH, Lund P, & Krebs HA. (1967). The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver. *The Biochemical Journal*, 103(2), 514–27.
- Wise DR, DeBerardinis RJ, Mancuso A, Sayed N, Zhang XY, Pfeiffer HK, Nissim I, Daikhin E, Yudkoff M, McMahon SB & Thompson CB. (2008). Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(48), 18782–7.
- Wise DR, & Thompson CB. (2010). Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. *Trends in Biochemical Sciences*, 35(8), 427–33.
- Wong LJC. (Ed.). (2012). *Mitochondrial Disorders* (Vol. 837). Totowa, NJ: Humana Press.

Yoshida S, Ito D, Nagumo T, Shirota T, Hatori M, & Shintani, S. (2009). Hypoxia induces resistance to 5-fluorouracil in oral cancer cells via G(1) phase cell cycle arrest. *Oral Oncology*, 45(2), 109–115.

Yu J, & Zhang L. (2004). Apoptosis in human cancer cells. *Current Opinion in Oncology*, 16(1), 19–24.

Yutani K, Kusuoka H, Fukuchi K, Tatsumi M, & Nishimura T. (1999). Applicability of <sup>99m</sup>Tc-HL91, a putative hypoxic tracer, to detection of tumor hypoxia. *Journal of Nuclear Medicine*, 40(5), 854–61.

Zhang X, Melo T, Rauth AM, & Ballinger JR. (2001). Cellular accumulation and retention of the technetium-99m-labelled hypoxia markers BRU59-21 and butylene amine oxime. *Nuclear Medicine and Biology*, 28(8), 949–57.

Zhou J, Schmid T, Schnitzer S, & Brüne B. (2006). Tumor hypoxia and cancer progression. *Cancer Letters*, 237(1), 10–21.

Zytoon AA, Murakami K, El-Kholy MR, El-Shorbagy E, & Ebied O. (2009). Breast cancer with low FDG uptake: characterization by means of dual-time point FDG-PET/CT. *European Journal of Radiology*, 70(3), 530–8

.

**PARTE IV**  
**SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E EXPRESSÕES**



$\lambda$	Comprimento de onda
ADP	<i>Adenosine diphosphate</i>
AKT	<i>Serine/threonine protein kinase Akt</i>
AMP	<i>Adenosine monophosphate</i>
AP	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
AP2	<i>Adipocyte lipid-binding protein</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>
pCO <sub>2</sub>	Pressão parcial de dióxido de carbono
pO <sub>2</sub>	Pressão parcial de oxigénio
Bax	<i>Bcl-2 associated X protein</i>
CA	<i>Cancer antigen</i>
CAPS	Ácido N-ciclo-hexil-3-aminopropanossulfónico
CCR	Carcinoma Colorrectal
CEA	<i>Carcinoembryonic antigen</i>
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
COX	<i>Cytochrome c oxidase</i>
CRM	Cadeia respiratória mitocondrial
CS	<i>Citrate synthase</i>
CT	<i>Computerized Tomography</i>
DCF	2',7'-diclorofluoresceína
DCFH <sub>2</sub>	2',7'-diclorodihidrofluoresceína
DCFH <sub>2</sub> -DA	2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
DNTB	5,5'-ditio-bis-(2-ácido nitrobenzóico)
DO	Densidade ótica
DON	Glutamina 6-Diazo-5-oxo-L-norleucina
DTT	Ditiotreitol
EGTA	Ácido tetracético etileno glicol
<sup>18</sup> F-FCho	<sup>18</sup> Flúor -Fluorcolina
<sup>18</sup> F-FDG	<sup>18</sup> Flúor -Fluordesoxiglicose
<sup>18</sup> F-FMISO	<sup>18</sup> Flúor - Fluormisonidazol
FAD	<i>Flavin adenine dinucleotide</i>
FADH	<i>Flavin adenine dinucleotide</i>
FADH <sub>2</sub>	<i>Reduced flavin adenine dinucleotide</i>
FETNIM	<i>Fluoroerythronitroimidazol</i>
5-FU	5-Fluoracilo
[U- <sup>13</sup> C]glicose	Glicose uniformemente marcada
GLUT	<i>Glicose Transporter</i>
GTP	<i>Guanosine-5'-triphosphate</i>
H	Hidrogénio

<sup>1</sup> H	Protão
H <sub>2</sub> O	Água
<sup>2</sup> H <sub>2</sub> O	Água deuterada
hMLH1	<i>human mutL homologue hMLH1</i>
hMSH2	<i>human mutS homologue hMSH2 homolog</i>
HNPCC	<i>Hereditary nonpolyposis colorectal cancer</i>
IAZA	Iodoazomicina
IDH	<i>Isocitrate dehydrogenase</i>
KCl	Cloreto de Potássio
KCN	Cianeto de Potássio
KFeCN	Ferricianeto de Potássio
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	di-hidrogenofosfato de Potássio
KOH	Hidróxido de Potássio
Kras	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LDH	<i>Lactate dehidrogenase</i>
LKB1	<i>Liver Kinase B1</i>
M	Molar
MCT-1	<i>Monocarboxylate transporter -1</i>
MCT-4	<i>Monocarboxylate transporter -4</i>
mM	Milimolar
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
Myc	<i>Myelocytomatosis</i>
NAD	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NADH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide reduced form</i>
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate - reduced form</i>
OAA	Oxaloacetato
OXPPOS	<i>Oxidatve Phosphorylation</i>
P53	Proteína 53
PBS	<i>Phosphate Buffer saline</i>
PDH	<i>Pyruvate dehydrogenase multienzyme complex</i>
PDK1	<i>Phosphoinositide-dependent kinase-1</i>
PET	<i>Positron Emission Tomography</i>
PFK1	<i>Phosphofructokinase-1</i>
PGM	Phosphoglycerate mutase
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
PVDF	<i>Polyvinylidene fluoride</i>
ras	<i>Resistance to audiogenic seizures</i>

RIPA	<i>Radio-Immunoprecipitation Assay</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SCO2	<i>Cytochrome c oxidase assembly protein</i>
SDH	<i>Succinate dehydrogenase</i>
SPECT	<i>Single Photon Emission Computerized Tomography</i>
TBST	<i>Tris-buffered saline tween-20</i>
TEMED	N,N,N',N' – tetrametil-etileodiamina
TIGAR	Tp53-induced glycolysis and apoptosis regulator
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TP53	Gene que codifica a proteína p53
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
vs.	Versus, Expressão em latim que significa “contra”



**PARTE V**

**ANEXOS**



## Anexo 1 – Classificação TNM dos tumores do cólon e recto

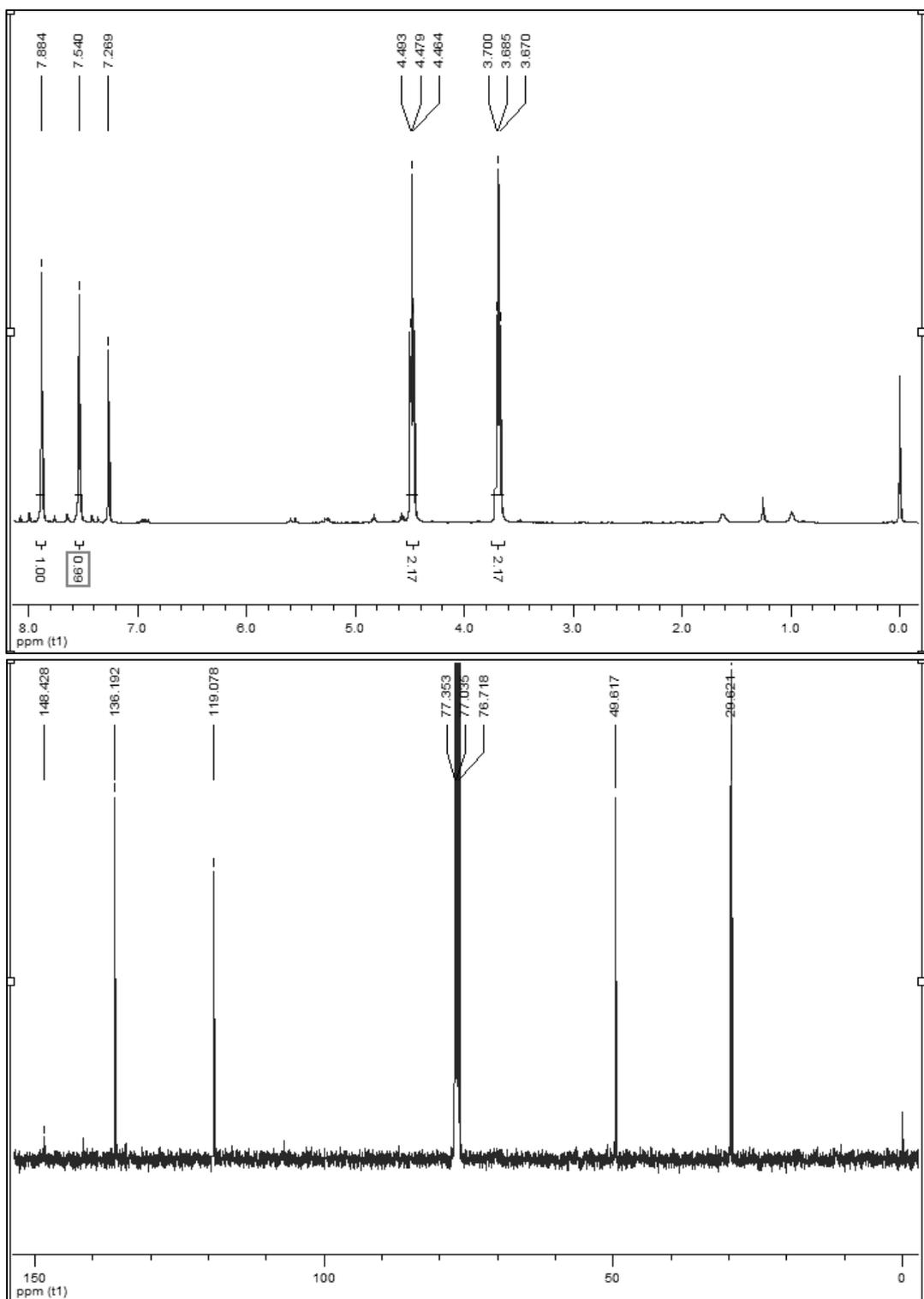
## TNM classification of tumours of the colon and rectum

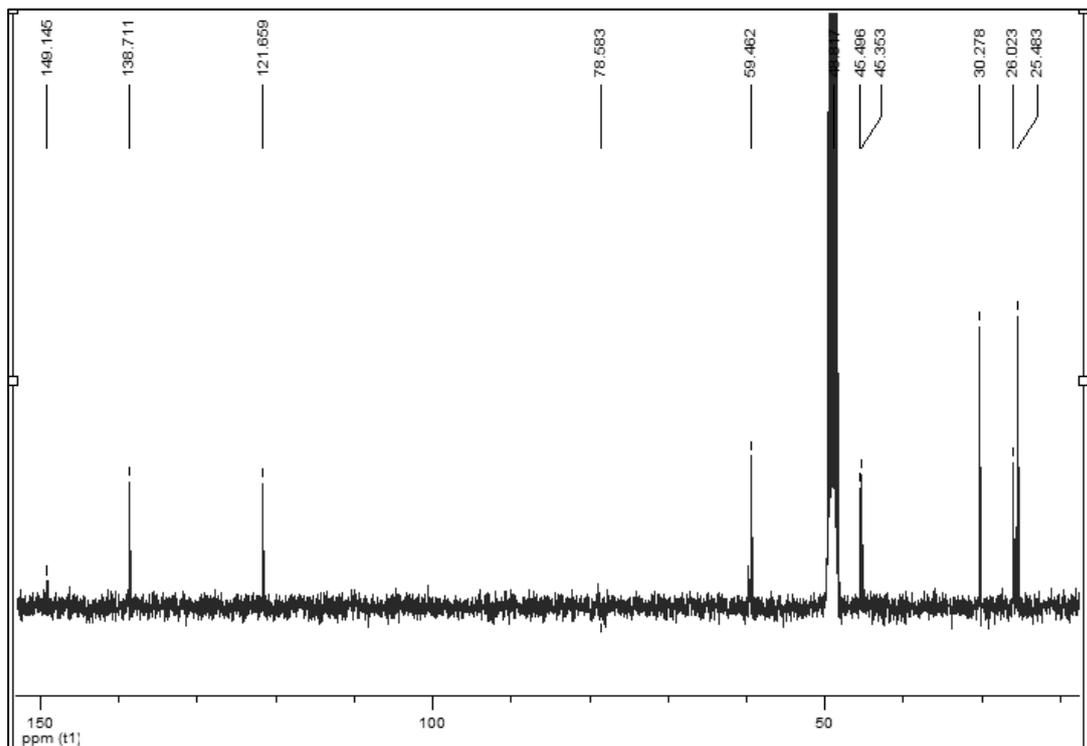
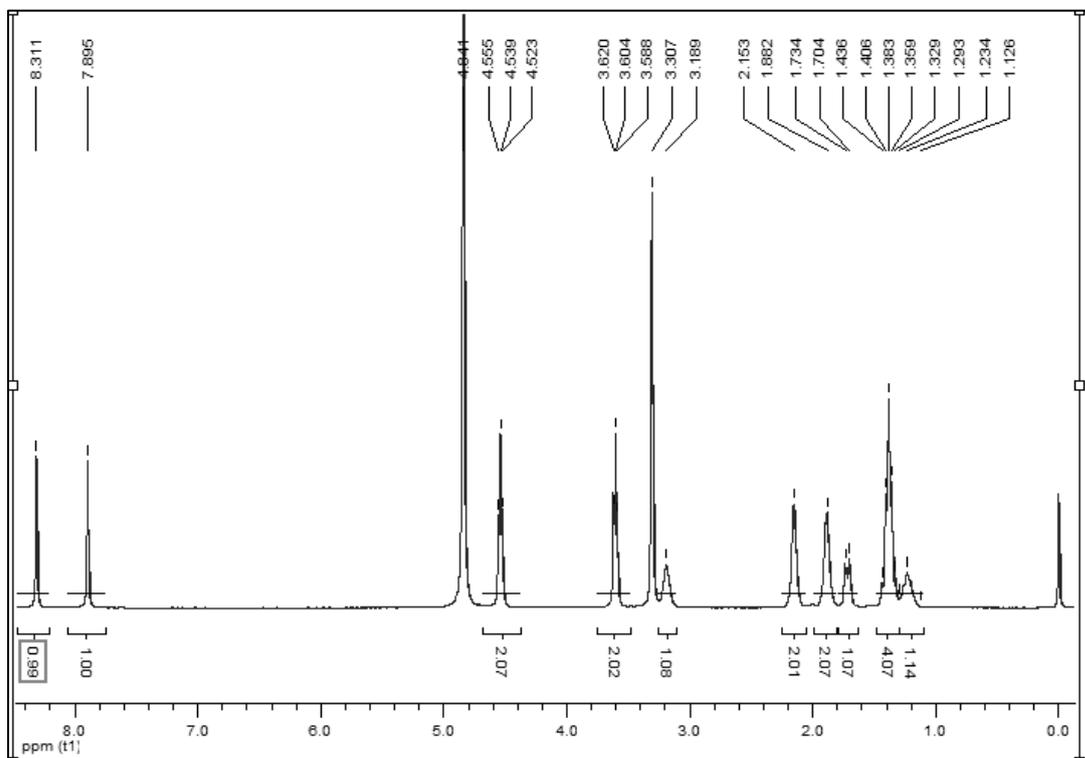
TNM classification <sup>1,2</sup>		Stage Grouping			
<b>T – Primary Tumour</b>		<b>M – Distant Metastasis</b>			
TX	Primary tumour cannot be assessed	MX	Distant metastasis cannot be assessed		
T0	No evidence of primary tumour	M0	No distant metastasis		
Tis	Carcinoma in situ: intraepithelial or invasion of lamina propria <sup>3</sup>	M1	Distant metastasis		
T1	Tumour invades submucosa	Stage 0	Tis	N0	M0
T2	Tumour invades muscularis propria	Stage I	T1	N0	M0
T3	Tumour invades through muscularis propria into subserosa or into non-peritonealized pericolic or perirectal tissues		T2	N0	M0
T4	Tumour directly invades other organs or structures <sup>4</sup> and/or perforates visceral peritoneum	Stage II	T3	N0	M0
			T4	N0	M0
<b>N – Regional Lymph Nodes</b>		Stage III	Any T	N1	M0
NX	Regional lymph nodes cannot be assessed		Any T	N2	M0
N0	No regional lymph node metastasis	Stage IV	Any T	Any N	M1
N1	Metastasis in 1 to 3 regional lymph nodes				
N2	Metastasis in 4 or more regional lymph nodes				

<sup>1</sup> (1, 66). This classification applies only to carcinomas.  
<sup>2</sup> A help desk for specific questions about the TNM classification is available at <http://tnm.uicc.org>.  
<sup>3</sup> This includes cancer cells confined within the glandular basement membrane (intraepithelial) or lamina propria (intramucosal) with no extension through muscularis mucosae into submucosa.  
<sup>4</sup> Direct invasion in T4 includes invasion of other segments of the colorectum by way of the serosa, e.g. invasion of sigmoid colon by a carcinoma of the cecum.

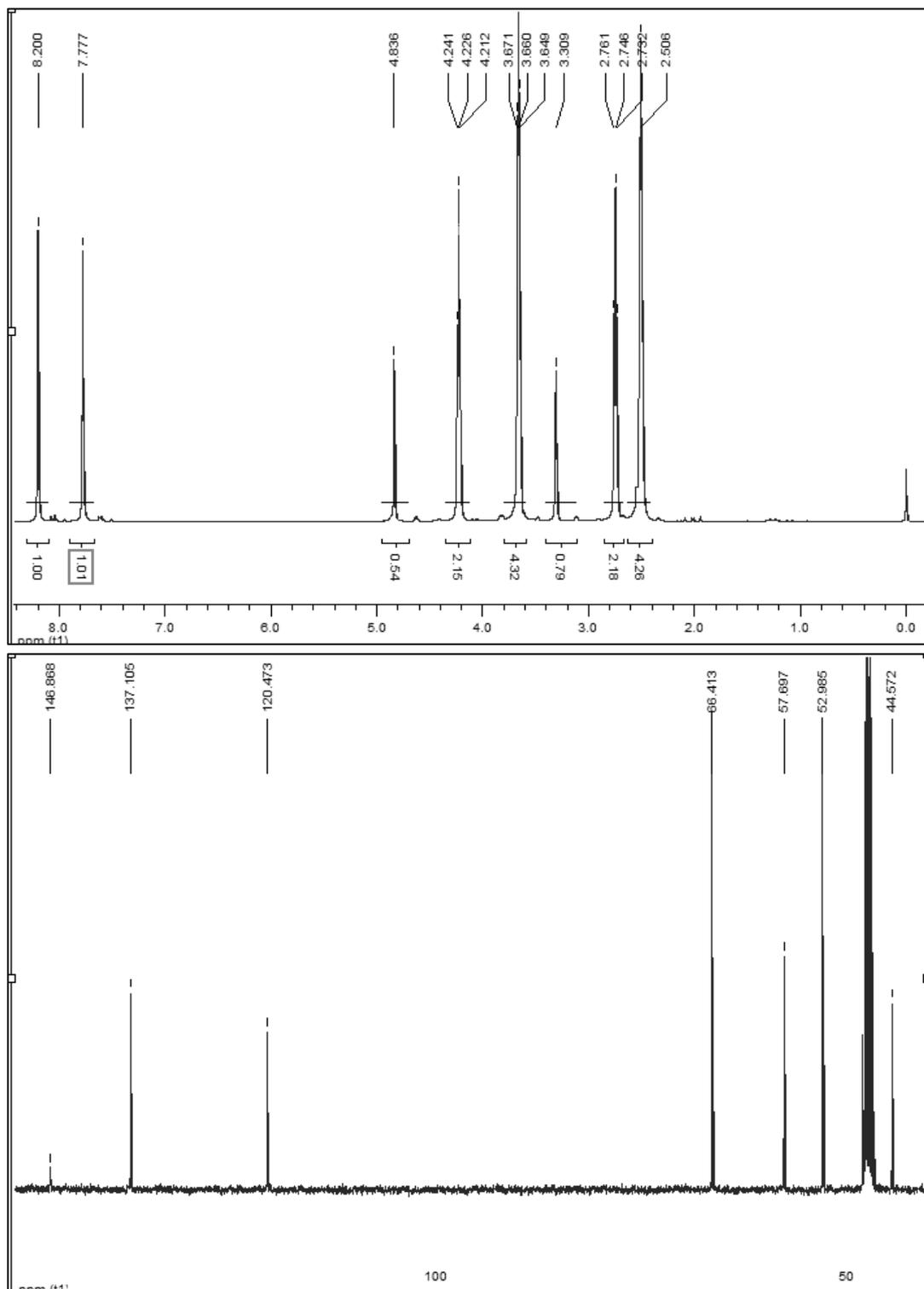
**Fonte :** World Health Organization Classification of Tumours - Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System (2001) – Hamilton SR & Aaltonen LA edition

Anexo 2 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de carbono-13 do composto **26**



Anexo 3 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de carbono-13 do composto **21**

Anexo 4 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de carbono-13 do composto 22



Anexo 5 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de carbono-13 do composto **23**