

Ana Filipa Marques de Brito

GLUT-1; UM ALVO TERAPÊUTICO PARA OS TUMORES PRIMÁRIOS DO FÍGADO?

Tese de Doutoramento em Ciências da Saúde, ramo de Ciências Biomédicas orientada pela Senhora Professora Doutora Maria Filomena Rabaça Roque Botelho e pelo Senhor Professor Doutor José Guilherme Lopes Rodrigues Tralhão e apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Ana Filipa Marques de Brito

**GLUT-1; um alvo terapêutico para os tumores primários
do fígado?**

Coimbra

2014

Capa

Interface carcinoma hepatocelular/fígado não-tumoral (tumor ocupa a porção direita e central da imagem), corada com recurso ao Tricrômico de Masson, obtida por microscopia ótica. Núcleos apresentam-se corados de castanho escuro, citoplasma de vermelho rosado e fibras de colágeno de azul ciano. Ampliação total 100x.

Tese de Doutoramento na área científica de Ciências da Saúde, ramo de Ciências Biomédicas, orientada pela Senhora Professora Doutora Maria Filomena Rabaça Roque Botelho e pelo Senhor Professor José Guilherme Lopes Rodrigues Tralhão e apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, financiada por bolsa de doutoramento atribuída pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (SFRH / BD / 61378 / 2009).



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

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

"Nothing in life is to be feared, it is only to be understood. Now is the time to understand more, so that we may fear less."

Marie Curie

O trabalho experimental descrito nesta tese foi realizado:

- No Serviço de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

À Professora Doutora Maria Filomena Botelho

Ao Professor Doutor José Guilherme Tralhão

Aos meus Pais

Ao meu Irmão

À minha Família

Aos meus Avós Lucinda, António e Cândido

Ao meu Tio José Maria de Brito

Aos meus Mestres

Aos meus Amigos

Aos meus Colegas

Prefácio

Os tumores primários do fígado constituem actualmente um problema de importância global. As taxas de incidência e de mortalidade têm crescido marcadamente nas últimas décadas e a inexistência de uma terapêutica selectiva e eficaz, confere a este tipo de tumores um prognóstico muitíssimo pobre. Recentemente, o transportador de glicose 1 (GLUT-1) tem sido indicado com um alvo terapêutico promissor para diversos tipos de cancro incluindo o carcinoma hepatocelular. Embora seja facto aceite que a expressão deste transportador se encontra aumentada no colangiocarcinoma, nada se sabe acerca do potencial tumorigénico do GLUT-1 neste tipo de tumor. Assim, o objectivo inicial deste trabalho foi avaliar o potencial do GLUT-1 enquanto alvo terapêutico para tumores primários do fígado, recorrendo-se à utilização de inibidores competitivos deste transportador e também à inibição génica do mesmo. Porém, com o desenrolar do trabalho prático muitas dúvidas surgiram, o que determinou o aparecimento de objectivos secundários. Assim, um dos objectivos secundários deste trabalho experimental foi a caracterização das linhas celulares em estudo no que respeita à expressão de P53, de AFP, de CK19, de KI67, de GLUTs, de PGP, de MRP1 e de LRP. Foi igualmente objectivo deste estudo avaliar a resposta destas linhas celulares ao tratamento com cisplatina, doxorrubicina, 5-fluorouracilo e sorafenib. Por fim objectivou-se também estudar a possível utilização do ^{18}F -FDG no estudo da resistência a múltiplos fármacos.

Embora pela sua finalidade académica uma dissertação constitua o culminar de uma etapa individual, devo salientar o esforço e o empenho de uma equipa multidisciplinar que colaborou para o desenvolvimento deste trabalho. A todas as pessoas que das mais variadas formas me inspiraram, ensinaram e apoiaram, contribuindo directa ou indirectamente para a realização deste trabalho gostaria de prestar aqui os mais sinceros agradecimentos.

À Professora Doutora Maria Filomena Botelho, Professora Catedrática da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, e directora da Unidade de Biofísica da mesma instituição, todas as palavras serão sempre poucas para expressar a minha gratidão. Muito obrigada por ter aceite orientar esta dissertação. Agradeço ainda por todas as críticas e conselhos na revisão do manuscrito, por todo o apoio, incentivo, disponibilidade, partilha de conhecimentos, mas essencialmente pela amizade demonstrada. Um exemplo enquanto investigadora que procuro seguir desde o segundo ano do Mestrado Integrado em Engenharia

Biomédica, e que com toda a certeza nunca irei esquecer.

Ao Professor Doutor José Guilherme Tralhão, Professor Auxiliar com agregação da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, co-orientador desta dissertação, por ter aceite o desafio de me orientar. Sem dúvida a minha fonte de inspiração para ingressar no estudo dos tumores primários do fígado. Excelente médico, e um modelo enquanto investigador, as suas palavras de incentivo e de encorajamento, a disponibilidade constante, e as horas perdidas para me auxiliar mesmo após um dia extenuante no hospital nunca serão por mim esquecidas. Bem-haja por tudo.

À Professora Doutora Ana Margarida Abrantes, Professora Auxiliar da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, obrigada por todo o encorajamento e incentivo ao longo destes 5 anos de trabalho. Muito obrigada pela ajuda na revisão criteriosa deste manuscrito mesmo quando isso implicou um acréscimo de trabalho. Agradeço ainda pela partilha de responsabilidades e de conhecimentos, mas essencialmente pela amizade que sempre demonstrou. Palavras nunca serão suficientes para exprimir toda a minha gratidão.

À Cláudia Caridade secretária da Unidade de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, pela sua disponibilidade incondicional, mas também por todo o apoio e incentivo demonstrados ao longo dos últimos anos.

À Bayer Healthcare pela disponibilização gratuita do sorafenib extremamente importante nos estudos de citotoxicidade de fármacos convencionais e também nas terapias combinadas.

Gostaria também de agradecer ao Instituto Tecnológico PET Madrid pelo ^{18}F -FDG, e ao Serviço de Medicina Nuclear do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra pela doação do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI.

Ao Centro de Investigação em Meio Ambiente, Genética e Oncobiologia (CIMAGO) pelo financiamento do projecto 09/12 – ‘GLUT1: um alvo terapêutico para tumores primário do fígado?’, que permitiu a obtenção de parte dos resultados apresentados nesta dissertação.

Um especial agradecimento à Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) pela atribuição da bolsa individual de Doutoramento SFRH / BD / 61378 / 2009.

À Professora Doutora Ana Bela Sarmiento Ribeiro, Professora Auxiliar da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, e à Mestre Ana Cristina Gonçalves pela disponibilidade constante no auxílio prestado nos estudos de

citometria de fluxo, e também pela ajuda preciosa na interpretação dos resultados.

À Mestre Kathleen Santos pelo auxílio prestado na técnica do ensaio cometa, e pela visão crítica na discussão destes resultados. Mas também pela amizade e companheirismo sempre presentes.

Ao Mestre João Casalta Lopes pela ajuda preciosa na análise estatística dos resultados obtidos, mas essencialmente pela sua amizade e palavras de encorajamento.

Ao Mestre Rui Oliveira gostaria de agradecer pelo apoio na obtenção dos resultados de histologia e imunocitoquímica. Gostava também de dar uma palavra de agradecimento pelos momentos de descontração proporcionados no laboratório.

À Mestre Mafalda Laranjo, um dos meus primeiros apoios na Biofísica. Muito obrigada pela partilha de conhecimentos, e pela amizade. Um especial agradecimento também pelo auxílio prestado na técnica de western blot.

À Mestre Ana Catarina Mamede por constituir um pilar fundamental nesta etapa da minha vida. Agradeço-te pela ajuda na busca constante na resolução de cada dúvida científica, pelo incentivo permanente e por teres acompanhado tão de perto todo o meu trabalho. Agradeço-te ainda mais por toda a amizade demonstrada e por todos os momentos bem passados. Um sincero obrigada por tudo.

À Mestre Ana Salomé Pires, colega de longa data e uma redescoberta na Biofísica. Muito obrigada por tudo, pelo encorajamento nas horas menos boas, pelas gargalhadas nos momentos de descontração, pela partilha de conhecimentos, e por tornares as minhas dúvidas como se tuas fossem. Obrigada pela excelente colega e companheira que és e principalmente por te teres tornado uma grande amiga.

A todos os meus outros colegas Doutorandos na Unidade de Biofísica da FMUC, e em especial ao Mestre Fernando Mendes, à Dr^a Sara Ferreira, à Dr^a Siri Paulo, à Mestre Maria João Carvalho e à Mestre Alexandra Fernandes. Agradeço pelo vosso companheirismo e a vossa amizade. As vossas palavras amigas e a vossa boa disposição, muitas vezes já no final de um dia extenuante de trabalho, conferiram variadas vezes energia para continuar.

Queria agradecer a todos os alunos de Licenciatura e de Mestrado que ao longo destes anos passaram pela Unidade de Biofísica da FMUC por toda a ajuda

prestada para a realização deste trabalho. Gostaria de salientar o Dr Fábio Veríssimo, a Mestre Ana Cláudia Ribeiro, a Mestre Mónica Mendes e a Mestre Marina Ribeiro com quem contactei com mais proximidade, muito obrigada por todo o auxílio que me prestaram.

A todos os meus amigos a quem as extenuantes exigências deste meu percurso académico por vezes privaram da minha companhia. Obrigada pelo apoio compreensão e palavras de incentivo.

Ao meu irmão, Jorge Brito, o meu primeiro Mestre e a quem todas as palavras não são suficientes para agradecer todo o apoio. Um enorme obrigada por tudo, pela ajuda, encorajamento, por lutares ao meu lado e por acreditares em mim até mais que eu própria. Sem ti eu não teria conseguido.

Gostava de agradecer aos meus pais Fernando Brito e Maria do Rosário Brito por terem proporcionado tudo o que tive até agora. Por me ajudarem a trilhar o meu caminho e me apoiarem incondicionalmente mesmo quando as minhas escolhas não fossem as mais acertadas. Nos momentos mais difíceis sempre me fizeram acreditar que chegaria ao fim desta difícil, porém gratificante etapa. Obrigada por estarem sempre lá, por me ouvirem, apoiarem e apostarem em mim. Tudo o que eu sou a vós o devo.

A todos os outros elementos da minha grande família, que mesmo à distância estiveram sempre lá. Força motriz para o trilhar desta minha etapa. A todos o meu sincero obrigada.

Por último, mas não menos importante, àqueles que fisicamente já não se encontram comigo mas para sempre irão permanecer na minha memória. Ao meu avô materno Cândido e aos meus avós paternos António e Lucinda, os meus grandes pilares familiares que continuam a ser uma fonte de inspiração. E ao meu tio José Maria de Brito, a quem o cancro retirou a vida cedo demais. A ele dedico esta dissertação, uma personalidade cujo modelo eu gostaria de seguir. Fonte de empreendedorismo, juventude, alegria e boa disposição, espero um dia ser merecedora de dizer que sou tua sobrinha.

Índice

Resumo	1
Abstract.....	3

Parte I Contextualização Teórica

Capítulo I -Introdução	7
Capítulo II - Estado da Arte	11
Tumores primários do fígado	13
Carcinoma Hepatocelular	14
Alterações moleculares e genéticas	19
Desregulação entre a sobrevivência e a morte celular no carcinoma hepatocelular	21
Diagnóstico e tratamento	25
Colangiocarcinoma.....	33
Alterações moleculares e genéticas	35
Desregulação entre a sobrevivência e a morte celular no colangiocarcinoma.....	37
Diagnóstico e tratamento	38
Resistência multifármacos nos tumores primários do fígado.....	43
Medicina nuclear e resistência multifármacos.....	45
Glicólise, efeito Warburg e cancro: da base molecular à utilização do ¹⁸ F-FDG.....	46
Transportador de glicose 1 e cancro.....	49
Flavonóides	55
Gossipol	61
Capítulo III - Objectivos	69

Parte II Trabalho Experimental

Capítulo IV - Materiais e Métodos.....	75
Cultura e caracterização das linhas celulares	77
Caracterização morfológica	79
Expressão de citoqueratina 19.....	79
Expressão de alfafetoproteína.....	80

Expressão de KI67	80
Expressão de P53	81
Estudo de transportadores	81
Efeito da quimioterapia.....	86
Actividade metabólica.....	87
Viabilidade e morte celular.....	88
Expressão de BAX e de BCL-2	90
Inibidores competitivos do GLUT-1: quercetina e gossipol.....	92
Actividade metabólica.....	92
Sobrevivência celular	92
Viabilidade e morte celular.....	94
Expressão de BAX e de BCL-2	95
Avaliação do ciclo celular	95
Stresse oxidativo	96
Expressão de P53	99
Danos no ADN.....	101
Avaliação da expressão de GLUT-1	103
Estudo funcional do GLUT-1	103
Terapia combinada	104
Terapia génica.....	105
Transfecção celular	106
Expressão de GLUT-1	107
Actividade metabólica.....	107
Viabilidade e morte celular.....	108
Análise estatística	109
Capítulo V - Resultados	113
Cultura e caracterização das linhas celulares.....	115
Caracterização morfológica e expressão de P53, CK19, AFP, e KI67	115
Estudo de transportadores	119
Efeito da quimioterapia.....	140
Actividade metabólica.....	140
Viabilidade e morte celular.....	147
Expressão de BAX e de BCL-2	155
Inibidores competitivos do GLUT-1: quercetina e gossipol.....	157
Actividade metabólica.....	157
Sobrevivência celular	161

Viabilidade e morte celular.....	164
Expressão de BAX e de BCL-2.....	168
Avaliação do ciclo celular.....	170
Stresse oxidativo.....	174
Expressão de P53.....	181
Danos no ADN.....	183
Avaliação da expressão de GLUT-1.....	198
Estudo funcional do GLUT-1.....	201
Terapia combinada.....	206
Terapia génica.....	215
Expressão de GLUT-1.....	215
Actividade metabólica.....	215
Viabilidade e morte celular.....	217
Capítulo VI - Discussão.....	219
Caracterização das linhas celulares.....	222
Efeito da quimioterapia.....	232
Inibidores competitivos do GLUT-1: quercetina.....	239
Inibidores competitivos do GLUT-1: gossipol.....	253
Terapia combinada.....	262
Terapia génica.....	264
Translação: da investigação básica à prática clínica.....	266
Capítulo VII - Conclusões e Perspectivas Futuras.....	269
Parte III Referências Bibliográficas.....	277
Parte IV Anexos	
Artigos em revistas com arbitragem científica.....	319
Abstracts em revistas indexadas com arbitragem científica.....	319
Comunicações orais.....	324
Comunicações sob a forma de poster.....	326

RESUMO

O cancro caracteriza-se por uma divisão celular descontrolada, constituindo o tumor não apenas um conjunto de células em proliferação, mas um tecido complexo composto por tipos celulares distintos que interagem entre si. Os tumores primários do fígado são lesões tumorais que têm origem neste órgão, e de entre eles, o carcinoma hepatocelular é o mais frequente, representando cerca de 80% das neoplasias primárias deste órgão. O segundo tumor primitivo do fígado mais comum é o colangiocarcinoma, constituindo cerca de 10% destes tumores. Estes tipos de tumores têm mau prognóstico e poucas alternativas terapêuticas. Nas últimas décadas a incidência dos tumores primários do fígado e a mortalidade decorrente dos mesmos tem aumentado consideravelmente, tornando imperativa a busca de novas formas de tratamento assim como de métodos de diagnóstico mais sensíveis e específicos para estes tipos de tumores. Alguns estudos têm salientado o papel do transportador de glicose 1 na tumorigênese do carcinoma hepatocelular, indicando-o como um possível alvo terapêutico. Apesar de existirem evidências da expressão acrescida deste transportador no colangiocarcinoma, nada se sabe acerca do seu potencial papel tumorigênico neste tumor.

Assim, o principal objectivo deste trabalho foi avaliar o potencial do transportador de glicose 1 enquanto alvo terapêutico para o carcinoma hepatocelular e para o colangiocarcinoma. Para tal, utilizaram-se três linhas celulares humanas de carcinoma hepatocelular que diferem entre si na expressão de P53, e uma linha celular humana de colangiocarcinoma. Nas linhas celulares em estudo avaliou-se o potencial terapêutico de dois inibidores competitivos do transportador de glicose 1, a quercetina e o gossipol. Foi também avaliado o potencial deste transportador enquanto alvo terapêutico no carcinoma hepatocelular através da inibição genética do mesmo numa das linhas celulares de carcinoma hepatocelular. Para além disso foram realizados estudos de captação de ^{18}F -FDG que serviram como método de confirmação da inibição competitiva do GLUT-1. Estudos recentes demonstraram que este radiofármaco é substrato para as proteínas relacionadas com a resistência multifármacos, pelo que se avaliou também o seu papel no estudo desta resistência, tentando-se estabelecer um paralelismo com os resultados obtidos com o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI, um radiofármaco utilizado na avaliação da resistência multifármacos. Neste estudo avaliou-se também o efeito de alguns fármacos comumente utilizados na clínica como terapêutica anticancerígena, nas linhas celulares estudadas, assim como o efeito

combinado da quercetina e do gossipol com o sorafenib e a doxorrubicina.

Para a concretização dos objectivos propostos foram utilizadas diversas técnicas de biologia celular e molecular como a inibição génica, citometria de fluxo, *western blot*, ensaio cometa, ensaio clonogénico ou o teste do MTT. Por outro lado efectuaram-se estudos de captação e retenção de radiofármacos.

Os resultados obtidos dos estudos com quercetina e com gossipol, mostraram que, para as linhas celulares dos tumores primários do fígado em estudo, a incubação com os referidos compostos induziu uma inibição competitiva do transportador de glicose-1 e, por consequência, um decréscimo na captação de ^{18}F -FDG e por analogia de glicose. Em resposta à privação glicolítica ocorreu a indução de stresse oxidativo o que, por consequência, conduziu a danos no ADN das linhas celulares em estudo, culminando num processo de morte celular, maioritariamente por apoptose, de um modo independente da P53. Através do tratamento combinado de quercetina e de gossipol com sorafenib ou doxorrubicina, obteve-se, na maioria das vezes, efeito sinérgico. A inibição génica do transportador de glicose 1 foi bem sucedida, tendo-se verificado também que a nova linha celular obtida possui menor actividade metabólica do que aquela que lhe deu origem, sendo também mais sensível aos fármacos comumente utilizados na prática clínica. Assim, os resultados indicam que, de facto, o transportador de glicose 1 poderá ter um papel activo na tumorigénese dos tumores primitivos do fígado, influenciando a sua sensibilidade à quimioterapia.

Através dos estudos de cinética de radiofármacos observou-se que a expressão de P53 afecta a captação de ^{18}F -FDG, e que mutações nesta proteína conduzem a uma maior taxa de captação do referido radiofármaco. Observou-se também a existência de um paralelismo entre a captação e a retenção de ^{18}F -FDG e de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI, indicando estes resultados que o ^{18}F -FDG pode ser utilizado no estudo da resistência multifármacos.

Em suma, este trabalho constitui um ponto de partida para investigações futuras, uma vez que indica que o GLUT-1 poderá ser considerado um alvo terapêutico para os tumores primitivos do fígado, e ainda indica que a PET com recurso ao ^{18}F -FDG poderá ser utilizada como método de prever a resposta à quimioterapia.

ABSTRACT

Cancer is characterized by uncontrolled cell division, turning the tumor not only a number of proliferating cells, but in a complex tissue composed by different cell types that interact together. Primary liver tumors are tumor lesions that are originate in this organ. Among the primary liver tumors, the hepatocellular carcinoma, which occurs in the hepatocytes is the most common and accounts for approximately 80% of primary neoplasms of this organ. The second most common primitive tumor of the liver is the cholangiocarcinoma, representing about 10%. These types of tumors are pathologies with poor prognosis and few treatment options. In recent decades, the incidence and the mortality of primary liver tumors has increased substantially, making it imperative to search for new forms of treatment as well as sensitive and specific diagnostic methods for these types of tumors. Some studies have highlighted the role of glucose transporter 1 (GLUT-1) in tumorigenesis of hepatocellular carcinoma, indicating it as a possible therapeutic target. Although there is no evidence of increased expression of this transporter in cholangiocarcinoma, nothing is known about their tumorigenic potential in this type of tumor.

Thus, the main objective of this work was to evaluate the potential of GLUT-1 as a therapeutic target for hepatocellular carcinoma and for cholangiocarcinoma. To do so, three human hepatocellular carcinoma cell lines that differ in the P53 expression and a human cholangiocarcinoma cell line were used. To achieve the referred goal, the therapeutic potential of two competitive inhibitors of the glucose transporter 1, the quercetin and the gossypol were evaluates in the described cell lines. In one of hepatocellular carcinoma cell line it was also evaluated the potential of this transporter as a therapeutic target through gene inhibition. In addition, to confirm the competitive inhibition of GLUT-1, ^{18}F -FDG uptake studies were performed.

As recent studies have shown that this radiopharmaceutical is a substrate for proteins related to multidrug resistance, we also evaluated the role of ^{18}F -FDG in multidrug resistance, trying to establish a parallel with the results obtained with $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI, the current radiopharmaceutical used for study the multidrug resistance. In this work it was also assessed the effect of some drugs commonly used as anticancer therapy in the cell lines studied, as well as the combined effect of quercetin and gossypol with sorafenib and doxorubicin.

Several techniques of cell and molecular biology were used as the genetic

inhibition, flow cytometry, western blot, comet assay, clonogenic assay and MTT assay to reach our goals. In addition to these techniques radiopharmaceuticals uptake and retention studies were also performed.

Through the results of treatment with gossypol or quercetin, it was found out that for the primary liver tumor cell lines studied, the incubation with these compounds induced a competitive inhibition of glucose transporter 1, a decrease of ^{18}F -FDG uptake and, by analogy, a decrease of glucose uptake. In response to glycolytic deprivation, the results indicate an induction of oxidative stress which, consequently lead to DNA damage in cell lines, culminating in cell death, mainly by apoptosis in a P53 independent manner. In most cases, the combined treatment by quercetin or gossypol with sorafenib or doxorubicin produced a synergistic effect. Gene inhibition of glucose transporter 1 was successful, and it was also found that the new cell line obtained had lower metabolic activity than the parental one, and being also more sensitive to the drugs commonly used in clinical practice. Thus, these results indicate that, in fact, the glucose transporter 1 may have a role in tumorigenesis of primary liver tumors, influencing their sensitivity to chemotherapy.

Through kinetic studies of radiopharmaceuticals, it was observed that the P53 expression affects the ^{18}F -FDG uptake, and mutations of this protein lead to a higher rate of uptake of this radiopharmaceutical. It was also observed that there is a parallelism between the uptake and the retention of ^{18}F -FDG and $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI. These results indicate that ^{18}F -FDG can be used to study multidrug resistance.

In summary, this work provides a starting point for future research, as it indicates that GLUT-1 may be considered a therapeutic target for primary liver tumors, and also indicates that ^{18}F -FDG PET may be used as a method of predicting the response to chemotherapy.

Parte I
Contextualização Teórica

Capítulo I
Introdução

As taxas de incidência e mortalidade dos tumores primários do fígado têm crescido acentuadamente nas últimas décadas. O carcinoma hepatocelular é o tumor primário do fígado mais frequente, representando cerca de 80% das neoplasias primitivas deste órgão e, segundo a GLOBOCAN, é já o sétimo tipo de cancro mais incidente e o segundo mais mortal a nível mundial. O colangiocarcinoma representa cerca de 10% das neoplasias hepáticas primárias e é actualmente o segundo tumor primitivo do fígado mais frequente. Tanto no caso do carcinoma hepatocelular como do colangiocarcinoma o número de casos diagnosticados e o número de mortes resultantes destas neoplasias é muito semelhante.

As elevadas taxas de mortalidade decorrentes dos tumores primários do fígado prende-se com dois factos essenciais. Em primeiro lugar, na grande maioria dos casos estes tipos de tumores são diagnosticados em fases avançadas da doença e, por consequência, não podem já usufruir das terapêuticas cirúrgicas, as únicas que actualmente possuem potencial curativo. Por outro lado, as terapêuticas alternativas à cirurgia têm, na maioria das vezes, um carácter meramente paliativo uma vez que os tumores primitivos do fígado são considerados como quimiorresistentes e radorresistentes. A resistência interna que os tumores primários do fígado apresentam à quimioterapia e à radioterapia está intimamente correlacionada com uma rede complexa de vias de sinalização que, com frequência, se encontram alteradas ou mutadas. Daqui merecem especial ênfase a sobreexpressão de proteínas relacionadas com a resistência multifármacos, a desregulação entre a expressão de mecanismos pró e anti-apoptóticos da família BCL-2, assim como mutações no gene supressor tumoral *TP53*.

Neste contexto, nas últimas décadas tem sido alvo de intensiva investigação a busca de novos biomarcadores que auxiliem no diagnóstico e na terapêutica dos tumores primários do fígado. Alguns estudos indicam que o carcinoma hepatocelular apresenta níveis de expressão aumentados do transportador de glicose 1 o que lhes aumenta o potencial tumorigénico. No que diz respeito ao colangiocarcinoma, nada se sabe acerca do potencial tumorigénico do transportador de glicose 1, embora estudos indiquem que ele é mais expresso no colangiocarcinoma do que no carcinoma hepatocelular. Por outro lado, é sabido que este transportador é um dos principais responsáveis pela entrada do ^{18}F -FDG na célula neoplásica, auxiliando no diagnóstico, estadiamento e re-estadiamento dos tumores com recurso à Tomografia por Emissão de Positrões. Deste modo, este transportador possui nesta temática um papel dual, podendo auxiliar no diagnóstico dos tumores primitivos do fígado assim como representar um novo alvo terapêutico.

O objectivo principal deste trabalho foi avaliar o potencial do transportador de glicose 1 enquanto alvo terapêutico para o carcinoma hepatocelular e para o colangiocarcinoma. Em paralelo avaliou-se também se o ^{18}F -FDG poderá ser utilizado no estudo da resistência multifármacos destes tipos de tumores.

Esta dissertação está dividida em quatro partes, sendo que cada parte se encontra dividida em capítulos.

A primeira parte denominada contextualização teórica inclui três capítulos. O primeiro capítulo, a introdução, explica as motivações que conduziram à concretização deste trabalho. No capítulo II a que se deu o nome de estado da arte é feita uma revisão sumária de alguns conceitos que estão na base deste trabalho. Por sua vez, no capítulo III estão descritos os objectivos deste trabalho experimental.

A segunda parte desta dissertação foi denominada de trabalho experimental e contém igualmente vários capítulos. No capítulo IV, de materiais e métodos encontram-se descritos os fundamentos metodológicos, os métodos e os materiais utilizados para atingir os objectivos. No capítulo V, chamado de resultados, são apresentados os resultados obtidos a partir das metodologias anteriormente descritas. O capítulo VI refere-se à discussão dos resultados obtidos, onde é feito um levantamento das possíveis explicações para os mesmos, dos problemas levantados e das limitações dos próprios métodos utilizados. O capítulo VII apresenta as conclusões e as perspectivas futuras do trabalho.

A terceira parte inclui a bibliografia consultada para a realização deste trabalho.

Por fim, a quarta parte inclui os anexos onde se encontram uma lista de símbolos, abreviaturas, expressões e fórmulas químicas utilizadas neste trabalho assim como as publicações científicas relacionadas com a tese.

Capítulo II

Estado da arte

O cancro é actualmente a principal causa de morte nos países desenvolvidos e a segunda principal causa de morte nos países em desenvolvimento, onde a incidência tem crescido marcadamente. O aumento da incidência mundial do cancro está intimamente associado ao envelhecimento da população, assim como com a adopção de estilos de vida propícios ao seu desenvolvimento, tais como o sedentarismo, o tabagismo e as dietas ocidentalizadas (Jemal *et al.*, 2011).

O aumento da incidência desta doença e da mortalidade a ela associada conferem um carácter urgente à pesquisa de novas formas de tratamento assim como de métodos complementares mais eficazes que permitam um diagnóstico mais precoce.

Tumores primários do fígado

A nível celular, o cancro caracteriza-se por uma divisão e crescimento celular descontrolados, constituindo não apenas um conjunto de células em proliferação, mas um tecido complexo composto por tipos celulares distintos que interagem entre si (Gatenby & Gillies, 2007). Por sua vez, essas células que proliferam de uma forma totalmente não controlada podem invadir progressivamente os tecidos adjacentes ou até alojar-se em locais distantes nos quais podem também proliferar. Assim, tendo em conta a sua localização e o seu local de origem podemos distinguir entre tumores primários e tumores secundários, definindo-se como tumor primário aquele que se encontra no local de origem, e como secundário aquele que se encontra num outro local de onde não é originário, como resultado da disseminação à distância. Aos tumores secundários, atribui-se muitas vezes a denominação de metástase (Goodman, 2007).

Em relação ao fígado, definem-se como tumores primários do fígado ou neoplasias primárias do fígado as lesões tumorais que têm origem neste órgão. As células constituintes destes tumores podem ter origem em qualquer das principais células constituintes do fígado, ou seja, os hepatócitos, as células epiteliais biliares, as células endoteliais, ou combinações destas com diversas células mesenquimais (Goodman, 2007).

De entre os tumores primários ou primitivos do fígado, o carcinoma hepatocelular, com origem nos hepatócitos é, sem dúvida, o mais frequente e representa cerca de 80% das neoplasias primárias deste órgão. O segundo tumor primitivo do fígado mais comum é o colangiocarcinoma que representa cerca de 10% dos tumores primitivos do fígado e tem origem nos colangiócitos, que são as células epiteliais que revestem os canais biliares. A restante percentagem pertence

a tumores relativamente incomuns, tais como o angiossarcoma hepático primário, o linfoma hepático primário, o hemangiopericitoma ou o hemangioendotelioma epitelióide hepático (Goodman, 2007; Ahmed & Lobo, 2009; Gomes *et al.*, 2013). Na figura 1 está esquematizada a classificação dos tumores primários do fígado, de acordo com a origem celular. Assim, e tendo em conta que o carcinoma hepatocelular e o colangiocarcinoma representam a maioria das neoplasias primárias deste órgão, este estudo vai centrar-se nestes dois tipos de tumores.

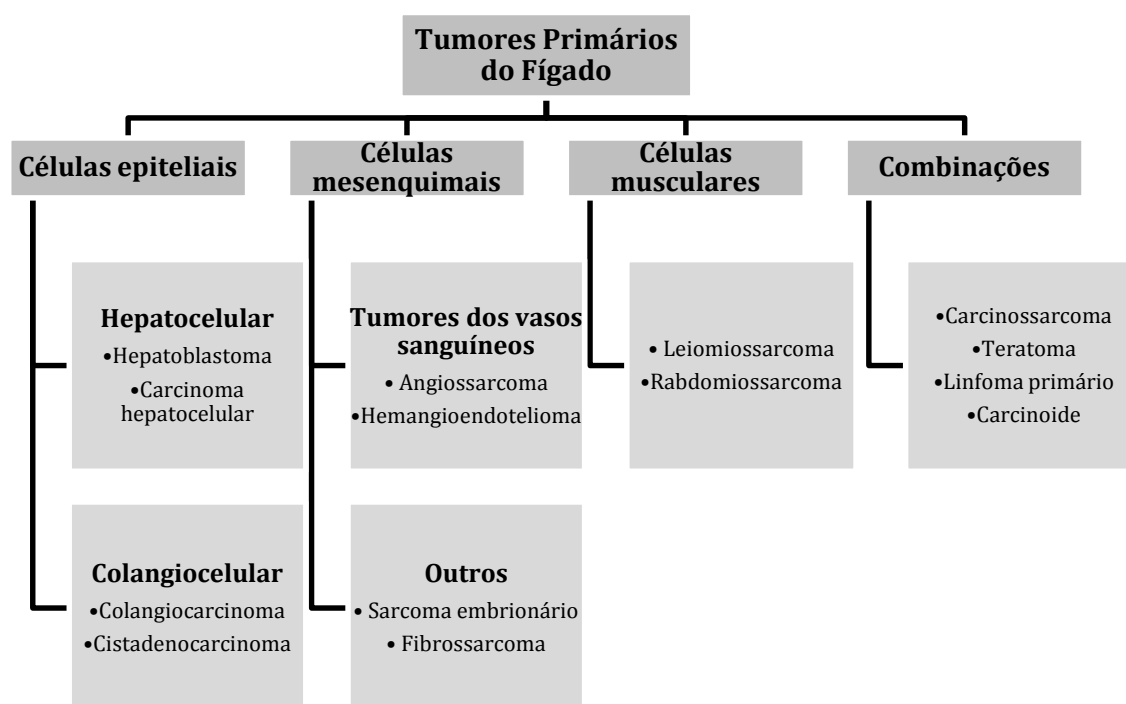


Figura 1: Classificação dos tumores primários do fígado de acordo com a sua origem celular. Baseado em Ahmed & Lobo (Ahmed & Lobo, 2009).

Carcinoma Hepatocelular

O carcinoma hepatocelular resulta de um processo de malignização complexo e heterogéneo que surge no contexto de uma progressiva disfunção hepática subjacente. Dada a natureza assintomática nos estádios mais precoces da doença, a maioria dos casos de carcinoma hepatocelular são detectados em fases avançadas, constituindo na maioria das vezes situações clínicas incuráveis. Para além disso, o carcinoma hepatocelular caracteriza-se por ser um tipo de tumor

altamente agressivo, o que se associa a uma elevada mortalidade (Gomes *et al.*, 2013; Finn, 2013).

Tal como a maioria dos cancros, o carcinoma hepatocelular tem muitas vezes origem em mutações genéticas, as quais alteram as vias metabólicas da célula e que frequentemente determinam a indução de multiplicações celulares desordenadas. Por sua vez, as mutações podem ser consequência de diversos factores externos, tais como infecções por vírus, em especial pelos vírus da hepatite B e C, ou proliferação hepatocelular associada à hepatite crónica. Esta proliferação celular após hepatite induz um risco acrescido de surgimento de erros na duplicação dos genes (Gomes *et al.*, 2013) o que pode explicar a grande incidência de cancros primários do fígado nos doentes que previamente desenvolveram hepatite.

Actualmente este é um dos tipos de cancro mais letais em todo o mundo, constituindo a segunda causa de morte por cancro a nível mundial. De acordo com a GLOBOCAN, em termos de incidência, o carcinoma hepatocelular é o sétimo mais comum, e estima-se que em 2012 tenham surgido 782 451 novos casos. Em relação ao género, no homem este é o quinto tipo de cancro mais incidente (554 369 novos casos em 2012), e o nono mais incidente na mulher (228 082 novos em 2012). No que diz respeito à mortalidade, o carcinoma hepatocelular é o segundo mais letal no caso dos homens e o sexto no caso das mulheres. De acordo com a GLOBOCAN, estima-se que em 2012 tivessem ocorrido 745 517 mortes decorrentes de carcinoma hepatocelular. O número de casos diagnosticados e o número de mortes é muito próximo, o que se prende essencialmente com o facto deste cancro ser diagnosticado, na maioria das vezes, em estádios bastante avançados, o que conduz a uma elevada taxa de mortalidade (Venook *et al.*, 2010; Yang & Roberts, 2010; Ferlay *et al.*, 2010; Jemal *et al.*, 2011; Brito *et al.*, 2012; GLOBOCAN, 2013).

No que diz respeito a Portugal, a taxa de incidência desta neoplasia é baixa quando comparada com outros tipos de cancro e representa apenas cerca de 1,1% de todos os tipos de cancro diagnosticados. Em relação à mortalidade, o carcinoma hepatocelular é responsável por cerca de 2% das mortes por cancro em Portugal. Segundo o Instituto Nacional de Estatística, em 2011 registaram-se 979 óbitos decorrentes do carcinoma hepatocelular (Ferlay *et al.*, 2010; Gomes *et al.*, 2013).

A incidência de carcinoma hepatocelular varia de acordo com a idade, etnia, género e distribuição geográfica. A maioria (mais de 80%) dos casos de carcinoma hepatocelular ocorre na Ásia de Leste e na África sub-Saariana, onde as taxas de incidência são superiores a 20 por cada 100 mil indivíduos. Em relação aos países desenvolvidos, nos países do sul da Europa tais como a Grécia, a Espanha ou a Itália, a incidência apresenta valores médios, entre 10 e 20 casos por cada 100 mil

indivíduos, enquanto que no Norte da Europa, na Oceania e no continente Americano a incidência de carcinoma hepatocelular é baixa, ou seja, inferior a 5 casos por cada 100 mil indivíduos. Nos tempos mais recentes tem-se verificado uma tendência para o aumento da incidência de carcinoma hepatocelular nas regiões tidas como de baixa incidência, tais como o Canadá e os Estados Unidos, e de uma diminuição nas regiões consideradas como de alta incidência como a China e o Japão. A figura 2 esquematiza a distribuição geográfica da incidência de carcinoma hepatocelular (Yang & Roberts, 2010; El-Serag, 2012).

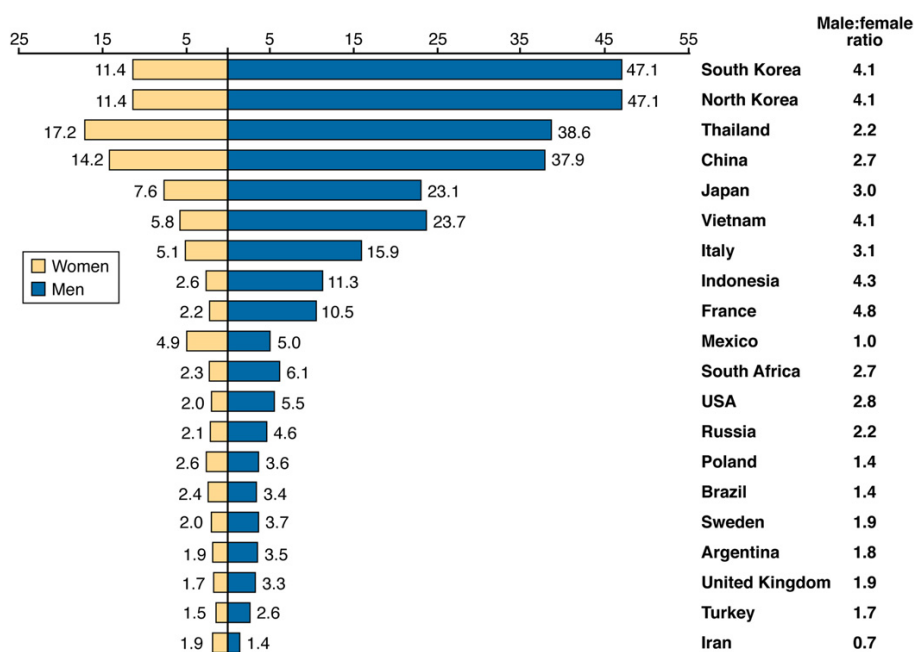


Figura 2: Taxas de incidência de carcinoma hepatocelular nas diferentes regiões do mundo, por cada 100 mil indivíduos/ano e para os homens/mulheres (El-Serag, 2012).

O carcinoma hepatocelular raramente surge antes dos 40 anos de idade, excepto nas populações onde a infecção pelo vírus da hepatite B (VHB) é hiperendémica. Na Europa e na América do Norte o pico de incidência a nível etário é entre os 63 e os 65 anos de idade, enquanto que na China, um dos principais focos mundiais de carcinoma hepatocelular, a idade média na altura do diagnóstico se situa entre os 55 e os 59 anos (Schütte *et al.*, 2009; El-Serag, 2012).

O risco de incidência de carcinoma hepatocelular é 2 a 7 vezes maior no homem do que na mulher, variando de acordo com a região do globo. Tal como se pode verificar na figura 2, a discrepância entre a incidência nos homens e nas mulheres é maior nas regiões de maior incidência. São três os motivos principais que conduzem a esta diferença de incidência de acordo com o género. Em primeiro

lugar, os indivíduos do sexo masculino estão, por norma, mais expostos aos vírus da hepatite e a ambientes mais carcinogénicos para o fígado, tais como o tabaco e o álcool. Por outro lado, a mulher parece ter menor predisposição para desenvolver carcinoma hepatocelular uma vez que os estrogénios podem ter o efeito de suprimir a inflamação mediada pela interleucina-6 (IL-6), o que reduz o dano hepático e a proliferação compensatória. Por sua vez, no homem, sabe-se que a testosterona pode induzir um aumento na sinalização do receptor de androgénio, o que, por sua vez, promove a proliferação de células de carcinoma hepatocelular (Yang & Roberts, 2010; El-Serag, 2012).

Actualmente considera-se que todos os factores etiológicos associados ao carcinoma hepatocelular são causa de uma doença hepática crónica. Os principais factores de risco para o desenvolvimento deste tipo de tumor são a infecção pelos vírus das hepatites B e C (VHB e VHC) seguidos do alcoolismo e do tabagismo. Na África e na Ásia há que ter em consideração também a ingestão de alimentos que contêm micotoxinas, mais precisamente a aflatoxina B1 (AFB1). Para além disso, a cirrose hepática, relacionada tanto com a ingestão crónica de álcool como com a infecção pelo VHB e pelo VHC, é também um dos principais factores de risco para o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular. Considera-se que cerca de 80% dos doentes com carcinoma hepatocelular desenvolvem cirrose antes do aparecimento do tumor (Alves *et al.*, 2011).

As diferenças nas taxas de incidência de carcinoma hepatocelular nas diversas regiões do mundo são o reflexo da distribuição geográfica dos factores de risco para este tipo de cancro. Constata-se que os países com elevada prevalência de infecções pelos VHB e VHC são aqueles que apresentam maiores taxas de incidência de carcinoma hepatocelular. Em concordância com estes dados está o facto de cerca de 75% dos casos de carcinoma hepatocelular se deverem a infecções crónicas por estes vírus (Yang & Roberts, 2010).

De entre os factores de risco destaca-se a infecção pelo VHB, sendo esta a causa mais frequente do carcinoma hepatocelular. Mais de metade da população diagnosticada com carcinoma hepatocelular está infectada pelo VHB, e sabe-se que os portadores deste vírus possuem uma probabilidade de desenvolver carcinoma hepatocelular 100 vezes superior aos indivíduos não infectados (Bruix & Sherman, 2005). O VHB pertence à família dos hepadnavírus e é capaz de integrar o genoma humano, podendo activar proto-oncogenes ou suprimir genes reguladores celulares, o que permite aos hepatócitos entrar em processos que conduzem a transformações malignas (Mazzanti *et al.*, 2008). No entanto, sabe-se que o risco de desenvolvimento de carcinoma hepatocelular em indivíduos que sofrem de hepatite B difere de acordo com a etnia, sendo que os africanos e asiáticos

desenvolvem carcinoma hepatocelular na idade adulta e nem sempre associados a casos de cirrose, enquanto que os caucasianos desenvolvem o tumor hepático numa idade mais avançada, normalmente depois de um período de cirrose hepática progressiva. Esta disparidade pode ser explicada tanto por variações genéticas entre etnias, como através da diferença de idades que as diversas populações apresentam na altura da infecção por VHB (Yang & Roberts, 2010). Dos carcinomas hepatocelulares originados pelo VHB, 70% a 90% surgem em doentes cirróticos; no entanto, este vírus é também considerado a principal causa de carcinoma hepatocelular na ausência de cirrose (El-Serag, 2012). Devido aos planos de vacinações, a infecção por este vírus é cada vez menor nos países desenvolvidos, o que reforça o facto de os países em desenvolvimento terem taxas de incidência de carcinoma hepatocelular mais elevadas (El-Serag, 2012).

Tal como foi referido anteriormente, a infecção pelo VHC é também um dos principais factores de risco para o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular. Apesar disso, devido à escassez de estudos a longo prazo, actualmente, é ainda difícil determinar a probabilidade de pessoas infectadas por este vírus virem a desenvolver carcinoma hepatocelular, sendo a melhor estimativa de 1% a 3% após 30 anos. Também o VHC, promove o aparecimento de fibrose e, eventualmente, de cirrose, e aumenta o risco de desenvolvimento de carcinoma hepatocelular. Assim que a cirrose causada pela infecção por VHC se estabelece, o carcinoma hepatocelular desenvolve-se a uma taxa anual entre 1% a 4% (El-Serag & Rudolph, 2007).

Há estudos que também indicam que pessoas co-infectadas com o vírus da imunodeficiência humana (VIH) e com VHB ou VHC podem desenvolver, de forma mais rápida, doenças hepáticas, como a cirrose ou o carcinoma hepatocelular. No entanto, os mecanismos moleculares subjacentes à tumorigénese induzida pela infecção por VHB ou VHC não estão ainda perfeitamente esclarecidos, sabendo-se porém que estes tumores apresentam uma elevada instabilidade cromossómica (Tralhao *et al.*, 2002; Bruix & Sherman, 2005; Neuveut *et al.*, 2010).

Para além da infecção pelos vírus da hepatite, sabe-se, e já foi mencionado anteriormente, que a contaminação alimentar com AFB1 é também um dos principais factores de risco para o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular. Para além disso, é sabido actualmente que a AFB1 pode actuar em sinergia com o VHB na patogénese deste tipo de tumor. A AFB1 induz mutações no ácido desoxirribonucleico (ADN), em particular no codão 249 do gene *TP53* (do inglês *tumor protein 53*) com atenuação da sua função supressora tumoral. Nas regiões Asiáticas e Africanas, têm vindo a ser desenvolvidos esforços para eliminar a exposição dos alimentos a esta toxina (Mazzanti *et al.*, 2008; Yang & Roberts, 2010).

Para além dos factores de risco referidos anteriormente, existem outros que, embora possuindo um papel menos notório, contribuem para o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular. De entre eles destacam-se a diabetes *mellitus*, a esteatose hepática não-alcoólica e factores alimentares tais como a ingestão crónica de álcool, o que muitas vezes conduz a cirrose hepática que, por si só, é um factor de risco importante (Blonski, 2010; Brechot *et al.*, 2010; Neuveut *et al.*, 2010).

O facto de a diabetes *mellitus* ser considerada um factor de risco para o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular tem vindo a ser defendido por vários autores nas últimas décadas (Yu & Yuan, 2004; Yang & Roberts, 2010). Por sua vez, a obesidade parece também contribuir para o desenvolvimento desta neoplasia, ou de forma isolada, ou em sinergia com a diabetes *mellitus* com a qual se encontra intimamente relacionada e para a qual constitui um factor de risco. No entanto, o mecanismo molecular através do qual a obesidade e/ou diabetes *mellitus* induzem o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular não está ainda perfeitamente caracterizado. Apesar disso, sabe-se já que a inflamação hepática decorrente de casos de diabetes e/ou obesidade induz stresse oxidativo e peroxidação lipídica, o que por sua vez conduz a dano hepático, fibrose e, eventualmente, cirrose, podendo esta via constituir um mecanismo de desenvolvimento de carcinoma hepatocelular nos doentes portadores daquelas patologias. Mais recentemente, alguns estudos têm evidenciado ainda a existência de uma interacção sinérgica entre álcool, diabetes e hepatites virais, induzindo consequências severas no desenvolvimento deste tipo de tumor (Yu & Yuan, 2004; Yang & Roberts, 2010).

Por fim, sabe-se também que existem algumas doenças metabólicas e genéticas tais como a hemocromatose, a doença de Wilson, a porfíria e a deficiência em α 1-antitripsina que podem constituir factores de risco para o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (Wang *et al.*, 2002).

Alterações moleculares e genéticas

As células de carcinoma hepatocelular, a nível genético estão descritas como detendo alterações significativas em vários cromossomas. Até à data, já foram encontradas mutações em vários genes, que se repercutem nas proteínas por estes codificadas. Das proteínas envolvidas é de destacar a P53 (proteína 53), a P73 (proteína 73), a P16 (proteína 16 ou CDKN2A, do inglês *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*), a RB (do inglês *retinoblastoma protein*), a APC (do inglês

adenomatous polyposis coli), a PTEN (do inglês *phosphatase and tension homolog*), o BRCA2 (do inglês *breast cancer type 2 susceptibility protein*), as SMAD2 e 4 (do inglês *mothers against decapentaplegic homolog-2 and 4*), a DCL-1 (do inglês *deleted in liver cancer*), o factor de crescimento semelhante à insulina 2 (IGF-2, do inglês *insulin like growth factor 2*), a SOCS-1 (do inglês *supressor of cytokine signaling 1*), a β -catenina (do inglês *catenin/cadherin-associated*), o c-MYC (do inglês *myelocytomatosis c*) e a ciclina D1 (cyclin D1, do inglês *G1/S specific cyclin D1*) (Alves *et al.*, 2011).

De entre os genes normalmente mutados e consequentes proteínas anormalmente expressas nas células de carcinoma hepatocelular, assume especial importância o gene *TP53*, sendo que as mutações neste gene correspondem à *posteriori*, a alterações na expressão da proteína correspondente, a P53. Associadamente, neste tipo de tumores, e intimamente correlacionado com as alterações da P53, ocorrem também alterações no balanço entre os factores que medeiam a sobrevivência e a morte celular, temática que será abordada mais à frente (Alves *et al.*, 2011).

Além das mutações em genes específicos, existem também várias vias de sinalização e mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento do carcinoma hepatocelular. Aqui se incluem os mecanismos que regulam a proliferação e a sobrevivência celular, os factores angiogénicos produzidos pelas próprias células tumorais, os receptores de oncogenes e os factores de crescimento e seus respectivos receptores. De entre estes mecanismos salienta-se a sobreexpressão do factor de crescimento epidérmico (EGF, do inglês *epidermal growth factor*) com possível estimulação do receptor de tirosina cinase (RTK, do inglês *receptor tyrosine kinase*). Por sua vez, esta estimulação permite manter o receptor activo, estimulando desta forma a transdução da informação da membrana celular para o núcleo. Existem outros mecanismos e mensageiros secundários que estão envolvidos no desenvolvimento do carcinoma hepatocelular, conduzindo moléculas e transmitindo sinais desde a superfície celular até ao núcleo. Uma dessas vias é a via das MAP cinases (MAPK, do inglês *mitogen-activated protein kinase*), que actua através da proteína RAS. Esta proteína é activada por acção da ligação de um factor de crescimento a receptores membranares, sofrendo posteriormente autofosforilação, o que lhe permite transmitir o sinal através da activação de outros componentes desta via de sinalização tais como a cinase extracelular regulada 1 (ERK1, do inglês *extracellular signal-regulated kinases 1*), a cinase MEK (do inglês *MAPK/extracellular signal-related kinase kinase*) e a cinase RAF (do inglês *rapidly accelerated fibrosarcoma*) (Alves *et al.*, 2011; Villanueva, 2011).

O mecanismo de angiogénese também possui um papel bastante activo no desenvolvimento desta neoplasia, pois está envolvida na estimulação da proliferação celular. Estudos imagiológicos demonstraram que o carcinoma hepatocelular é um tumor altamente vascularizado, estando o factor de crescimento endotelial vascular (VEGF, do inglês *vascular endothelial growth factor*) presente em larga escala e, particularmente activo, neste tipo de cancro. Para além disso, existe uma estreita ligação entre a angiogénese tumoral e a referida via das MAPK, uma vez que o número de receptores requeridos para esta cascata de sinalização aumenta em resposta à angiogénese, contribuindo para a diferenciação, a regulação da proliferação e a sobrevivência das células tumorais (Alves *et al.*, 2011; Villanueva, 2011).

Desregulação entre a sobrevivência e a morte celular no carcinoma hepatocelular

A apoptose representa uma modalidade para eliminar o excesso de células e pode ocorrer em condições fisiológicas normais como por exemplo durante o desenvolvimento embrionário e na regeneração hepática, entre outros. Este tipo de morte celular é também um processo fundamental na carcinogénese e na resposta às terapêuticas anti-tumorais dirigidas a alvos moleculares. A este propósito, podemos referir que a deficiência na apoptose tem sido correlacionada com o desenvolvimento e a progressão de tumores do fígado e do tracto biliar (Fabregat, 2009).

Não se poderia falar de apoptose sem referenciar o papel chave que a P53 tem neste processo. Para além disso, tal como referido, sabe-se que de entre as alterações moleculares mais comumente observadas no carcinoma hepatocelular, se encontram as mutações no gene supressor tumoral *TP53* e na proteína por este gene codificada, a P53 (Ferreira *et al.*, 1999; Tolis, & Giaccone, 1999; Fabregat, 2009). Devido às suas múltiplas funções, de extrema importância para a manutenção da homeostasia celular, a P53 é muitas vezes denominada como guardião do genoma. Porém, em condições extremas esta proteína pode assumir também um papel maligno para o organismo. O papel central que o gene *TP53* tem, enquanto supressor tumoral, destaca a sua importância na regulação da activação da transcrição de genes reguladores do crescimento celular, controlando a divisão celular e a progressão do ciclo celular. Em condições normais, a P53 está presente nas células em concentrações baixas mas pode ocorrer a activação da transcrição desta proteína em resposta a diversos estímulos tais como danos no ADN, infecção

virais, hipóxia, ou progressão desregulada do ciclo celular. A proteína P53 possui diversas e importantes funções biológicas que incluem a manutenção do ciclo celular, a reparação de danos no ADN, o balanço entre a proliferação celular e a apoptose, a resposta ao stresse celular e a inibição da angiogénese (Ferreira *et al.*, 1999; Fabregat, 2009).

De entre as funções mencionadas, a regulação do ciclo celular é uma das principais funções da P53. Podemos dizer que, para a estabilização do genoma, a P53 pode actuar de forma directa ou indirecta. De forma directa, esta proteína é capaz de induzir paragens do ciclo celular na fase G1 que podem ser reversíveis e benéficas para a reintegração das células uma vez que, em resposta a danos, tais como acções químicas mutagénicas, a P53 pode induzir a apoptose ou promover reparações no ADN contribuindo deste modo para a estabilidade do genoma. Indirectamente, esta proteína pode agir como um activador transcripcional de diversos genes induzindo a expressão e/ou a activação das proteínas correspondentes que, por sua vez, desempenham diferentes funções celulares. De entre eles salienta-se a proteína P21 (P21) que pode inibir o crescimento de uma ampla variedade de células incluindo as tumorais, uma vez que a P21 inibe a actuação de cinases dependentes de ciclinas que são requeridas para o desenrolar do ciclo celular. Para além do *TP21*, vários outros genes são alvos da P53 neste âmbito, tais como a ciclina G e o 14-3-3 σ (Tokino & Nakamura, 2000; Chen *et al.*, 2003).

Por seu turno, existem também genes capazes de inibir a P53, tendo especial importância o gene *MDM2* (do inglês *murine double minute 2*), o principal regulador da P53 que se encontra amplificado em cerca de 7% de todos os cancros humanos. O *MDM2* e a P53 são regulados por um mecanismo de *feedback*. Se por um lado, o gene *MDM2* promove a degradação da forma fosforilada da P53 inibindo, conseqüentemente, a sua função enquanto activador transcripcional, por outro lado, a P53 possui a capacidade de activar a proteína *MDM2* (Forslund *et al.*, 2008; Tokino & Nakamura, 2000).

É de salientar também o papel que a P53 possui na activação das vias de sinalização que conduzem à apoptose. Para além da P53, um grande número de genes alvo desta estão envolvidos nestas vias de sinalização, onde se encontra a proteína pró-apoptótica BAX (do inglês *Bcl-2 associated X protein*) que, em conjunto com a anti-apoptótica BCL-2 (do inglês *B-cell lymphoma 2*), forma heterodímeros de modo a manter a homeostasia. A P53 possui a capacidade de induzir a expressão de BAX e, por consequência, activar a via intrínseca da apoptose (Ferreira *et al.*, 1999).

Para além disso, é sabido que as células que apresentam formas mutadas da

P53, facto recorrente no carcinoma hepatocelular, possuem normalmente uma vida mais longa e são mais resistentes à quimioterapia e à radioterapia (Akimoto *et al.*, 2006; Guan *et al.*, 2006).

No entanto, embora se saiba que as mutações no gene *TP53* são comuns no carcinoma hepatocelular, e que a expressão alterada da P53 se possa interligar com a progressão tumoral, o grau avançado do tumor, a sobrevivência e a resposta à terapia, pouco ainda se sabe acerca da forma como as mutações no gene *TP53* se correlacionam com a recorrência do carcinoma hepatocelular (Chen *et al.*, 2003). No que diz respeito à terapêutica, é sabido que a maioria dos fármacos utilizados em quimioterapia necessitam da acção da P53 para conseguirem induzir a apoptose. Deste modo, os tumores com baixa expressão ou com expressão mutada desta proteína são geralmente resistentes à quimioterapia, sendo este um dos principais mecanismos que explicam a baixa eficácia da quimioterapia convencional no carcinoma hepatocelular (Fabregat *et al.*, 2007).

É importante salientar que a grande maioria das alterações genéticas observadas no carcinoma hepatocelular induzem um desequilíbrio entre a expressão de proteínas pró- e anti-apoptóticas da família BCL-2, o que poderá estar correlacionado com as alterações no gene *TP53*. Sabe-se, por exemplo, que a expressão de membros anti-apoptóticos desta família, como a BCL-2, a BCL-XL (do inglês *B-cell lymphoma-extra large*) e a MCL-1 (do inglês *induced myeloid leukemia cell differentiation*) se encontra aumentada numa grande percentagem de carcinomas hepatocelulares. Em contraste, a expressão de alguns membros pró-apoptóticos desta família tais como a BAX e a BCL-XS (do inglês *B-cell lymphoma-extra short*) está diminuída nos carcinomas hepatocelulares que expressam uma P53 alterada (Johnson, 2000; Yeo *et al.*, 2005; Fabregat *et al.*, 2007; Fabregat, 2009; Giglia *et al.*, 2010).

Alguns estudos revelaram ainda que em cerca de 90% dos carcinomas hepatocelulares avançados ocorrem expressões elevadas do inibidor da apoptose ligado ao cromossoma X (XIAP, do inglês *X-linked inhibitor-of-apoptosis protein*), um bem conhecido inibidor das caspases. Deste modo, a sobreexpressão da XIAP pode conferir resistência deste tipo de cancro à evasão à apoptose. Também a survivina, um outro membro da família das proteínas inibidoras da apoptose se encontra sobreexpressa em algumas linhas celulares e nos tecidos de carcinoma hepatocelular. Ao que tudo indica, a survivina parece ter um papel importante na progressão deste cancro através da inibição da apoptose e também da promoção da proliferação celular. Neste contexto, há estudos que indicam que esta molécula pode estar correlacionada com um mau prognóstico e com elevado risco de recorrência. Em suma, as células do carcinoma hepatocelular apresentam um

desequilíbrio entre a expressão de proteínas pró- e anti-apoptóticas o que favorece a sobrevivência e a proliferação celular (Eichhorst, 2005; Fabregat *et al.*, 2007; Fabregat, 2009).

Existem ainda, inúmeros factores que conduzem à elevada resistência que o carcinoma hepatocelular apresenta à apoptose. É de salientar também a disrupção na via de sinalização do TGF- β (do inglês *transforming growth factor beta*), o que induz desregulação da apoptose. Está já confirmado que a expressão de TGF- β está aumentada numa grande percentagem dos doentes com carcinoma hepatocelular, no entanto, alguns resultados indicam que esta sobreexpressão pode desempenhar um duplo papel no controlo da apoptose quer nos hepatócitos, quer nas células do carcinoma hepatocelular, ou seja, por um lado, o TGF- β induz a morte celular, mas por outro pode activar estímulos anti-apoptóticos. Ao que tudo indica, nas células de carcinoma hepatocelular, o efeito da activação de estímulos anti-apoptóticos através deste mecanismo parece estar activo, contribuindo para a progressão tumoral e consequente invasão (Fabregat *et al.*, 2007; Fabregat, 2009).

A resistência à apoptose apresentada pelo carcinoma hepatocelular é também mediada por diversos receptores de morte. A maioria dos carcinomas hepatocelulares apresenta uma ou mais alterações em moléculas da via de sinalização do FAS (do inglês *first apoptosis signal*) o qual pode induzir resistência à apoptose. Através da expressão do FAS e do FAS ligando (FASL) consegue-se prever a recorrência do carcinoma hepatocelular. Sabe-se também que a proteína inibidora da FLICE (cFLIP, do inglês *FLICE-like inhibitory protein*), um inibidor intracelular da activação da caspase 8 está constitutivamente expressa em linhas celulares de carcinoma hepatocelular humano e apresenta níveis aumentados em tecidos tumorais e não tumorais de fígado conferindo, deste modo, resistência à via extrínseca da apoptose. Também a sobreexpressão de BRE (do inglês *brain and reproductive organ-expressed*) tem sido descrita em carcinomas hepatocelulares. A BRE é uma proteína anti-apoptótica que se liga aos domínios citoplasmáticos do receptor 1 do factor de necrose tumoral (TNF, do inglês *tumor necrosis factor*) e ao FAS atenuando a apoptose (Eichhorst, 2005; Fabregat *et al.*, 2007; Fabregat, 2009). O ligando indutor de apoptose relacionado com o factor de necrose tumoral (TRAIL, do inglês *TNF-related apoptosis-inducing ligand*) induz, selectivamente, a apoptose em várias linhas celulares transformadas, mas quase nunca em tecidos normais. Na maioria dos casos, as células de carcinoma hepatocelular expressam mRNA do TRAIL e proteína, e alguns dados indicam que a maioria das células é insensível à apoptose mediada por TRAIL (Fabregat, 2009).

A sobreexpressão de vias de sinalização de sobrevivência pelas células de carcinoma hepatocelular constitui, por si só, um entrave à apoptose. Alguns

ativadores de sinais autócrinos, tais como ligandos para o EGFR, podem proteger as células de tumores primários do fígado da apoptose induzida por stresse, por factores fisiológicos ou por fármacos pró-apoptóticos. Para além disso, a desregulação de vias de sinalização de factores de crescimento incluindo as vias do EGF e do IGF-1 tem sido bem estabelecida nos carcinomas hepatocelulares humanos. Também a tirosina cinase P60^{c-src} está sobreexpressa em células de carcinoma hepatocelular, protegendo estas células de estímulos de morte e inibindo a sua sensibilidade ao TRAIL. A via de sinalização PI3K/AKT também está alterada nas células de carcinoma hepatocelular, e a expressão do gene *PTEN* está ausente ou, então, presente de uma forma bastante residual em mais de metade destes tumores (Fabregat *et al.*, 2007; Fabregat, 2009).

Em suma, são inúmeras as alterações moleculares que contribuem para a resistência à apoptose observada nos carcinomas hepatocelulares; no entanto, é de notar que a maioria das alterações genéticas verificadas conduz a uma desregulação no balanço na expressão das proteínas pró- e anti-apoptóticas da família BCL-2, e que a expressão de membros pró-apoptóticos desta família tais como a BAX ou a BCL-XS está diminuída nos tumores do fígado com mutações na P53. Este dado reforça enormemente o papel que a família de proteínas BCL-2 assim como o gene supressor tumoral *TP53* possuem no desenvolvimento e resposta à terapia dos carcinomas hepatocelulares, indicando que novas estratégias terapêuticas, que tenham por base modificações nestes genes e/ou proteínas, possam vir a ser bastante úteis no tratamento deste tumor (Khan *et al.*, 2005 Guan *et al.*, 2006; Fabregat *et al.*, 2007; Fabregat, 2009).

Diagnóstico e tratamento

A maioria dos casos de carcinoma hepatocelular, porque é assintomático nos estádios iniciais, são diagnosticados em fases bastante avançadas da doença. Deste modo, na grande maioria das vezes, o prognóstico é muito pobre, a sobrevida diminuta e as opções terapêuticas reduzidas (El-Serag & Rudolph, 2007; Yang & Roberts, 2010).

No que diz respeito ao diagnóstico, em geral, numa primeira fase, recorre-se a uma combinação de ecografia abdominal com avaliação da presença de α -fetoproteína (AFP), um marcador tumoral presente no plasma. Considera-se que a presença de AFP sérica é o principal indício de doença, no entanto, esta expressão possui uma baixa especificidade, sendo necessário recorrer a exames

complementares para concluir o diagnóstico. Assim, por norma, o doseamento de AFP sérica e a detecção de um nódulo por ecografia, orienta para a necessidade de se recorrer a outros exames imagiológicos, especialmente a tomografia computadorizada (CT, do inglês *computed tomography*), e a ressonância magnética (RM), assim como, por vezes a um estudo histopatológico de uma biopsia do nódulo (El-Serag & Rudolph, 2007).

O papel da tomografia por emissão de positrões (PET, do inglês *positron emission tomography*) com recurso ao radiofármaco ^{18}F -Fluordesoxiglicose (^{18}F -FDG) no diagnóstico de carcinoma hepatocelular é ainda controverso e não está perfeitamente estabelecido. A sensibilidade desta tecnologia no diagnóstico deste tumor varia de 50% a 70%, e alguns estudos indicam que esta dispersão está directamente correlacionada com o grau de diferenciação tumoral. Assim, os carcinomas hepatocelulares bem diferenciados possuem maior captação e retenção de ^{18}F -FDG do que tumores pouco diferenciados. Por outro lado, estudos recentes indicam que para o mesmo tipo de tumor, entre doentes poderá ocorrer uma grande variabilidade na captação daquele radiofármaco de acordo com o perfil genético do mesmo, em especial, a expressão de alguns genes e proteínas chave no processo oncogénico como o gene *TP53* e a correspondente proteína P53. Deste modo, a PET com recurso ao ^{18}F -FDG poderá ser utilizada em doentes com carcinoma hepatocelular no sentido de melhor caracterizar o tumor e ajudar na escolha de uma terapêutica mais personalizada (Lan *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2013).

Após o diagnóstico, e depois do correcto estabelecimento do estágio da doença, existem diversas classificações e vários planos de tratamento para o carcinoma hepatocelular, merecendo especial destaque o algoritmo BCLC (do inglês *Barcelona-Clinic Liver Cancer*) (El-Serag & Rudolph, 2007). De entre as opções terapêuticas, o transplante hepático é a terapia mais eficaz, pois permite o tratamento simultâneo do cancro e da doença hepática associada. No entanto, apenas cerca de 5% dos doentes podem beneficiar desta terapia, uma vez que de entre outros obstáculos, contam-se a disponibilidade e a compatibilidade de órgãos. Para além disso, esta terapia apenas pode ser aplicada a doentes com carcinoma hepatocelular em fase inicial de cirrose descompensada. De acordo com os Critérios de Milão, o transplante é normalmente efectuado apenas em doentes com tumores isolados de dimensões inferiores a 5cm, ou com até três nódulos de dimensões inferiores a 3cm (Mazzaferro *et al.*, 1996). No entanto, após a transplantação, para além da possível rejeição do órgão poderão surgir outras complicações tais como reinfeção viral, sendo que, em 50% destes casos, 5 anos após a transplantação os doentes apresentam cirrose (Bruix *et al.*, 2004; Wörns *et*

al., 2009; Wörns & Galle, 2010; Bruix & Sherman, 2011).

A ressecção cirúrgica por hepatectomia parcial é outra opção terapêutica. Contudo só pode ser aplicada a doentes que não apresentem doença hepática major associada [Child-Pugh score B e C ou MELD>10 (do inglês *Model for End-Stage Liver Disease*)]. A taxa de sobrevivência dos doentes submetidos a esta terapia situa-se entre os 60% e os 70% ao fim de 5 anos, no entanto, a elevada taxa de recorrência da doença constitui a principal desvantagem da ressecção hepática parcial. A taxa de recorrência pode dever-se à formação *de novo* de um carcinoma hepatocelular, ou à presença de invasão microvascular ou de nódulos satélites os quais constituem factores de prognóstico de recorrência (Bruix *et al.*, 2004; Wörns *et al.*, 2009; Wörns & Galle, 2010; Bruix & Sherman, 2011;).

Embora o tratamento cirúrgico (hepatectomia parcial ou total) seja o que apresenta melhores resultados, a maioria dos doentes aquando do diagnóstico, por já se apresentarem em estádios avançados da doença, não podem usufruir desta opção terapêutica, potencialmente curativa. Neste caso, outras opções terapêuticas são mais frequentemente utilizadas como ablação por radiofrequência, por alcoolização ou a quimioembolização. Estas técnicas são executadas com controlo imagiológico, e a sua máxima eficiência é para nódulos com diâmetros inferiores a 3cm, para os quais a taxa de resposta completa ronda os 80%. No entanto, estas técnicas também apresentam desvantagens, sendo de salientar o elevado número de recidivas (Bruix *et al.*, 2004; Llovet, 2005; Wörns & Galle, 2010; Bruix & Sherman, 2011).

A crioablação e a quimioembolização trans-arterial (TACE, do inglês *transcatheter arterial chemoembolization*) são outros procedimentos indicados para o tratamento do carcinoma hepatocelular. A TACE envolve a injeção de um fármaco citotóxico combinado, por exemplo, com o lipiodol, ou utilização de microesferas, seguido por embolização com recurso a partículas absorvíveis, o que permite concentrações locais elevadas de quimioterapia, o que, por sua vez, induz a redução da taxa de progressão tumoral, com respostas objectivas entre os 16% e os 55% dos doentes (Bruix & Llovet, 2002; Bruix & Sherman, 2005; Llovet, 2005; Raoul, 2008; Cheung, 2010).

Finalmente, se bem que com resultados decepcionantes, temos a quimioterapia sistémica e a radioterapia. No entanto, devido aos maus resultados obtidos, a sua utilização é controversa e apenas no contexto de tratamento paliativo. No que diz respeito à quimioterapia, o carcinoma hepatocelular é normalmente classificado como um tumor altamente quimiorresistente, sendo mínima a eficácia da quimioterapia sistémica. Apesar disso e tendo em conta que a grande maioria dos doentes não pode usufruir das terapêuticas potencialmente

curativas anteriormente descritas, continua a utilizar-se a quimioterapia convencional de forma paliativa e com o intuito de aliviar os sintomas decorrentes da evolução da doença e melhorar a qualidade de vida dos doentes. De entre os fármacos utilizados na quimioterapia sistémica para tratamento do carcinoma hepatocelular, a doxorrubicina é um dos mais utilizados, apesar de apenas determinar uma resposta parcial em menos de 10% dos doentes e de não aumentar a sobrevida global. Por outro lado, a administração de 5-fluorouracilo em terapia combinada, embora seja defendida por alguns autores, é controversa. A cisplatina continua também a ser utilizada no tratamento destas neoplasias, quer em monoterapia quer em terapia combinada (Johnson, 2000; Brito *et al.*, 2012).

A doxorrubicina é um antibiótico da família das antraciclina com um complexo mecanismo de acção. Esta molécula tem um anel aromático que se intercala entre dois pares de bases de ADN, o que altera a sua estrutura com consequente inibição da síntese e da replicação do ADN. A doxorrubicina, apesar da grande afinidade para o ADN, também pode interagir com algumas moléculas de ARN (ácido ribonucleico), mas sem interferir significativamente com a síntese proteica. A interacção e intercalação com as cadeias de ADN promove quebras simples o que, por sua vez inibe significativamente a acção da topoisomerase II e, consequentemente, a inibição do crescimento celular, com a consequente morte da célula. Apesar da sua extensa utilização clínica, os mecanismos de acção da doxorrubicina permanecem ainda sob intenso debate o que torna a sua utilização controversa. De facto, são várias as evidências que mostram o seu efeito em tecidos não-alvo, tais como o coração, o cérebro, os rins ou o fígado, o que condiciona uma redução das doses para diminuir os efeitos adversos. Esta ocorrência é muitas vezes um entrave à sua utilização no tratamento oncológico, pois a redução das doses reduz também os efeitos terapêuticos (Carvalho *et al.*, 2009; Brito *et al.*, 2012).

A cisplatina, um dos fármacos mais utilizados na quimioterapia convencional é uma molécula inorgânica com uma estrutura simples, que contém um átomo de platina (Figura 3). Este fármaco interfere com o crescimento de células tumorais podendo interagir com o ADN, com indução de apoptose. A cisplatina pode entrar nas células tumorais por difusão ou por transporte activo, através da membrana celular. Uma vez dentro da célula, um dos ligandos de cloro da molécula é substituído por água, o que permite a produção de espécies reactivas de oxigénio que, por sua vez, podem reagir com as bases do ADN, preferencialmente a guanina, o que induz a formação de aductos de ADN que distorcem a sua estrutura. Este processo pode, posteriormente, induzir a morte celular por apoptose. No entanto, a eficácia da cisplatina está limitada pela

resistência das células tumorais ao fármaco, que se pode relacionar com a diminuição da sua acumulação intracelular por activação de mecanismos de reparação de ADN, ou com a activação de mecanismos que podem inactivar a acção da cisplatina (Köberle *et al.*, 2010; Brito *et al.*, 2012).

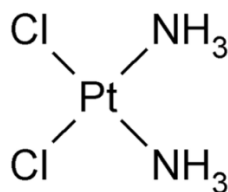


Figura 3: Estrutura química da cisplatina. Adaptado de Long *et al* (Long & Repata, 1981).

O 5-Fluorouracilo, um análogo da pirimidina, é uma molécula frequentemente utilizada em quimioterapia convencional, numa ampla variedade de neoplasias. É sabido que possui um grande potencial no tratamento de tumores gastrointestinais. No que diz respeito ao mecanismo de acção, o 5-Fluorouracilo é metabolizado a 5-Fluorodesoxiuridina-monofosfato que, posteriormente, inibe a timidilato sintetase. Por sua vez, esta enzima normalmente metila o uracilo formando timina a qual é incorporada no ADN. Adicionalmente, como análogo da pirimidina, o próprio 5-Fluorouracilo é capaz de ser incorporado nas cadeias de ADN e de ARN. Desta forma, o 5-Fluorouracilo e os seus metabolitos inibem a síntese de ADN, conduzindo a bloqueios no ciclo celular e a indução da apoptose. Mais recentemente, o 5-Fluorouracilo tem vindo a ser amplamente utilizado em combinação com outros fármacos, com resultados bem mais promissores (Longley *et al.*, 2003; Brito *et al.*, 2012).

Para além dos fármacos mencionados, tem sido estudado o efeito terapêutico no carcinoma hepatocelular de outros fármacos frequentemente utilizados em quimioterapia, tais como a mitoxantrona, o ectoposídeo, o placlitaxel, o irinotecano, a gemcitabina e a capecitabina, tanto em monoterapia como em combinação. No entanto, os resultados obtidos são de igual modo decepcionantes. Assim, actualmente, a quimioterapia quando utilizada no tratamento do carcinoma hepatocelular possui um papel meramente paliativo, tentando controlar os efeitos do crescimento tumoral e, deste modo, minimizar a sintomatologia (Yeo *et al.*, 2005; Hussain *et al.*, 2007; Giglia *et al.*, 2010).

Tal como foi referido anteriormente, sabe-se que na maioria dos carcinomas hepatocelulares a expressão de algumas proteínas pró-apoptóticas está diminuída, ao mesmo tempo que a expressão de algumas proteínas anti-apoptóticas está

aumentada, o que determina a desregulação do equilíbrio entre a morte e a sobrevivência celular. Para além disso, na maior parte das vezes, a expressão e/ou activação da P53 encontra-se alterada. Como a grande maioria dos fármacos utilizados em quimioterapia têm um mecanismo de indução de morte que está intimamente correlacionado com esta proteína, a terapêutica não deve ser generalizada, pois a resposta ao fármaco utilizado pode variar. Com o intuito de aumentar a eficácia da terapia, a escolha do fármaco ou dos fármacos deverá ter em conta o perfil genético do tumor (Johnson, 2000; Yeo *et al.*, 2005; Hussain *et al.*, 2007; Giglia *et al.*, 2010; Villanueva, 2011).

Quanto à radioterapia, no carcinoma hepatocelular, desempenha um papel menor, apesar de também poder ser utilizada. O fígado e os seus tumores primários apresentam grande radiorresistência, o que conduz à ineficácia deste tipo de terapia. Para além disso, a heterogeneidade destes tumores, no que diz respeito, por exemplo, à expressão do gene *TP53* e de outros genes e/ou proteínas envolvidos nas vias de morte e de proliferação celular, pode estar na base da sua resistência e/ou sensibilidade à radioterapia (Cao *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2010).

Nas últimas décadas a terapia oncológica tem sofrido algumas mudanças no que diz respeito ao espectro de fármacos disponíveis para o tratamento do cancro. Neste sentido, cada vez mais se tem abandonado a utilização de fármacos de quimioterapia de amplo espectro e adoptado a utilização de terapias específicas de modo a interagir com vias de sinalização concretas que estejam desreguladas num tipo de cancro específico. Uma vez que muitos dos tumores sólidos são inerentemente resistentes aos tratamentos de quimioterapia e de radioterapia, o desenvolvimento de terapias dirigidas para determinado alvo molecular veio providenciar grandes avanços na terapia oncológica. Para além disso e uma vez que estas terapêuticas são dirigidas a um alvo específico, normalmente desregulado na célula oncológica, consegue-se diminuir substancialmente a toxicidade nos tecidos não-alvo e, simultaneamente, fornecer um índice terapêutico mais elevado (Wilhelm *et al.*, 2008; Ibrahim *et al.*, 2012;).

Uma das vias de sinalização que se encontra muitas vezes desregulada nos tumores sólidos, incluindo no carcinoma hepatocelular é, como já foi referenciado, a via das RAF cinases. Vários foram os estudos que pretenderam desenvolver uma molécula que interferisse com este alvo, o que conduziu à descoberta do sorafenib em 1990. Posteriormente descobriu-se que o sorafenib actua não apenas no próprio tumor, mas também na sua microvascularização, sendo por isso considerado um inibidor multikinase de dupla acção. Sabe-se actualmente que este fármaco inibe a proliferação celular através de uma forte inibição das serina/treonina cinases RAF, mais precisamente da RAF-1, da RAF-B *wild-type*, da

RAF-B oncogénica V600E da via das MAPK (Figura 4). Para além disso, este fármaco inibe de uma forma bastante eficaz os receptores de factores de crescimento endoteliais vasculares pró-angiogénicos VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 (do inglês *vascular endothelial growth factor receptor 1, 2 e 3*) e o factor de crescimento derivado de plaquetas β (PDGFR- β , do inglês *platelet-derived growth factor β*). Todos eles são receptores tirosina-cinase que utilizam a via das MAPK para estimular a proliferação das células endoteliais vasculares e prolongar a sua sobrevivência dando origem a novos vasos sanguíneos. Aqueles receptores também promovem a proliferação, sobrevivência e recrutamento de pericitos de modo a estabilizar os vasos sanguíneos recém-formados (Wilhelm *et al.*, 2008; Ibrahim *et al.*, 2012).

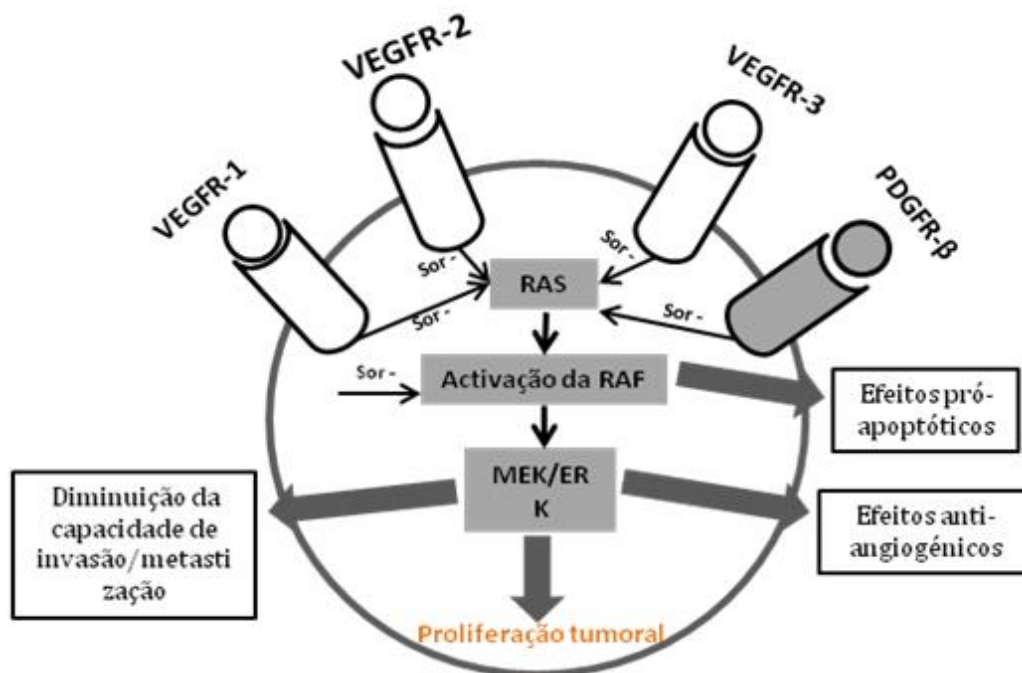


Figura 4: Diversos alvos moleculares do sorafenib. O sorafenib inibe a auto-fosforilação do VEGFR-1, do VEGFR-2, do VEGFR-3 e do PDGFR- β , assim como previne a activação da RAF. A inibição desta está associada à regulação negativa de algumas vias de sinalização a jusante e de outras vias moleculares que conduzem à apoptose. Adaptado de Ibrahim *et al.* (Ibrahim *et al.*, 2012)

Paralelamente, tem-se demonstrado que o sorafenib é capaz de induzir apoptose numa ampla variedade de linhas celulares tumorais, embora o mecanismo subjacente a esta indução não esteja ainda perfeitamente esclarecido. Sabe-se porém, que o sorafenib inibe a fosforilação do factor de iniciação da tradução eucariótica 4E (eIF4E, do inglês *eukaryotic translation initiation factor 4E*)

o que resulta na diminuição da expressão da proteína anti-apoptótica MCL-1. Por sua vez, a sub-expressão da MCL-1 induz a libertação do citocromo c da mitocôndria para o citoplasma o que, por sua vez, activa as caspases e induz a morte celular por apoptose (Wilhelm *et al.*, 2008; Ibrahim *et al.*, 2012).

Uma vez que o sorafenib possui vários alvos, o seu mecanismo de acção varia nos diversos tipos de cancro, pois depende da expressão de alvos específicos. Por outro lado, pode ocorrer uma sobreposição de vários mecanismos no mesmo tipo de cancro e o sorafenib actuar simultaneamente através de diversas vias. O carcinoma hepatocelular parece estar incluído nesta última possibilidade. Este tipo de tumor é notoriamente hipervasculoso e são diversos os estudos que demonstraram a existência de uma sobreexpressão de VEGFR (tanto no mRNA como na proteína) em amostras de carcinoma hepatocelular humano. Para além disso, através de estudos experimentais demonstrou-se que o bloqueio do VEGFR diminui significativamente o crescimento tumoral em modelos animais ortotópicos de carcinoma hepatocelular (Raskopf *et al.*, 2005). No entanto, e embora pareça que o mecanismo de acção do sorafenib no carcinoma hepatocelular é a nível da vascularização não se deve tomar como único, pois existem estudos que destacam o papel do sorafenib na inibição da via da RAF no tratamento do carcinoma hepatocelular (Abou-Alfa *et al.*, 2006). De facto, actualmente sabe-se que tanto a cascata de sinalização RAF/MEK/ERK como a angiogénese possuem papéis fundamentais no desenvolvimento de carcinoma hepatocelular, pelo que, neste tipo de tumor, o sorafenib pode actuar quer a nível da célula oncológica, quer a nível da neovascularização (Wilhelm *et al.*, 2008; Ibrahim *et al.*, 2012).

Para além desta dupla abordagem, o sorafenib possui outras características que o tornam um fármaco com bastante potencial para a utilização em terapias combinadas. As suas propriedades de inibição de diversas isoformas da RAF assim como diversas outras tirosinas cinases podem contribuir para reverter a acção de diversos genes correlacionados com a resistência multifármacos. Associadamente, a sua capacidade de induzir a apoptose pode complementar o efeito citotóxico de outros fármacos utilizados em quimioterapia convencional e mesmo o efeito da radioterapia. De facto, alguns estudos indicam que a inibição da RAF-1 pelo sorafenib sensibiliza as células tumorais para a quimioterapia e para a radioterapia. Também a combinação de sorafenib com outros fármacos implica uma redução das concentrações utilizadas, o que, por sua vez, reduz significativamente os efeitos secundários (Wilhelm *et al.*, 2008; Dal Lago *et al.*, 2008; Ibrahim *et al.*, 2012).

Assim, o sorafenib tem sido utilizado na prática clínica em doentes com carcinoma hepatocelular que, de acordo com os critérios de Barcelona se encontram em estádios avançados (Lencioni *et al.*, 2010). Através da utilização

deste fármaco, tem-se verificado um aumento da sobrevida global dos doentes por vezes associada a morbilidade. A eficácia anti-tumoral do sorafenib foi alcançada, principalmente, por reduzir a progressão tumoral, sendo com este fármaco que se obtêm os melhores resultados no tratamento sistémico do carcinoma hepatocelular (Villanueva, 2011).

Colangiocarcinoma

O colangiocarcinoma é o segundo tumor primitivo do fígado mais frequente e é um adenocarcinoma com origem nos colangiócitos (Yu *et al.*, 2004).

Anatomicamente, e de acordo com a sua localização, o colangiocarcinoma pode classificar-se em intra-hepático, extra-hepático ou hilar. Apesar de considerado um tumor raro, a incidência e a prevalência do colangiocarcinoma varia marcadamente, existindo locais onde a sua incidência ultrapassa claramente a de carcinoma hepatocelular. As taxas de incidência mais baixas encontram-se na Austrália, e as mais elevadas no sudoeste asiático onde esta neoplasia é considerada um problema de saúde pública (Anderson *et al.*, 2004; Blechacz & Gores, 2008; Al-Bahrani *et al.*, 2013).

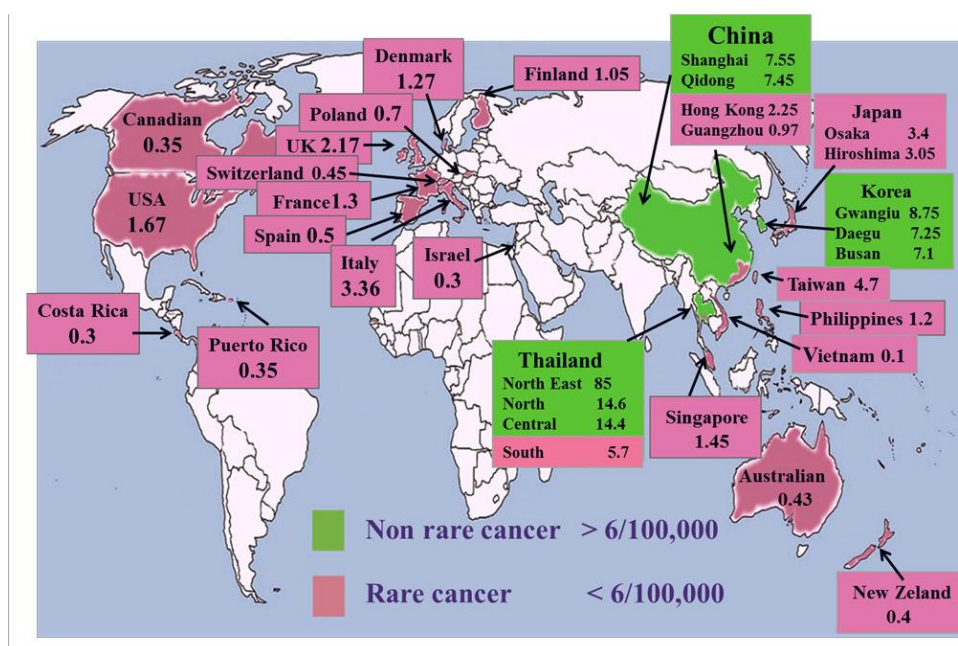


Figura 5: Taxas de incidência mundial de colangiocarcinoma (nº de casos/100 000 habitantes). Período entre 1997 e 2007 (Bragazzi *et al.*, 2012).

No nordeste da Tailândia, região do globo onde o colangiocarcinoma tem

maior incidência, representa 85% dos tumores primitivos do fígado. Ainda dentro deste país existe uma marcada diferença na incidência desta neoplasia de região para região. Enquanto no nordeste as taxas de incidência são de 85 novos casos por cada 100 000 habitantes, no norte, centro e sul do país as taxas de incidência são apenas de 14,6 por 100 000 habitantes, 14,4 por 100 000 habitantes e 5,7 por 100 000 habitantes respectivamente (Bragazzi *et al.*, 2012).

De um modo geral, a incidência deste tipo de tumor tem vindo a aumentar acentuadamente nos países ocidentais, e embora a causa para esse aumento não esteja ainda perfeitamente identificada sabe-se, por exemplo, que existe uma correlação entre o aumento da incidência na América do Norte e a migração dos asiáticos para esta zona do globo (Anderson *et al.*, 2004; Blechacz & Gores, 2008; Al-Bahrani *et al.*, 2013;).

Nos países ocidentais a idade média na altura do diagnóstico é de cerca de 65 anos e, com excepção dos doentes que tenham desenvolvido anteriormente colangite esclerosante primária, raramente é diagnosticado antes dos 40 anos de idade. Sabe-se também que entre 60% a 70% dos casos de colangiocarcinoma ocorrem no género masculino (Anderson *et al.*, 2004; Aljiffry, 2009; Blechacz & Gores, 2008) .

Actualmente as técnicas cirúrgicas oferecem a única hipótese de cura, no entanto, como a grande maioria dos doentes, na altura do diagnóstico, já ultrapassou o tempo da ressecção cirúrgica, acaba por morrer entre 6 meses a um ano após o diagnóstico. Assim, a taxa de mortalidade acompanha a taxa de incidência quase na plenitude. A morte ocorre essencialmente por insuficiência hepática e/ou complicações infecciosas que acompanham a obstrução biliar crónica (Anderson *et al.*, 2004; Blechacz & Gores, 2008).

As causas para o desenvolvimento de colangiocarcinoma são, na maioria das vezes, ainda desconhecidas, considerando-se que a maioria dos casos ocorre esporadicamente. Porém, existem várias condições associadas com a inflamação e com a colestase que foram identificadas como factores de risco para o desenvolvimento desta neoplasia (Anderson *et al.*, 2004; Blechacz & Gores, 2008; Friman, 2011).

A colangite esclerosante primária (CEP) é tida como o factor de risco mais comum, e o desenvolvimento de colangiocarcinoma em doentes que sofrem desta patologia ocorre, normalmente, nos primeiros dois anos e meio após o diagnóstico. Deste modo, torna-se extremamente importante a monitorização contínua dos doentes que sejam diagnosticados com esta entidade nosológica (Anderson *et al.*, 2004; Blechacz & Gores, 2008; Friman, 2011).

A infestação hepática por parasitas, essencialmente as espécies *Opisthorchis*

viverrini e *Clonorchis sinensis* também tem sido descrita como um factor de risco para o desenvolvimento de colangiocarcinoma. Este tipo de infestações é mais evidente em regiões do sudoeste asiático tais como a Tailândia onde a ingestão de peixe mal cozinhado é uma prática comum, e onde se relata uma elevada endemicidade. Actualmente, a infecção por estes vermes é considerada o principal motivo pelo qual existe tanta disparidade na incidência desta neoplasia na Tailândia (Anderson *et al.*, 2004; Blechacz & Gores, 2008; Friman, 2011).

Um outro factor de risco é a litíase biliar que está normalmente correlacionada com infecções biliares crónicas e é mais comumente encontrada na Ásia do que nos países ocidentais. Neste momento considera-se que cerca de 10% dos doentes com esta condição vêm posteriormente a desenvolver colangiocarcinoma (Anderson *et al.*, 2004; Blechacz & Gores, 2008; Friman, 2011).

Sabe-se também que anomalias congénitas dos ductos biliares, tais como quistos biliares congénitos e a síndrome de Caroli, constituem factores de risco para o desenvolvimento desta neoplasia, apresentando estes indivíduos um risco acrescido de 10% a 15% para o desenvolvimento de colangiocarcinoma (Anderson *et al.*, 2004; Blechacz & Gores, 2008; Friman, 2011).

Mais recentemente, também as infecções pelos vírus das hepatites B e C têm sido considerados factores de risco para o desenvolvimento de colangiocarcinoma, o que pode explicar, em parte, o aumento da incidência nas últimas décadas. Vários outros factores têm sido associados ao desenvolvimento de colangiocarcinoma, e nessa lista incluem-se por exemplo a cirrose alcoólica, o tabagismo, a obesidade e a ingestão de nitrosaminas (Anderson *et al.*, 2004; Blechacz & Gores, 2008; Friman, 2011).

Alterações moleculares e genéticas

Uma grande variedade de mutações oncogénicas foi identificada em fragmentos de colangiocarcinoma humano, sendo que a sua frequência depende da etnia, da etiologia, da localização anatómica do tumor e do estágio em que o mesmo se encontra. Diversos estudos demonstraram uma expressão anormal de *KRAS* e de *TP53* estando estas alterações genéticas associadas a um fenótipo mais agressivo desta neoplasia. Para além disso, tem sido sugerido que as alterações na expressão da P53, neste tipo de tumor, podem mediar modificações em várias cascatas de sinalização intracelulares. Outros genes supressores tumorais podem estar inactivados no colangiocarcinoma, incluindo o *P16INK4a*, o *DPC4/SMAD4* e o

APC, e a correlação entre estes marcadores e o prognóstico varia de estudo para estudo (Khan *et al.*, 2005; Blechacz & Gores, 2008; Al-Bahrani *et al.*, 2013).

A interleucina-6, já mencionada anteriormente, parece ser uma molécula de sinalização crítica na patogénese de vários tipos de cancro, podendo encontrar-se a montante ou a jusante de vários outros oncogenes. Neste contexto, o colangiocarcinoma não é excepção, e a IL-6 é uma citocina chave também na patogénese desta neoplasia, tendo o seu efeito proliferativo sido confirmado. Elevadas concentrações séricas de IL-6 foram detectadas em doentes com colangiocarcinoma, para além de que as células deste tipo de tumor geralmente sobreexpressam a subunidade gp130 do seu receptor. A estimulação da produção de IL-6 resulta num aumento da expressão da proteína anti-apoptótica MCL-1, o que torna as células do colangiocarcinoma resistentes às terapêuticas. Neste tipo de neoplasia, tem sido também demonstrado que a IL-6 induz um aumento na actividade da telomerase, o que resulta numa inibição do processo de encurtamento dos telómeros com consequente evasão à senescência celular. Para além disso, a IL-6 activa as MAPKs P44/42 (proteína 44/42 ou ERK1/2) e a P38 (proteína 38), dois componentes chave no processo de proliferação. A P38 MAPK activada diminui o inibidor das cinases dependente das ciclinas P21, um conhecido regulador negativo do ciclo celular. Tendo em consideração a comprovada importância que a IL-6 possui no desenvolvimento do colangiocarcinoma, a busca de terapias dirigidas a esta interleucina parece ter uma forte base de suporte (Blechacz & Gores, 2008; Al-Bahrani *et al.*, 2013).

Existe também comunicação cruzada entre a IL-6 e outras vias de sinalização, pois é sabido que a IL-6 medeia a sobreexpressão do EGFR. Os receptores de tirosina cinase, como é o EGFR, encontram-se sobreexpressos no colangiocarcinoma, como, aliás, em diversos tipos de cancro, modulando a biologia tumoral. Alguns estudos demonstraram, nesta neoplasia, que a inibição da sinalização via EGFR conseguiu suprimir significativamente o crescimento celular. Neste tipo de tumor a fosforilação do EGFR resulta numa activação de cinases que se encontram a jusante nas vias de sinalização tais como a P42/44 MAPK e a P38 MAPK que, por sua vez, aumentam a expressão de ciclo-oxigenase 2 (COX-2, do inglês *cyclooxygenase 2*). Por seu turno, a COX-2 desempenha um papel importante na carcinogénese do colangiocarcinoma através da inibição dos processos de apoptose e da estimulação do crescimento celular. Uma outra molécula indutora da COX-2 é a tirosina cinase ERBB-2 que, no colangiocarcinoma, está sobreexpressa e envolvida na carcinogénese e na progressão deste tipo de cancro. O ERBB-2 é um homólogo do EGFR e a sua capacidade de homodimerizar ou heterodimerizar com outros membros da família EGF resultam na activação da via de sinalização

RAF/MAPK (Blechacz & Gores, 2008; Al-Bahrani *et al.*, 2013).

Também o factor de crescimento hepatocitário (HGF, do inglês *hepatocyte growth factor*) e seu receptor c-MET (do inglês *MNNG HOS transforming gene*) estão frequentemente sobreexpressos no colangiocarcinoma. O HGF é mitogénico e o aumento da sua produção, juntamente com a sobreexpressão do seu receptor, representa um mecanismo autócrino de estímulo ao crescimento e à proliferação celulares. Em paralelo com a promoção das vias de sinalização celular que estimulam a proliferação, nas células de colangiocarcinoma verifica-se, também, uma diminuição dos factores que inibem a proliferação. Por exemplo, a resposta ao TGF- β 1 é aberrante nesta neoplasia, o que se traduz num aumento dos índices proliferativos (Blechacz & Gores, 2008; Al-Bahrani *et al.*, 2013).

Em suma, existe uma complexa rede de diferentes factores e vias de sinalização que estão envolvidos no desenvolvimento, no crescimento e na propagação do colangiocarcinoma.

Desregulação entre a sobrevivência e a morte celular no colangiocarcinoma

O colangiocarcinoma é caracterizado como um tumor quimiorresistente e radorresistente, o que está na base de grande parte dos resultados desanimadores obtidos com as terapêuticas actualmente disponíveis. Mas quais os mecanismos que conduzem a essa resistência?

Tal como no caso do carcinoma hepatocelular, também no colangiocarcinoma um dos principais motivos que tornam este tipo de tumor resistente às terapias é, normalmente, a sua resistência intrínseca à apoptose. Ora, não se poderá falar em resistência à apoptose sem se referenciar o papel chave do gene *TP53*. Tal como referido anteriormente, sabe-se que grande parte dos colangiocarcinomas apresenta mutações no gene *TP53*, contudo o papel que este gene e que a P53 possuem no prognóstico desta neoplasia não está ainda perfeitamente esclarecido. Alguns estudos indicam já que alterações, quer no gene *TP53* quer na proteína P53 podem, no colangiocarcinoma, induzir alterações nas subjacentes cascatas de sinalização intracelulares induzindo, consequentemente, resistência às terapêuticas. Alguns estudos indicam ainda que mesmo sem a ocorrência de mutações neste gene, a sobreexpressão do gene *MDM2*, sobreexpresso na maioria dos colangiocarcinomas, pode influenciar a expressão e a função da P53. Deste modo, a inactivação da P53 pela *MDM2* desempenha um papel de extrema importância na resistência à apoptose (Horie *et al.*, 2000; Khan *et al.*, 2005; Briggs *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011).

Para além da P53 existem vários outros supressores tumorais cuja expressão está desregulada no colangiocarcinoma. É o caso da DPC4/SMAD4 que está sub-expressa na maioria dos casos e da P73 que parece estar sobreexpressa numa ampla variedade de colangiocarcinomas (Briggs *et al.*, 2009).

Para além da avaliação da expressão dos genes supressores tumorais, com o intuito de clarificar os mecanismos moleculares que conferem resistência às terapêuticas, têm também sido alvo de estudo a expressão génica e proteica de alguns membros da família BCL-2 nesta neoplasia. Embora os resultados sejam por vezes um pouco contraditórios, existem estudos que indicam que a resistência à apoptose, característica do colangiocarcinoma, poderá ser resultado da sobreexpressão das proteínas anti-apoptóticas BCL-2, BCL-XL e MCL-1 (Okaro *et al.*, 2001).

Diagnóstico e tratamento

Na grande maioria dos casos, o colangiocarcinoma é um tumor silencioso, e os sintomas apenas surgem em estádios avançados da doença. Para além disso, os sinais clínicos são dependentes da localização do tumor e do padrão de crescimento. A maioria dos doentes com colangiocarcinoma extra-hepático apresenta obstrução das vias biliares com icterícia obstructiva indolor, por vezes associada a colangite. Por sua vez, as formações intra-hepáticas apresentam sintomas tardios de malignidade, típicos de massas hepáticas tais como perda de peso, perda de apetite e dor abdominal (Blechacz & Gores, 2008; Friman, 2011).

Em termos de diagnóstico, são diversos os estudos quer invasivos, quer não invasivos que podem ser efectuados. Alguns marcadores tumorais presentes no soro, embora não sendo específicos do colangiocarcinoma, podem fornecer informação valiosa principalmente em doentes com CEP subjacente. Neste sentido, os marcadores tumorais mais utilizados têm sido o antigénio carcinoembrionário (CEA, do inglês *carcinoembryonic antigen*) e o antigénio carbohidrato 19-9 (CA 19-9, do inglês *cancer antigen 19-9*). A presença de ambos pode estar aumentada no colangiocarcinoma, embora a sua utilização isoladamente seja discutível. Porém, estudos recentes têm demonstrado que a utilização combinada destes dois marcadores pode ser bastante útil para o diagnóstico e seguimento de colangiocarcinoma (Anderson *et al.*, 2011).

Estudos imagiológicos são essenciais para o diagnóstico e estadiamento desta neoplasia, e várias são as modalidades imagiológicas que podem fornecer

informação bastante útil quando há suspeita de colangiocarcinoma. Normalmente, numa abordagem inicial, os doentes com icterícia são submetidos a uma ecografia abdominal, que embora seja uma técnica dependente do operador é um método bastante sensível para a visualização dos ductos biliares. A CT é normalmente utilizada para estabelecer a localização de uma lesão assim como para determinar a multifocalidade do tumor. A utilização desta técnica imagiológica com adição de contraste é bastante sensível para a detecção de tumores das vias biliares e permite ainda determinar o nível da obstrução biliar assim como a presença de atrofia hepáticas (Anderson *et al.*, 2004; Friman, 2011).

Podemos também recorrer à colangiopancreatografia por ressonância magnética nuclear (MRCP, do inglês *magnetic resonance cholangiopancreatography*) que é uma modalidade que utiliza a ressonância magnética nuclear para criar uma imagem tridimensional da árvore biliar, parênquima hepático e estruturas vasculares e é comparável à colangiopancreatografia retrógrada endoscópica na detecção de lesões malignas nas vias biliares. Uma vantagem da MRCP é que ela pode identificar o envolvimento luminal fornecendo uma melhor informação acerca do estágio em que o tumor se encontra. Esta classificação é de extrema importância principalmente na determinação da ressecabilidade do tumor (Anderson *et al.*, 2004; Friman, 2011).

Também a PET tem demonstrado uma grande sensibilidade no diagnóstico do colangiocarcinoma. No entanto, é de ter em conta que nos processos inflamatórios no tracto biliar, como acontece por exemplo nos doentes com CEP, a PET pode fornecer falsos positivos, o que limita a utilização desta metodologia. Esta técnica imagiológica continua, porém, a ser uma ferramenta de extrema importância na detecção de metastização à distância assim como de recorrência após ressecção (Anderson *et al.*, 2004; Friman, 2011).

Já foi referido anteriormente que a maioria dos casos de colangiocarcinoma é diagnosticada numa fase avançada da doença, num estágio onde este tipo de tumor é considerado devastador, em que o doente portador tem uma sobrevida média inferior a 24 meses. O prognóstico é mau e a sobrevida após 5 anos apresenta-se entre os 5% e os 10% (Anderson *et al.*, 2004; Goodman, 2007).

Os tratamentos cirúrgicos são os únicos que oferecem opções curativas, no entanto, devido ao diagnóstico tardio, não são aplicáveis à grande maioria dos doentes. De entre os tratamentos cirúrgicos, tal como no carcinoma hepatocelular, podemos falar em ressecção ou transplante hepático. A indicação para a ressecção cirúrgica do colangiocarcinoma é semelhante à do carcinoma hepatocelular, sendo objectivo efectuar uma excisão completa com margens negativas. Existem, no entanto, quatro factores que determinam a possibilidade de se efectuar uma

ressecção por hepatectomia parcial. São eles a extensão do tumor dentro da árvore biliar, a invasão vascular, a atrofia lobar hepática e a doença metastática. Embora a ressecção hepática seja, juntamente com o transplante, a única hipótese terapêutica que oferece potencialidades curativas, a taxa de sobrevivência após ressecção é considerada bem sucedida, apesar de se situar apenas entre os 25% e os 30%. O transplante hepático como alternativa terapêutica no colangiocarcinoma é alvo de alguma controvérsia, pois devido à elevada taxa de recorrência relatada por vários autores, diversas instituições abandonaram esta estratégia terapêutica para este tipo de tumor. Apesar disso têm sido descritos também alguns casos de sucesso (Anderson *et al.*, 2004; Friman, 2011).

Tendo em conta que a grande maioria dos colangiocarcinomas aquando do diagnóstico são considerados irresssecáveis, os doentes são submetidos a outras opções terapêuticas embora o sucesso das mesmas seja mínimo. A quimioterapia tem sido considerada apenas de forma paliativa em doentes com colangiocarcinoma irresssecável, doentes com recidiva do tumor e em doentes com colangiocarcinoma metastizado. Os citostáticos mais utilizados no tratamento de colangiocarcinoma são o 5-fluorouracilo e a gemcitabina quer isoladamente, quer em combinação com outros fármacos. Estes citostáticos têm sido associados a uma grande variedade de outros fármacos tais como a cisplatina, a oxaliplatina, o docetaxel, o paclitaxel, a mitomicina-C, a doxorubicina, a epirubicina e o interferão- α , no entanto, todas as combinações testadas até agora apresentaram baixas taxas de resposta e não existe, actualmente, nenhum estudo randomizado que demonstre um claro benefício de qualquer regime quimioterapêutico neste tipo de tumor. Quando se compara a sobrevida aos 5 anos dos doentes que foram submetidos apenas a tratamento cirúrgico ou a um protocolo de tratamento cirúrgico e quimioterapia adjuvante não se verificam diferenças significativas, o que torna urgente encontrar alternativas farmacológicas que auxiliem no tratamento deste tumor (Anderson *et al.*, 2004; Thongprasert, 2005; Blechacz & Gores, 2008).

A utilização da radioterapia, quer externa quer braquiterapia, no tratamento de colangiocarcinoma tem sido explorada sem se terem verificado benefícios. Apesar disto, existem alguns estudos que indicam que doentes com margens cirúrgicas positivas podem beneficiar de radioterapia adjuvante ao tratamento cirúrgico. No entanto, o papel desta modalidade terapêutica nos doentes ressecados com margens negativas é menos claro, existindo estudos que demonstram a não ocorrência de benefícios (Anderson *et al.*, 2004; Aljiffry, 2009; Friman, 2011). Apesar destes resultados decepcionantes, devido ao facto de após a ressecção cirúrgica o desenvolvimento de recorrência local ser frequente, muitos

autores têm defendido a utilização da radioterapia, quer isoladamente, quer em combinação com a quimioterapia (quimiorradioterapia), como estratégia de controlo local da doença (Anderson *et al.*, 2004; Aljiffry, 2009; Friman, 2011). Dado o potencial radiosensibilizador do 5-fluorouracilo, teoricamente, seria de se esperar que a utilização deste fármaco em combinação com a radioterapia fosse mais eficaz do que qualquer uma das abordagens terapêuticas isoladas. Porém, e embora não existam estudos randomizados desta associação terapêutica, a análise retrospectiva mostra não haver aumento da sobrevivência em comparação com a radioterapia isolada (Anderson *et al.*, 2004; Aljiffry, 2009; Friman, 2011).

Uma vez que a utilização das estratégias terapêuticas disponíveis tem demonstrado resultados totalmente desanimadores, é urgente e imperativa a busca de novas moléculas e novos alvos terapêuticos para combater o colangiocarcinoma. Alguns fármacos que actuam em vias de sinalização específicas e essenciais para a patogénese de colangiocarcinoma estão já aprovados para a utilização clínica em outros tipos de cancro. Entre eles incluem-se os inibidores dos EGFR (cetuximab, erlotinib e gefitinib), os inibidores da RAF-cinase (sorafenib), os inibidores dirigidos ao HER-2 (trastuzumab e lapatinib) e os inibidores dirigidos ao VEGF (sorafenib e bevacizumab). Existem já alguns ensaios clínicos que visam avaliar o efeito do celecoxib, um inibidor da COX-2 e dos inibidores dos receptores das tirosina cinases, sorafenib, erlotinib e bevacizumab isoladamente ou em combinação com outros fármacos no tratamento de colangiocarcinoma. Por outro lado, tem sido também ponderada uma outra estratégia que consiste na sensibilização das células de colangiocarcinoma à apoptose mediada pelo TRAIL, através da sub-regulação da MCL-1 utilizando, por exemplo, o sorafenib (Blechacz & Gores, 2008; Noel & Hezel, 2013). Estes são apenas alguns exemplos de tratamentos dirigidos que poderão ser aplicadas no tratamento deste tumor, e que merecem estudo mais aprofundado. É de salientar o papel promissor que o sorafenib parece apresentar por poder actuar em diversas vertentes simultaneamente, ou seja inibidor da RAF-cinase, do VEGFR, dos receptores de tirosina cinase e também indutor da apoptose mediada por TRAIL (Blechacz & Gores, 2008; Noel & Hezel, 2013).

Embora, na prática clínica, o sorafenib não seja utilizado no tratamento de colangiocarcinoma, existem estudos experimentais que indicam que este fármaco possui um papel bastante promissor no tratamento do colangiocarcinoma. Mutações na via de sinalização MAPK constituem uma das alterações genéticas mais comuns no colangiocarcinoma, estando presentes em cerca de 60% dos casos de tumores humanos. Dentro desta via de sinalização, as mutações na RAS estão descritas em cerca de 56% destas neoplasias e da B-RAF em cerca de 22%, o que

transforma o sorafenib numa arma terapêutica com futuro promissor no tratamento de colangiocarcinoma (Huether *et al.*, 2007).

De facto, já foram realizados estudos *in vitro* que enfatizam o potencial efeito do sorafenib na terapêutica de colangiocarcinoma. Em 2007 Huther e colaboradores demonstraram que este fármaco inibiu a proliferação celular de linhas celulares humanas de colangiocarcinoma de uma forma dependente do tempo e da dose. Esse efeito antiproliferativo encontra-se correlacionado com a indução da morte celular por apoptose e bloqueios no ciclo celular na fase G0/G1. Apesar de neste trabalho experimental não se terem conseguido tirar conclusões mais exactas acerca dos mecanismos através dos quais o sorafenib induziu o bloqueio do ciclo celular e a apoptose, havia já sido realizado em 2005 um outro estudo que obteve alguns resultados promissores. Neste estudo realizado em diversas linhas celulares tumorais verificou-se que nas células de colangiocarcinoma, ocorreu uma sub-regulação da proteína anti-apoptótica MCL-1 em resposta ao sorafenib (Yu *et al.*, 2005; Huether *et al.*, 2007).

Posteriormente, em 2011, Sugiyama e colaboradores testaram o sorafenib em 8 linhas celulares humanas de colangiocarcinoma e realizaram também estudos *in vivo*. Nos estudos *in vitro*, o tratamento com sorafenib conduziu à inibição da proliferação celular e indução de apoptose através da inibição da via de sinalização RAF/MEK/MAPK, da redução da fosforilação e da consequente activação da STAT3 (do inglês *signal transducer and activator of transcription 3*) e da sub-regulação da MCL-1. Nos estudos *in vivo*, os autores verificaram que a administração oral de sorafenib inibia significativamente o crescimento tumoral dos xenotransplantes heterotópicos (Sugiyama *et al.*, 2011).

Outros estudos *in vitro* demonstraram a existência de sinergia na utilização combinada de sorafenib com doxorrubicina e gemcitabina (Huether *et al.*, 2007; Pignochino *et al.*, 2010). Também em 2011 foi reportado um caso de um doente do sexo masculino de 70 anos diagnosticado com colangiocarcinoma intra-hepático irresssecável, sem indicação para qualquer outro regime terapêutico. O doente foi tratado com 400mg diárias de sorafenib, verificando-se que este tratamento conduziu a uma melhoria significativa dos sintomas, melhorias nos parâmetros da função hepática e uma diminuição nos níveis de marcadores tumorais. O doente iniciou a tratamento em Março de 2008 e em Março de 2010 continuava vivo (Pinter *et al.*, 2011).

Em 2013 foi publicado um outro caso de um doente com colangiocarcinoma diagnosticado aos 51 anos de idade. Após o diagnóstico o doente iniciou quimioterapia sistémica tendo sido testados vários regimes, GEMOX, capacitabina e 5-fluorouracilo, no entanto o colangiocarcinoma progredia. Recorreu-se então ao

sorafenib como agente de quarta linha conseguindo-se prolongar a vida do doente por mais quatro anos (Chakunta *et al.*, 2013).

Assim, e apesar da utilização de sorafenib para o tratamento de colangiocarcinoma não estar ainda aprovada, algumas as evidências indicam que a utilização deste fármaco no tratamento do colangiocarcinoma pode ter um futuro promissor.

Resistência multifármacos nos tumores primários do fígado

Os tumores primários do fígado são normalmente quimiorresistentes. Mas a que se deve essa resistência? São vários os mecanismos que podem tornar uma célula neoplásica resistente aos citostáticos, tais como alterações no metabolismo do fármaco, alterações nos mecanismos de reparação do ADN, existência de mecanismos de evasão à apoptose, alterações no microambiente tumoral, presença de células estaminais tumorais e a expressão de proteínas transmembranares de efluxo tais como as proteínas ABC ou as proteínas *Vault* (Gottesman *et al.*, 2002; Casalta-lobes *et al.*, 2011).

Podemos definir resistência multifármacos (MDR, do inglês *multidrug resistance*) como a capacidade que as células tumorais possuem em se tornarem resistentes a diferentes fármacos utilizados na quimioterapia. O aparecimento de MDR é actualmente um dos grandes entraves ao sucesso da quimioterapia. De entre os mecanismos enumerados, um dos mais estudados é a sobreexpressão de bombas de efluxo (proteínas ABC e proteínas *Vault*), que são um dos principais obstáculos ao sucesso da quimioterapia em vários tipos de cancro, incluindo os tumores primários do fígado (Izquierdo *et al.*, 1998; Gillet & Gottesman, 2010; Saraswathy & Gong, 2013).

A superfamília de transportadores ABC, uma família de transportadores dependentes de ATP (do inglês *adenosine triphosphate*), é responsável pelo transporte de uma ampla variedade de compostos através das membranas biológicas (Chen, 2012; Leslie *et al.*, 2005).

A glicoproteína-P (PGP, do inglês *P-glycoprotein*), o primeiro transportador ABC a ser identificado em humanos, é codificada pelos genes *MDR1* e *MDR3*. A PGP embora esteja expressa em vários tecidos normais, encontra-se anormalmente expressa, ou seja, sobreexpressa, numa ampla variedade de tecidos tumorais e está associada a um elevado grau de malignidade e de quimiorresistência. Com esta

característica, incluem-se os tumores primitivos do fígado tais como o carcinoma hepatocelular e o colangiocarcinoma (Shen *et al.*, 1991; Hospital *et al.*, 2007). A sobreexpressão de PGP em células tumorais pode ser inata ou adquirida após a exposição a citostáticos. Deste modo, a sobreexpressão está normalmente associada a resultados desanimadores da quimioterapia. São vários os autores que têm estudado o papel da PGP nos tumores primários do fígado, e resultados de imunohistoquímica indicam que 40% a 80% dos carcinomas hepatocelulares possuem uma expressão aumentada desta proteína e que a resposta à quimioterapia é inversamente proporcional à sua expressão (Isshiki *et al.*, 1993; Soini *et al.*, 1996; Chou *et al.*, 1997; Ng *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2007). Neste sentido, em 2002 Grudé e a sua equipa publicaram um estudo em que verificaram que a PGP está sobreexpressa em 85% dos carcinomas hepatocelulares, enfatizando o seu papel na resistência à quimioterapia. Os seus resultados demonstraram que a expressão de PGP é maior no tumor do que no tecido peritumoral e é também maior em tecido peritumoral cirrótico do que no tecido hepático normal. Os autores concluem ainda que a sobreexpressão de PGP nos casos do fígado cirrótico precede o desenvolvimento da carcinogénese (Grudé *et al.*, 2002).

É também sabido que a maioria dos casos de colangiocarcinoma expressam PGP, e ficou demonstrado que a sobreexpressão desta proteína induz resistência aos fármacos utilizados em quimioterapia, ou seja, também no colangiocarcinoma a resposta à quimioterapia está inversamente correlacionada com a expressão de PGP (Itsuno *et al.*, 1994; Seo *et al.*, 2008).

Também a sobreexpressão de MRP1 (do inglês *multidrug resistance-related protein 1*), uma outra proteína da família dos transportadores ABC, está associada a quimiorresistência nos tumores primários do fígado e conseqüente mau prognóstico. Sabe-se que a MRP1 confere resistência de uma forma bastante similar à PGP, com um mecanismo de transporte cinético semelhante, ou seja, a hidrólise do ATP fornece a energia necessária ao transporte através da MRP1 (Borst *et al.*, 1999; Zahreddine & Borden, 2013). No que diz respeito à expressão desta proteína em tumores primitivos do fígado, em 2002 Bonin e colaboradores, demonstraram que a MRP1 se encontra sobreexpressa de um modo similar no carcinoma hepatocelular e no tecido hepático peritumoral (Bonin *et al.*, 2002). Já em 2008 Vander Borgh e colaboradores verificaram que no carcinoma hepatocelular a expressão de MRP1 está associada com um fenótipo tumoral mais agressivo salientando o papel desta proteína na progressão tumoral (Vander Borgh *et al.*, 2008). Em relação ao colangiocarcinoma, num estudo de 2005 Tepsiri e colaboradores avaliaram, em cinco linhas celulares humanas de colangiocarcinoma, a expressão de vários genes envolvidos na resistência

multifármacos e verificaram que todas elas expressam MRP1 (Tepsiri *et al.*, 2005). Em suma, o perfil de expressão das proteínas ABC tais como a PGP e a MRP1 pode fornecer informação de extrema relevância para o diagnóstico e para o tratamento de tumores primários do fígado, auxiliando na escolha das terapêuticas a adotar.

Por sua vez, o mecanismo que correlaciona a expressão das proteínas *Vault* e a quimiorresistência nos tumores primários do fígado está bastante menos explorado do que o estudo das proteínas ABC, não existindo na literatura, referência à expressão destas proteínas no colangiocarcinoma. Contudo, no que diz respeito ao carcinoma hepatocelular, num estudo de 2004, Bailin e colaboradores demonstraram que a expressão do gene *LRP* (do inglês, *lung resistance-related protein*) está intimamente correlacionada com a expressão de MDR no carcinoma hepatocelular e envolvida no processo de desenvolvimento de resistência adquirida a fármacos. Estes autores verificaram ainda que a expressão deste gene se correlaciona com o grau de diferenciação tumoral e, segundo eles, a análise dos níveis de expressão deste gene e da proteína por ele codificada deverá ser tida em conta para classificar o tumor em termos de quimiorresistência e, conseqüentemente, ajudar na escolha da terapêutica a adotar (Bailin *et al.*, 2004).

Medicina nuclear e resistência multifármacos

Neste contexto, a classificação dos tumores primitivos do fígado em termos de expressão das proteínas MDR parece ser um passo crucial para definir e prever a resposta à quimioterapia destes tumores. Mas como classificar um tumor em termos de resistência aos citostáticos?

Actualmente, o método que é mais frequentemente utilizado para a quantificação da função deste tipo de proteínas envolve a Medicina Nuclear, através da quantificação das taxas de captação e de retenção de substratos radiomarcados como o ^{99m}Tc -MIBI. O ^{99m}Tc -MIBI é um radiofármaco desenvolvido para estudos de perfusão do miocárdio, a sua captação ocorre por difusão passiva devido ao potencial electroquímico transmembranar e o radiofármaco irá acumular-se na mitocôndria. Este traçador é catiónico e lipofílico, características comuns de vários substratos das bombas de efluxo. Tal como acontece com os substratos antineoplásicos, este radiotraçador ao ser captado pelas células tumorais interage com os domínios de ligação do transportador e é bombeado para o meio extracelular. Deste modo, o ^{99m}Tc -MIBI é utilizado na determinação da

actividade funcional da PGP (Casalta-Lopes *et al.*, 2011).

A inibição farmacológica destes transportadores é a principal estratégia para reverter este fenótipo resistente. Os fármacos utilizados podem ser substratos destes transportadores, modulando, deste modo, a sua actividade através da inibição competitiva, ou podem induzir alterações conformacionais nas proteínas de transporte, impedindo o reconhecimento do substrato ou a hidrólise de ATP. O verapamil, um bloqueador dos canais de cálcio, é considerado um inibidor de MDR de primeira geração e modula a actividade da PGP e da MRP1. Contudo, os inibidores de primeira geração necessitam de ser administrados em concentrações elevadas para exercerem a sua actividade moduladora, originando graves problemas de toxicidade. Apesar disso, são bastante úteis em estudos *in vitro* no estabelecimento das vias de sinalização envolvidas na MDR. Com o objectivo de reduzir a toxicidade e de aumentar a eficácia, foram desenvolvidos outros moduladores, e existem actualmente moduladores de segunda e de terceira geração (Casalta-Lopes *et al.*, 2011). Uma outra estratégia para inibir funcionalmente as bombas de efluxo é a depleção de substratos essenciais para o seu funcionamento. Um exemplo desses fármacos é a L-butionina-sulfoximina (BSO), um inibidor da γ -glutamylcisteína sintetase que, por sua vez, é uma enzima chave na síntese de glutathione. Assim, ao reduzir as concentrações intracelulares de glutathione induz-se uma menor actividade da bomba de efluxo dependente da glutathione, ou seja, da MRP1 (Casalta-Lopes *et al.*, 2011).

Apesar de todo o conhecimento já adquirido, e de todos os esforços que têm sido desenvolvidos neste âmbito, de facto, a determinação e a caracterização de um tumor em termos de resistência aos citostáticos, assim como a utilização de estratégias que revertam o fenótipo MDR continuam a ser um obstáculo por ultrapassar.

Glicólise, efeito Warburg e cancro: da base molecular à utilização do ^{18}F -FDG

A glicólise consiste numa sequência de reacções enzimáticas que ocorrem no citoplasma das células, onde uma molécula de glicose (que possui seis carbonos) é clivada e transformada, originando duas moléculas de piruvato (com três carbonos) e duas moléculas de ATP. Estão envolvidas na glicólise cerca de uma dezena de enzimas, actuando através da catálise de reacções de fosforilação e

desfosforilação, isomerização, clivagem aldólica, reacções de oxidação-redução e desidratação. Por sua vez, o piruvato, resultante deste conjunto de reacções, pode ser catabolizado aerobiamente no complexo piruvato desidrogenase e no ciclo do ácido cítrico, produzindo moléculas transportadoras de electões (NADH+H⁺ e FADH₂) que permitem a produção de grandes quantidades de ATP, a nível da cadeia transportadora de electrões e a fosforilação oxidativa. Deste modo, dá-se a oxidação da glicose com produção de CO₂, H₂O e ATP (Evans *et al.*, 2008; Amann & Hellerbrand, 2009; Amann *et al.*, 2009).

A elevada taxa de glicólise e o conseqüente aumento do consumo de glicose são características presentes na grande maioria das células tumorais. De facto, uma das alterações metabólicas mais importantes das células cancerígenas é o chamado efeito Warburg que nada mais é que o aumento da glicólise aeróbia e a dependência da síntese de ATP pela via glicolítica pelas células neoplásicas. No fundo, aquilo que foi descrito por Warburg foi que a transformação neoplásica tem por conseqüência danos irreversíveis ao nível da respiração mitocondrial e, duas características fundamentais desta teoria são o aumento do consumo de glicose e a redução da fosforilação oxidativa, acompanhadas da produção de lactato. Deste modo, as células são obrigadas a recorrer a um modo de síntese de ATP mais primitivo, ou seja, a glicólise. No entanto, a reduzida produção energética da glicólise implica que as células tumorais têm de adoptar um mecanismo que lhes permita aumentar a captação de glicose de forma a atender às suas necessidades energéticas (Evans *et al.*, 2008; Hsu & Sabatini, 2008; Amann *et al.*, 2009; Amann & Hellerbrand, 2009; Nakajima & Van Houten, 2013).

Ao que tudo indica, a glicólise aeróbia é um mecanismo adaptativo que envolve a coordenação de diversas vias metabólicas, o que vai permitir manter as características fenotípicas das células tumorais tais como a capacidade de metastização, a evasão à apoptose e a capacidade de sobreviver em condições de hipoxia. É ainda possível verificar que existem diversos factores que influenciam todas as alterações características do efeito Warburg. Dentro destes podemos incluir a alteração da expressão de diferentes proteínas e/ou genes, tendo especial ênfase o aumento da expressão dos transportadores de glicose (GLUTs, do inglês *glucose transporters*). Assim, a ocorrência de alterações na expressão e na actividade destes transportadores durante a carcinogénese é normalmente correlacionada com a elevada necessidade de glicose pelas células cancerígenas (Kondoh, 2008; Amann & Hellerbrand, 2009; Amann *et al.*, 2009; Mathupala *et al.*, 2012).

A constatação, inicialmente descrita por Warburg, que alguns tumores possuem elevados índices de captação de glicose em relação aos tecidos normais

forneceu a base bioquímica para a utilização do ^{18}F -FDG na tomografia por emissão de positrões (Rajagopalan & DeBerardinis, 2012).

O princípio em que se baseia a utilização deste radiofármaco consiste na sua acumulação significativamente maior nas células tumorais do que nas células normais circundantes. A molécula de ^{18}F -FDG para entrar na célula utiliza os mesmos mecanismos da molécula de glicose, ou seja, é transportada pelos GLUTs. Originalmente, o GLUT-1 (*glucose transporter-1*) e o GLUT-3 foram identificados como os principais responsáveis pelo transporte deste radiofármaco para o interior da célula neoplásica, tendo por base o princípio que estes se encontram sobreexpressos na maioria das células tumorais. Contudo, mais recentemente tem sido destacado o papel de outras isoformas destes transportadores neste processo, nomeadamente os GLUTs -5 e -12, em particular nas células de cancro da mama (Jadvar *et al.*, 2009; Suzawa *et al.*, 2011).

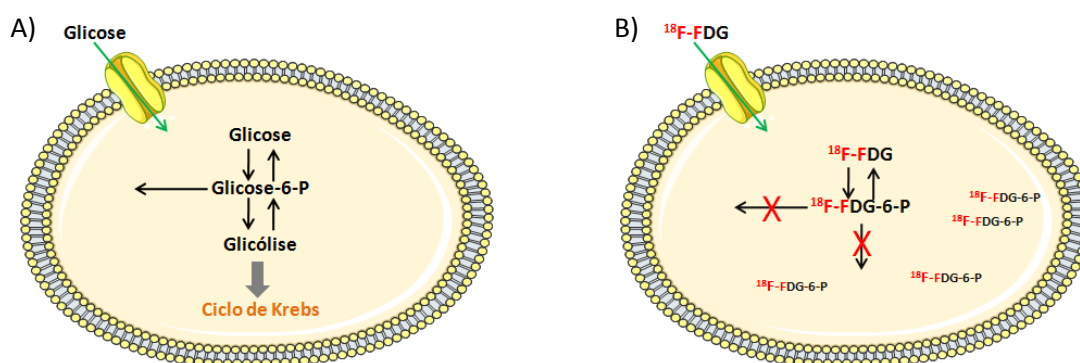


Figura 6: Representação esquemática do metabolismo da glicose (A) e do ^{18}F -FDG (B). Tal como a glicose, o ^{18}F -FDG entra na célula pelos transportadores de glicose, o radiofármaco é reconhecido na via da glicólise e é fosforilado pela hexocinase a ^{18}F -FDG-6-P, contudo, ao contrário da glicose não prossegue no metabolismo.

Deste modo, apesar do ^{18}F -FDG apenas sofrer as duas primeiras etapas do metabolismo da glicose, ou seja o transporte pelos GLUTs e a fosforilação pela hexocinase, as taxas de captação deste radiofármaco reflectem a utilização de glicose pelas células tumorais (Buerkle & Weber, 2008).

Apesar de o ^{18}F -FDG entrar nas células neoplásicas através dos GLUTs, tal como a glicose, nos passos subsequentes o seu metabolismo não é similar no seu todo. Uma vez no interior da célula, tanto a molécula de glicose como a de ^{18}F -FDG são fosforiladas pela hexocinase dando origem, respectivamente, à glicose-6-fosfato e à ^{18}F -FDG-6-fosfato. A glicose continua o seu processo metabólico formando a frutose-1,6-bifosfato e entra na glicólise, por sua vez, a ^{18}F -FDG-6-fosfato não é metabolizada na via glicolítica, uma vez que o átomo de flúor na

posição C₂ impede a degradação da molécula. Assim, e uma vez que a membrana celular é praticamente impermeável à molécula ¹⁸F-FDG-6-fosfato, esta fica retida de forma estável no interior das células metabolicamente activas (Figura 6) (Buerkle & Weber, 2008).

Anteriormente foram abordados os mecanismos que levam determinados tumores, entre os quais os tumores primários do fígado, a serem quimiorresistentes. Mas existirá alguma correlação entre estes mecanismos envolvidos na resistência a fármacos e a captação e a retenção de ¹⁸F-FDG? Estudos recentes indicam que a expressão de bombas de efluxo está intimamente ligada com a quantidade de ¹⁸F-FDG acumulado dentro das células neoplásicas. Mais precisamente no carcinoma hepatocelular, estudos revelaram que a retenção de ¹⁸F-FDG pelas células está inversamente correlacionada com os níveis de expressão de PGP, na medida em que, nos tumores com elevada expressão desta bomba de efluxo se verifica uma redução da acumulação de ¹⁸F-FDG, comparado com tumores que não sobreexpressam esta proteína. Tais factos revelam que a PGP actua como uma bomba de efluxo para o ¹⁸F-FDG, ou seja, por outras palavras, o ¹⁸F-FDG é substrato para a PGP, estando a retenção deste radiofármaco diminuída em células de carcinoma hepatocelular que sobreexpressem esta proteína. De modo similar, em 2008, os mesmos autores verificaram que também no colangiocarcinoma a retenção de ¹⁸F-FDG é inversamente proporcional à expressão de PGP (Seo *et al.*, 2007, 2008, 2009). Estes dados vêm demonstrar que a utilização do ¹⁸F-FDG para diagnóstico de tumores pode ser útil não apenas no sentido de identificar uma lesão neoplásica com elevada taxa glicolítica, mas também porque poderá fornecer alguma informação acerca da genética tumoral, auxiliando na escolha da terapêutica a adoptar.

Transportador de glicose 1 e cancro

O primeiro transportador de glicose a ser descoberto foi o GLUT-1. Actualmente sabe-se que este transportador se encontra presente em quase todos os tecidos, variando a sua expressão entre eles. Geralmente assume-se que a expressão se correlaciona com a taxa do metabolismo da glicose celular. No entanto, e apesar de estar presente na grande maioria dos tecidos normais, actualmente sabe-se que está sobreexpresso numa ampla variedade de neoplasias (Amann & Hellerbrand, 2009).

O GLUT-1, tal como o nome indica, transporta glicose e fá-lo de acordo com uma constante de Michaelis (K_m) de aproximadamente 3 mM, e para além da glicose também transporta outros substratos tais como a galactose (K_m de 30 mM), a manose (K_m de 11 mM) e a glucosamina (K_m de 2,1 mM) (Amann & Hellerbrand, 2009; Amann *et al.*, 2009).

O gene do *GLUT-1* localiza-se no braço curto do cromossoma 1 na região p35-p31.3 e é composto por cerca de 35 mil pares de bases distribuídos por 10 exões. Por sua vez, a proteína de transporte GLUT-1 encontra-se glicosilada, existindo uma forma mais glicosilada (55 kDa), e uma forma menos glicosilada (45 kDa). Este transportador apresenta um modelo conformacional com 12 domínios transmembranares (α hélices transmembranares) com terminais amina e carboxílicos citosólicos. Para além disso é uma proteína de ligação nucleotídica com três domínios de ligação a ATP, situando-se dois no folheto interno da membrana celular e um no folheto externo (Figura 7). Estes domínios são bastante importantes para a sua conformação e afinidade, uma vez que a glicose é retida pelos domínios citosólicos do GLUT-1, após ocorrer ligação de ATP nos mesmos. Sabe-se que o mecanismo de activação deste transportador é dependente do pH, podendo ser esta a justificação para o facto de níveis reduzidos de ATP conduzirem à activação do GLUT-1 em condições de hipoxia (Amann & Hellerbrand, 2009; Amann *et al.*, 2009).

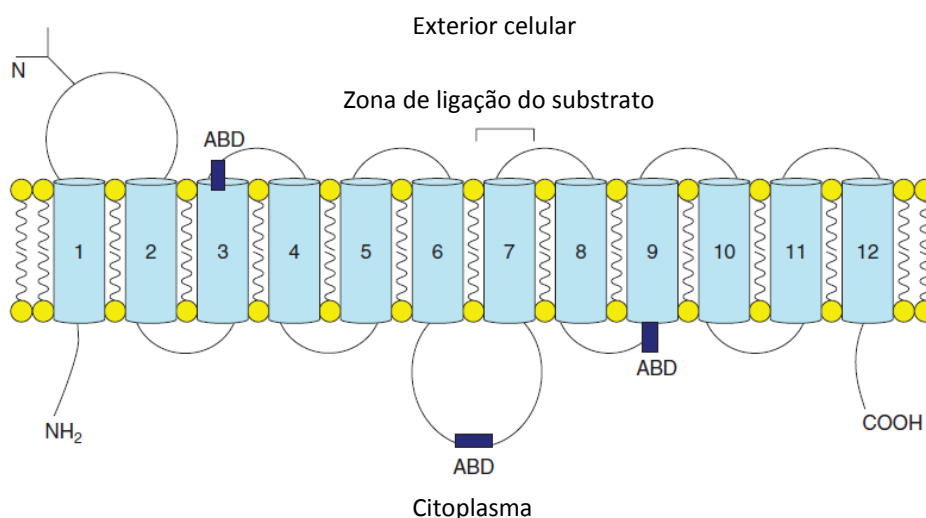


Figura 7: Modelo esquemático da orientação do GLUT-1 na membrana celular. Os domínios transmembranares estão numerados de 1 a 12. N representa o local de glicosilação e ABD os domínios de ligação do ATP. Adaptado de (Amann & Hellerbrand, 2009).

Tal como referido no sub-capítulo anterior, a elevada taxa de expressão dos transportadores de glicose nas células tumorais é, pelo menos em parte, consequência do efeito Warburg e ocorre de forma a fornecer à célula neoplásica a glicose requerida pelo seu elevado metabolismo glicolítico. Mas será apenas isto?

Ao que tudo indica, a sobreexpressão destes transportadores, e em especial a expressão do GLUT-1, traduz mais informação do que apenas o elevado índice metabólico da célula. De facto, existem autores que defendem que o GLUT-1 actua como um oncogene numa ampla variedade de tumores. Neste sentido, estudos indicam que a sobreexpressão de GLUT-1 está presente em abundância numa ampla variedade de tumores sólidos, conferindo-lhes, na maioria das vezes, um mau prognóstico (Evans *et al.*, 2008; Amann & Hellerbrand, 2009; Amann *et al.*, 2009; Furuta *et al.*, 2010). Deste modo, parece que na célula neoplásica, este transportador possui um papel que vai para além do efeito Warburg, o que sugere que existe um mecanismo pró-carcinogénico por detrás dos seus elevados níveis de expressão (Evans *et al.*, 2008).

De entre os tumores onde se tem verificado a elevada taxa de expressão deste transportador incluem-se os tumores da mama, do esófago, do cérebro, do rim, do pulmão, do cólon, do recto, do ovário e do colo do útero (Macheda *et al.*, 2005).

Já em 1998 Grover-McKay e colaboradores ao determinarem o potencial invasivo de três linhas celulares humanas de cancro da mama verificaram que o mesmo aumentava com o acréscimo da expressão proteica de GLUT-1. Sabe-se agora, que neste tipo de cancro a sobreexpressão de GLUT-1 está directamente correlacionada com o grau do tumor e com a sua capacidade proliferativa, sendo este transportador considerado um marcador de elevada agressividade e mau prognóstico (Macheda *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2013).

Outros autores demonstraram ainda que existe uma ligação entre a expressão de GLUT-1 e a resistência à quimioterapia, mais precisamente com a resistência à apoptose. Deste modo, uma estratégia que combine inibidores deste transportador e fármacos utilizados em quimioterapia convencional pode fornecer uma nova opção terapêutica que consiga reverter a resistência que estes tumores apresentam aos fármacos citotóxicos comumente utilizados em quimioterapia (Evans *et al.*, 2008; Amann & Hellerbrand, 2009; Amann *et al.*, 2009).

A nível molecular, é de salientar ainda o facto da expressão de GLUT-1, entre tumores do mesmo tipo e células tumorais do mesmo órgão, ser dependente de outros factores tais como a expressão e a transformação de oncogenes como o H-RAS e o c-MYC ou seja, a expressão deste transportador pelas células tumorais não é unicamente dependente do órgão onde a neoplasia se origina, mas também

das alterações moleculares subjacentes. Para além da acção dos oncogenes referenciados, é também sabido que alguns genes e proteínas envolvidos na tumorigénese induzem a transcrição do gene *GLUT-1* e promovem a expressão membranar do transportador GLUT-1. É o caso do EGFR, do AKT, da RAF e do SRC. Também a perda de função da proteína P53 induz a transcrição do GLUT-1. O papel que o GLUT-1 possui na oncogénese é, pois, complexo, envolvendo múltiplos genes e vias de sinalização, e os mecanismos através dos quais as células tumorais induzem a sobreexpressão de GLUT-1 sugerem que este transportador merece uma investigação mais aprofundada enquanto alvo terapêutico (Evans *et al.*, 2008; Young *et al.*, 2011).

A expressão elevada deste transportador de glicose é uma característica de vários tipos de tumores sólidos, e o fígado não é excepção. Este órgão está intimamente relacionado com o metabolismo do glicogénio e alguns trabalhos sugerem que a expressão deste transportador pode estar alterada nos tumores primitivos do fígado. De facto, alguns estudos experimentais indicam que o GLUT-1 se encontra sobreexpresso no carcinoma hepatocelular, promovendo a tumorigénese. Em 2001 Chen e a sua equipa verificaram que a inibição do GLUT-1, utilizando um oligonucleótido antisense, diminuiu a capacidade proliferativa em 50% de uma linha celular humana de carcinoma hepatocelular (Chen *et al.*, 2002). Já em 2009, Amman e seus colaboradores demonstraram, que através da supressão da expressão deste transportador com recurso a pequenos RNA de interferência (siRNA, do inglês *small interfering RNA*) se consegue reduzir significativamente a tumorigénese em culturas celulares de carcinoma hepatocelular. Assim, estes dados sugerem que o GLUT-1 pode desempenhar um papel directo na oncogénese do carcinoma hepatocelular, podendo constituir um alvo terapêutico promissor para este tipo de tumor altamente agressivo (Evans *et al.*, 2008; Amann & Hellerbrand, 2009; Amann *et al.*, 2009).

Em relação ao colangiocarcinoma, dentro desta temática pouco ou nada se sabe, contudo, existem alguns estudos que indicam que a expressão de GLUT-1 neste tipo de tumor é mais elevada do que no carcinoma hepatocelular. Apesar disso, nada se sabe ainda acerca do potencial tumorigénico do GLUT-1 no colangiocarcinoma. Neste sentido torna-se imperativo o estudo deste transportador como um possível alvo terapêutico também no colangiocarcinoma (Zimmerman *et al.*, 2002).

Tendo em conta os dados anteriormente descritos, têm sido testadas várias estratégias para reduzir a tumorigénese, através da inibição do GLUT-1 ou da glicólise em geral. É neste sentido que têm sido testados, *in vitro* e *in vivo* diversos análogos da glicose de modo a comprometer a glicólise. O principal exemplo, e

talvez o mais estudado, é sem dúvida a 2-Desoxiglicose (2-DG), um análogo da glicose amplamente conhecido por ser um inibidor competitivo do metabolismo da glicose (Aft *et al.*, 2002; Pelicano *et al.*, 2006). Após a sua entrada na célula, a 2-DG é fosforilada pela hexocinase a 2-DG-P, no entanto, e ao contrário da glicose-6-fosfato (G-6-P), aquela não é depois metabolizada pela fosfoexose-isomerase, ficando retida no interior da célula e conduzindo à inibição da glicólise. Por sua vez, a inibição da glicólise produz uma depleção do ATP celular o que conduz a um bloqueio na progressão do ciclo celular e, conseqüente, morte celular (Pelicano *et al.*, 2006).

As abordagens terapêuticas com 2-DG conduzem a uma inibição não específica da glicólise e, por conseguinte, existe o risco de ocorrer toxicidade também para o tecido normal. Estes factos conduzem à necessidade de desenvolver, para uso terapêutico, um método capaz de inibir especificamente o GLUT-1. A inibição da expressão ou da função deste transportador, ao invés de inibir o metabolismo da glicose na sua totalidade, é desejável para a terapia do cancro (Pelicano *et al.*, 2006; Amann & Hellerbrand, 2009). Neste sentido têm sido desenvolvidas algumas estratégias que afectam especificamente a expressão deste transportador.

Uma técnica que tem merecido especial atenção é a utilização dos chamados RNA de interferência ou, como alternativa, os shRNA (do inglês *small hairpin RNA* ou *short hairpin RNA*). Demonstrou-se por exemplo, num modelo de ratinho nu/nu que a supressão de ARNm (ARN mensageiro) de GLUT1 resultou numa diminuição da tumorigenicidade de uma linha celular de cancro gástrico humano (Noguchi *et al.*, 2000; Al-Khalili *et al.*, 2003).

De modo semelhante, em 2011 Young e colaboradores transfectaram linhas celulares de cancro de mama de rato de duas formas distintas. Por um lado suprimiram a expressão de GLUT-1 e por outro induziram a sobreexpressão do mesmo. Ao injectarem as linhas celulares em ratinhos verificaram que os animais injectados com as linhas celulares que sobreexpressavam GLUT-1 desenvolveram tumor muito mais rapidamente do que aqueles que foram injectados com a linha celular parental. Por outro lado, e de modo inverso, o desenvolvimento do tumor nos ratinhos injectados com as linhas celulares em que o GLUT-1 se encontrava silenciado ocorreu de um modo mais lento do que nos animais injectados com a linha celular mãe (Young *et al.*, 2011).

Já em 2013 foi publicado um estudo em que também foi efectuada a depleção do GLUT-1, desta vez em linhas celulares de carcinoma oral de células escamosas, tendo-se verificado que a depleção deste transportador induziu sensibilidade ao tratamento com cisplatina (Shimanishi *et al.*, 2013).

Também em 2013, Li e colaboradores verificaram, em duas linhas celulares de carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço que o silenciamento do GLUT-1 diminuiu a viabilidade celular, reduziu a capacidade de formação de colónias e promoveu a apoptose. Os mesmos autores verificaram, *in vivo*, que a inibição do GLUT-1 induziu uma diminuição do volume dos xenotransplantes e promoveu a sobrevivência dos animais. Por outro lado, a sobreexpressão deste transportador promoveu a viabilidade celular e inibiu a apoptose através da activação do NF- κ B, sugerindo que, neste tipo de cancro, o efeito do GLUT-1 na resistência às terapêuticas poderá estar correlacionado com esta via de sinalização. No mesmo trabalho, os autores estudaram ainda a possível correlação entre a expressão de GLUT-1 e a resistência à cisplatina, e verificaram que as células que mais expressavam GLUT-1, quer a nível proteico quer a nível de mRNA, apresentam maior resistência a este fármaco do que as células parentais (Li *et al.*, 2013).

No carcinoma hepatocelular e no estudo de Amann e colaboradores já anteriormente referenciado, demonstrou-se que a supressão da expressão de GLUT-1, com recurso a siRNA, para além de reduzir significativamente o crescimento celular, induziu também uma diminuição no potencial de migração celular, da captação de glicose e da secreção de lactato. É neste sentido que o crescente progresso nas técnicas de terapia génica, onde se inclui a utilização de siRNA e shRNA, introduz alguma esperança na possível utilização destas estratégias na luta contra o cancro, uma vez que nos dias de hoje a utilização de siRNAs contra vários genes alvo já está em ensaios clínicos de fase III (Shen *et al.*, 2006; Amann *et al.*, 2009; Castanotto & Rossi, 2009).

Em 2007 Rastogi e colaboradores efectuaram um estudo em que a estratégia de inibição do transportador GLUT-1 foi diferente, mas no entanto obtiveram-se, de igual modo, resultados promissores. Assim, testaram anticorpos anti-GLUT-1 em linhas celulares de cancro da mama e de cancro de pulmão, quer isoladamente quer em combinação com cisplatina, paclitaxel ou getifinib. Os resultados demonstraram que o tratamento com os anticorpos inibiu a proliferação celular e, para além disso, potenciou o efeito dos fármacos testados (Rastogi *et al.*, 2007).

Para além das estratégias mencionadas, o desenvolvimento de novos fármacos que alterem a funcionalidade do GLUT-1 parece ser também um método favorável ao tratamento do cancro e, em particular, de tumores primários do fígado. Deste modo, em paralelo, tem sido também alvo de estudo a utilização de moléculas que são consideradas como possíveis inibidores deste transportador. De facto, existem algumas moléculas que mostram alguma actividade nesse sentido,

com maior ou menor sucesso ou especificidade (Amann & Hellerbrand, 2009).

Como foi referido anteriormente, o GLUT-1 possui três locais de ligação de ATP que são críticos para a sua conformação e afinidade. Ao que tudo indica, estes locais podem ser alvos promissores para estratégias farmacológicas resultando no bloqueio do GLUT-1. Na natureza existem moléculas capazes de induzir este efeito, tais como os flavonóides como a genisteína e a quercetina que são capazes de inibir as tirosina-cinases de ligação de ATP e, deste modo, induzir a inibição do GLUT-1. Para além dos compostos naturais da família dos flavonóides, existem outros sintéticos tais como as tirfostinas que são capazes de interagir, através do mesmo mecanismo, com o GLUT-1 (Vera *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2003).

Alguns anti-convulsivantes como o diazepam são também considerados inibidores da função deste transportador, existindo estudos *in vitro* que demonstram que são capazes de diminuir a actividade intrínseca do GLUT-1 (Evans *et al.*, 2008). Outro composto que tem demonstrado um grande potencial nesta área é o gossipol, um composto natural extraído da planta do algodão. Existem alguns estudos que indicam o potencial efeito inibitório do gossipol no transporte de hexoses, sendo o seu efeito específico para o transportador de glicose 1. O gossipol comporta-se então como um inibidor competitivo do GLUT-1, ligando-se a um local acessível da face interna deste transportador (Pérez *et al.*, 2009).

Embora seja reconhecida a sua elevadíssima importância, estas moléculas não podem ser consideradas como sendo específicas para o GLUT-1 mas, apesar disso, permitem-nos estudar o efeito das diversas formas de inibição induzidas pelas mesmas na célula oncológica. Associadamente, a partir destas moléculas ‘mãe’ poderão vir a ser desenvolvidas outras com pequenas alterações que lhes permitam aumentar a sua especificidade.

Flavonóides

O efeito antitumoral dos flavonóides tem sido objecto de estudo de diversos autores nas últimas décadas, e as principais ilações a retirar são que estes compostos conseguem induzir a apoptose e inibir o crescimento celular numa ampla variedade de células tumorais (Seufi *et al.*, 2009).

Os flavonóides são compostos naturais polifenólicos presentes nas frutas, verduras e bebidas. A sua estrutura primária consiste em dois grupos de carbono

aromático, o benzopirano (anéis A e C) e o benzeno (anel B). É a variação no anel C heterocíclico dos flavonóides e a interligação entre os grupos benzopirano e benzeno que constitui a base para a classificação destes compostos em flavonas, flavonóis, flavononas, isoflavonas, antocianidinas e catequinas (Park, 1999; Nomura *et al.*, 2008). A estrutura básica dos flavonóides assim como as suas diferentes classificações estão representadas nas figuras 8 e 9.

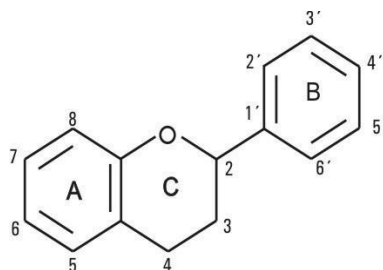


Figura 8: Estrutura básica dos flavonóides, composta por anéis benzopireno (A e C) e benzeno (anel B).

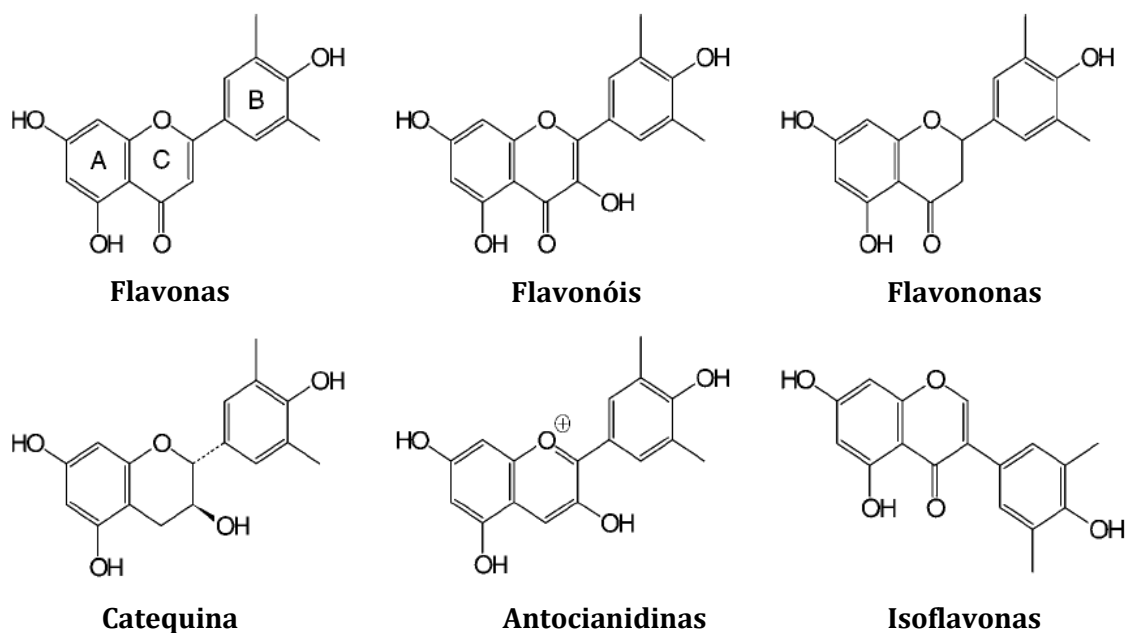


Figura 9: Classificação das subclasses dos flavonóides em relação às variações no anel C heterocíclico.

Os flavonóides apresentam diversos efeitos biológicos na saúde humana. Através de estudos *in vitro*, eles foram descritos como sendo redutores da oxidação

das lipoproteínas de baixa densidade (LDL, do inglês *low density lipoprotein*), indutores e inibidores de enzimas e indutores da eliminação de espécies reactivas de oxigénio, diminuindo, por consequência, o risco de doenças crónicas, tais como o cancro e as doenças cardiovasculares. Para além disso, alguns autores demonstraram que os flavonóides, em especial os flavonóis e as agliconas (classe das isoflavonas), inibem a captação de glicose. De facto, alguns estudos demonstraram que os flavonóides podem ser utilizados *in vitro* como bloqueadores da captação de glicose (Park, 1999).

Ainda dentro das actividades biológicas, os flavonóides possuem outras características tais como actividade anti-inflamatória, antibacteriana e a sua capacidade dual de actuar enquanto antioxidantes ou pró-oxidantes. Todas as suas acções biológicas são resultado de alterações na actividade de diferentes enzimas intracelulares tais como as tirosinas cinases, a proteína cinase C (PKC, do inglês *protein kinase C*), a fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K, do inglês *phosphoinositide 3-kinase*) e as MAPK. Para além disso, estudos indicaram que estes compostos são capazes de alterar a captação de glicose estimulada por insulina através da modulação do receptor de tirosina cinase e/ou através da actividade da PI3K em células do músculo ou do tecido adiposo (Park, 1999; Adebamowo et al., 2005; Ferraresi et al., 2005; Nomura et al., 2008).

Em relação aos flavonóis, a sua estrutura química permite-lhes actuar enquanto compostos anti-tumorais, através da eliminação de radicais livres, prevenindo os danos celulares oxidativos da activação das fases I e II dos sistemas enzimáticos de desintoxicação, o que permite estimular a apoptose através da toxicidade mitocondrial assim como, do colapso do potencial da membrana mitocondrial. Em consequência, a regulação dos sistemas de transdução de sinal conduzem à formação de radicais livres na presença de peroxidases que, por sua vez, induzem a fragmentação do ADN com estimulação da resposta imunitária à transformação maligna, modulando as vias das hormonas esteróides e inibindo a angiogénese (Park, 1999; Adebamowo *et al.*, 2005).

A nível fisiológico, existem diversas outras acções que esta subclasse dos flavonóides possui. Como já foi referido anteriormente, sabe-se que os flavonóis e as isoflavonas são potentes inibidores do influxo de glicose, mas qual o mecanismo por detrás desta propriedade? A acção destas substâncias enquanto inibidores do GLUT-1 tem vindo a ser amplamente estudada, uma vez que os domínios de ligação de ATP deste transportador, essenciais para a sua conformação e afinidade, parecem ser um possível alvo para estratégias farmacológicas que resultam no bloqueio do GLUT-1. Actualmente, tem-se demonstrado que os flavonóides tais como a quercetina e a genisteína inibem as tirosinas cinases da ligação de ATP,

sendo capazes de inibir o GLUT-1 através deste mecanismo (Martin *et al.*, 2003; Amann & Hellerbrand, 2009).

Dentro dos flavonóides presentes na dieta humana, a quercetina é um dos mais importantes. A quercetina [2-phenyl4H-1-benzopyran4-one,2-phenylchromone] é um flavonóide bioactivo do tipo flavonol, ubiquamente presente em frutas e legumes tais como maçãs, frutos vermelhos, cebola e chá. Este flavonóide apresenta efeitos vasodilatadores, anti-inflamatórios e anti/pró-oxidantes, tendo vindo a ser proposto como um possível composto anticancerígeno. A nível epidemiológico, estima-se que na Europa e na Ásia ocorre uma ingestão diária entre 4 a 68 mg de quercetina por cada indivíduo (Ferraresi *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2010).

A fórmula empírica da quercetina é $C_{15}H_{10}O_7$, possuindo um peso molecular de 302,24 g/mol. Na dieta, a quercetina está presente maioritariamente sob a forma de um glicosídeo no qual um ou mais grupos açúcar estão associados aos grupos fenólicos por ligação glicosídea (Chen *et al.*, 2010).

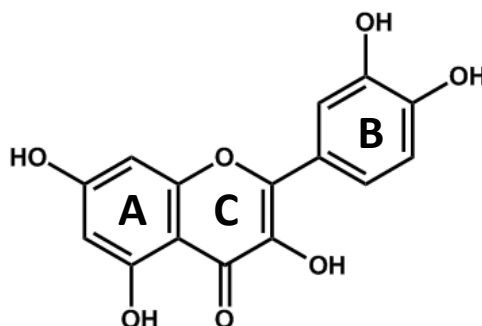


Figura 10: Estrutura molecular da quercetina

Até à data, não se encontra ainda perfeitamente caracterizada a farmacocinética da quercetina, embora já tenham sido realizados diversos estudos em animais e em humanos. Sabe-se porém, que os flavonóides glicosilados provenientes da dieta atravessam o intestino delgado, são hidrolisados a agliconas por enterobactérias no cego e no cólon e são posteriormente absorvidos pelas células epiteliais do cólon por difusão simples dependente da lipofilicidade. Os glicosídeos de quercetina podem também ser directamente absorvidos através do GLUT-1 dependente de sódio (SGLT-1) ou excretado para o lúmen intestinal através da proteína associada à resistência multifármacos 2 (MRP2, do inglês *multidrug resistance-associated protein 2*). Após a sua absorção, os glicosídeos de

quercetina são muitas vezes hidrolisados por β -glucosidases intracelulares. Depois de ser absorvida pelo lúmen intestinal, a quercetina é na sua maioria convertida em metabolitos conjugados antes de entrar em circulação sendo os principais, presentes no plasma humano, a quercetina 3'-O β -D-glucuronido (Q3'GA) e a quercetina 4'-O β -D-glucuronido (Q4'GA) (Akiyama *et al.*, 1987; Chen *et al.*, 2010).

Em relação à sua biodistribuição, Chen e seus colaboradores demonstraram que a quercetina se concentra nos pulmões, testículos, rins, timo, coração e fígado, com elevadas concentrações desta e dos seus derivados metilados no tecido pulmonar. Em termos de excreção, a via urinária não é uma das principais vias em humanos e em ratos, sendo uma parte dos seus metabolitos excretada pela bÍlis. Para além disso, a quercetina pode sofrer degradação microbiana no cólon com formação de ácidos fenólicos e CO₂ que é posteriormente exalado pela respiração (Chen *et al.*, 2010).

No âmbito deste trabalho, é de extrema importância realçar as propriedades anticancerígenas da quercetina. Vários estudos realizados *in vitro* indicam que este composto possui actividades anticancerígenas em vários tipos de células tumorais, o que poderá estar directamente relacionado com as suas propriedades anti/pró-oxidantes e anti-inflamatórias, assim como a outros mecanismos de acção menos explorados. É sabido que a quercetina pode retardar o crescimento de células tumorais ajudando a promover a apoptose, tornando este flavonol um composto promissor na prevenção e no tratamento do cancro (Kim *et al.*, 2008; Seufi *et al.*, 2009; Russo *et al.*, 2012).

Em termos moleculares, tem sido demonstrado que a quercetina possui a capacidade de inibir diversas enzimas envolvidas na proliferação celular e nas vias de transdução de sinal tais como a PKC, a tirosina cinase, a PI3K, a fosfatase cdc25, a proteína cinase B fosforilada (p-AKT), a DNA topoisomerase II e a cinase N-terminal c-Jun (JNK, do inglês *c-Jun N-terminal kinases*). Para além das mencionadas, a quercetina possui uma ampla variedade de outras actividades biológicas como possuir a capacidade de inibir a expressão da P53 mutada, assim como a função de expressão do receptor de androgénios como foi demonstrado num estudo realizado com células tumorais da próstata. Também em tumores do pâncreas se demonstrou a sua capacidade de bloquear a actividade de tirosina cinase do EGFR (Nöthlings *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2008).

Por outro lado, é sabido também que o tratamento com quercetina provoca bloqueio nas fases G1 ou G2/M do ciclo celular em diversos tipos de células. Como explicar este facto? Sabe-se que, em resposta à quercetina, a survivina, um membro da família de inibidores de genes pró-apoptóticos, é expressa de forma variada no ciclo celular, aumentando na fase G2/M e diminuindo posteriormente na fase G1.

Por seu turno, a expressão de survivina é regulada pelo tratamento com quercetina, através da activação da ERK por desacetilação da histona H3, onde a quercetina activa a enzima desacetilase histona que, por sua vez, reduz a acetilação da histona H3 (Kim et al., 2008; Nomura *et al.*, 2008).

Em relação à morte celular induzida por quercetina, estudos indicam que a mesma ocorre maioritariamente por apoptose, através da activação da via mitocondrial. Isto porque, a apoptose mediada por quercetina pode resultar da indução de stresse proteico, da ruptura de microtúbulos e da mitocôndria, da libertação do citocromo c e da activação de caspases envolvidas na via intrínseca da apoptose. Em 2005, Volate demonstrou que a quercetina induz um aumento da caspase-9 activa e da expressão de BAX em simultâneo com uma diminuição dos níveis de proteínas anti-apoptóticas tais como a BCL-2 (Volate *et al.*, 2005; Nomura *et al.*, 2008). A quercetina pode também induzir a morte por apoptose através do ligando indutor de apoptose do TRAIL, um membro da superfamília dos TNFs (Kim et al., 2008). Por outro lado, alguns outros trabalhos têm demonstrado que existe uma ligação entre a quercetina e a resistência multifármacos. Neste sentido, os estudos apontam para os efeitos reversíveis deste composto na MDR, tornando-se a quercetina um composto promissor também neste âmbito (van Zanden *et al.*, 2007). Alguns autores demonstraram que a quercetina interage com a PGP, inibindo a sua actividade ou diminuindo a sua expressão. Observou-se também que a interacção com a PGP se efectua a nível do local de ligação do ATP ou do local de ligação do substrato. Outros trabalhos demonstraram que também existe uma interacção entre a quercetina e a MRP1, uma vez que a quercetina tem a capacidade de reduzir os níveis intracelulares de glutathione necessários para o efluxo através da MRP1. Neste sentido, a quercetina actua como substrato para a MRP1 através da inibição competitiva com outros substratos, impedindo o efluxo através desta proteína por ligação directa ou indirecta aos locais de ligação de ATP. Para além disso, estudos revelaram ainda que a quercetina inibe a expressão de MRP1 (van Zanden *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2010).

Outros estudos demonstraram que existe uma correlação entre a expressão de P53 e a resposta de células e de modelos animais tumorais à quercetina. Constatou-se que a quercetina é capaz de potenciar o efeito da doxorrubicina em células de carcinoma hepatocelular através de um aumento da expressão desta proteína. Estes resultados foram ainda reforçados através de um modelo animal de xenotransplante heterotópico deste tumor. Também em modelos *in vitro* e *in vivo* de cancro de pulmão se obtiveram resultados semelhantes, onde a quercetina potenciou o efeito da tricostatina A de um modo dependente da P53. Estes resultados promissores abrem portas no sentido da utilização da quercetina, em

combinação com fármacos comumente utilizados em quimioterapia, potenciando o seu efeito e reduzindo a resistência intrínseca que os tumores muitas vezes apresentam (Wang *et al.*, 2012; Chan *et al.*, 2013).

Por fim, como já referido anteriormente, sabe-se que a expressão de GLUT-1 está aumentada em diversos tumores sólidos o que, conseqüentemente, promove a sua tumorigénese. Também já foi mencionado que os flavonóides são potentes inibidores do influxo de glicose, tendo sido inclusivamente demonstrado que os flavonóis, tais como a quercetina, inibem as tirosinas cinases de ligação de ATP e, por consequência, são capazes também de inibir competitivamente o GLUT-1. De facto, e embora o mecanismo exacto através do qual a quercetina inibe o GLUT-1 não esteja ainda perfeitamente clarificado, num estudo de 2001 de Vera e colaboradores demonstrou-se que a quercetina interage com os locais de ligação de ATP do GLUT-1 inibindo competitivamente a actividade deste transportador. Posteriormente, em 2011, o mesmo grupo de investigação reforçou a ideia que a quercetina é um inibidor competitivo do GLUT-1, ligando-se a este transportador num local exofacial. Para além disso, parece que a ligação da quercetina ao GLUT-1 desencadeia uma modificação conformacional deste transportador o que, conseqüentemente, afecta o local de ligação da glicose. (Vera *et al.*, 2001; Amann & Hellerbrand, 2009; Furuta *et al.*, 2010; Pérez *et al.*, 2011; Vargas *et al.*, 2011).

Deste modo, a quercetina pode ser considerada um potencial agente anti-tumoral também através deste mecanismo, sendo no entanto necessários mais estudos para clarificar o seu potencial anticancerígeno através desta via. Nos tumores primários do fígado, a quercetina pode ser considerada como um potencial agente anti-tumoral, uma vez que, para além de outros mecanismos, esta poderá agir como um possível inibidor competitivo do GLUT-1 que, por sua vez, se encontra sobreexpresso nestas neoplasias induzindo a tumorigénese.

Gossipol

O gossipol é um composto natural extraído da planta do algodão (espécie *Gossypium*) e da árvore tropical *Thespesia populnea* ambas membros da família *Malvaceae*, que devido às suas diversas actividades biológicas tem suscitado o interesse da comunidade científica. O nome gossipol tem a sua origem numa junção da espécie *Gossypium* e a sua natureza fenólica. Em 1958 Edwards conseguiu efectuar a síntese completa da molécula de gossipol e,

consequentemente, identificar a sua estrutura química que descobriu ser 1,1',6,6',7,7'-hexahydroxy-5,5'-di-isopropil-3,3'-dimetil-2,2'-binaftaleno 8,8'dicarboxaldeído. A estrutura química do gossipol encontra-se representada na figura seguinte (Figura 11) (Kuivila, 1957; Dodou, 2005).

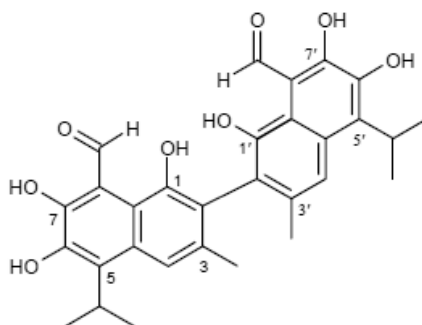


Figura 11: Estrutura química do gossipol (Dodou, 2005).

Este composto exhibe um tipo de enantiomerismo chamado de atropisomerismo que surge a partir de uma rotação específica na ponte C2-C2' resultando em duas isoformas opticamente activas, os enantiómeros (-)- e (+)- (Dodou, 2005).

Devido à presença dos grupos fenólicos hidroxilos e aldeídos o gossipol é um composto bastante reactivo, o que constitui a base dos seus múltiplos efeitos biológicos. O primeiro desses efeitos a ser observado foi o efeito da inibição da fertilidade masculina, podendo este composto ser utilizado com anticonceptivo. Posteriormente foram identificadas actividades antivirais e antiparasitárias, antioxidantes e anticancerígenas, sendo nestas últimas que nos vamos focar (Dodou, 2005).

No que diz respeito à actividade anticancerígena, foi já amplamente demonstrado que este composto consegue induzir, *in vitro*, a inibição da proliferação de uma vasta gama de linhas celulares tumorais. Verifica-se também que, na generalidade, o enantiómero (-)- induz um efeito inibitório mais acentuado do que o (+)- ou do que a mistura racémica. Em modelos *in vitro* o potencial anti-tumoral do gossipol foi já comprovado em diversas linhas celulares tumorais humanas provenientes de tumores de diferentes órgãos, tais como da cabeça e pescoço (Bauer *et al.*, 2005), de retinoblastoma (Hsiao *et al.*, 2012), do pâncreas (Yuan *et al.*, 2013) e do ovário (Wang *et al.*, 2013). Também em modelos *in vivo* tem sido demonstrado o potencial antineoplásico deste composto (Xu *et al.*, 2005;

Meng *et al.*, 2008; Gunassekaran *et al.*, 2011; Pang *et al.*, 2011). Para além do referido anteriormente, alguns estudos indicam também um efeito sinérgico entre o gossipol e fármacos comumente utilizados em quimioterapia, assim como de ser um radiosensibilizador (Xu *et al.*, 2005; Meng *et al.*, 2008; Wong *et al.*, 2012; Karaca *et al.*, 2013).

Foram também já realizados ensaios clínicos de fase I e II utilizando o gossipol na terapia de diversas patologias oncológicas, quer em monoterapia, quer em terapia combinada (Heist *et al.*, 2010; Van Poznak *et al.*, 2001; Ready *et al.*, 2011). Já em 1992, num estudo de fase I que consistia na administração de 30 a 180 mg, por semana, da mistura racémica de gossipol a 34 doentes com vários tipos de cancro considerados altamente resistentes à quimioterapia, se verificou alguma eficácia clínica sem ocorrer mielossupressão (Stein *et al.*, 1992). Posteriormente, em 1999, Bushunow e colaboradores verificaram que a administração diária de 20 mg de gossipol em doentes com recidiva de gliomas foi bem tolerada e concluíram que a taxa de resposta, embora baixa, é mensurável principalmente por se observar num grupo de doentes com doença recorrente e mau prognóstico (Bushunow *et al.*, 1999). Em 2001 um ensaio clínico de fase I/II envolvendo a administração diária de 30 a 50 mg de gossipol em mulheres com cancro de mama metastático refractário demonstrou uma estabilização da doença com diminuição dos marcadores tumorais em duas das três mulheres que efectuaram o tratamento (Van Poznak *et al.*, 2001). Como vemos, o gossipol tem sido apresentado como um composto fundamental nas novas classes de compostos anti-neoplásicos, contribuindo para isso o facto de o tratamento com gossipol não induzir os efeitos secundários graves que acompanham o tratamento com a quimioterapia convencional (Dodou, 2005; Qiu *et al.*, 2002). De modo a reduzir a reactividade e a toxicidade não específica do gossipol a ASCENTA desenvolveu um análogo do gossipol, o apogossipol que está neste momento a ser testado em fase pré-clínica (Azmi & Mohammad, 2009).

Uma das características que o gossipol tem em comum com outros fenóis aromáticos é o facto de ser um composto fortemente antioxidante, sendo este um dos aspectos que o tornam um potencial agente anticancerígeno. Apesar disso, em alguns casos, e dependendo da dose, o gossipol pode actuar como pró-oxidante, característica que também pode contribuir para os seus potenciais efeitos anticancerígenos. Porém, esta dualidade anti/pró-oxidante não está isolada, e embora o conhecimento exacto acerca do mecanismo molecular de cada efeito biológico do gossipol seja ainda limitado, a literatura indica já que este composto exerce acções farmacológicas através de interacções com biomoléculas alvo tais como membranas, enzimas e mediadores de transdução de sinal o que contribui

para a sua actividade antineoplásica (Kovacic, 2003; Dodou, 2005).

Os mecanismos moleculares através dos quais o gossipol exerce a sua actividade antineoplásica têm sido objecto de estudo de diversas equipas de investigação em diferentes tipos de cancro. Sabe-se que o gossipol afecta a actividade de numerosas enzimas envolvidas no processo da progressão neoplásica tais como a NADPH (do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*), uma enzima chave nos processos de produção de energia pela célula tais como a via glicolítica e o ciclo de Krebs (Burgos *et al.*, 1986). Estudos demonstraram que o (-)-Gossipol é um inibidor competitivo não-selectivo da ligação da NADH (do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide*) à LDH (do inglês *lactate dehydrogenase*) uma enzima chave no metabolismo anaeróbio da glicose (Dodou, 2005).

Ainda dentro da temática energética, verificou-se que a mistura racémica de gossipol induziu a oxidação do benzaldeído, catalizada pela ALDH-3 (ALDH-3, do inglês *aldehyde dehydrogenase-3*), em adenocarcinoma mamário humano. Num outro estudo demonstrou-se que este composto inibiu as isoenzimas ALDH mitocondriais do fígado de ratos fêmeas, mas não nos machos, o que poderá estar correlacionado com o efeito sinérgico existente com os estrogénios que, por sua vez, já se comprovou que inibem a actividade da ALDH mitocondrial *in vivo* (Messiha, 1991). As ALDH são isoenzimas que catalisam a oxidação de aldeídos a ácidos e a hidrólise de éteres. A classe 3 das ALDH (ALDH-3) quando presente no citoplasma de células tumorais catalisa a desintoxicação oxidativa das oxafosforinas (pró-fármacos anti-neoplásicos) tornando o tumor resistente ao tratamento por quimioterapia (Rekha, 1997). Deste modo, também através da inibição das ALDH o gossipol poderá actuar enquanto composto anticancerígeno.

Porém, os efeitos do gossipol na célula neoplásica não se resumem a interferências ao nível da energética. Ao que tudo indica, um dos efeitos do gossipol poderá ser também a nível da família PKC. Esta é uma família de enzimas cinases que estão envolvidas no controlo da função de outras proteínas através da fosforilação dos grupos hidroxilo da serina ou seus resíduos treonina. Estas enzimas estão envolvidas na activação de factores de transcrição nucleares, na indução da proliferação celular, na diferenciação, na regulação negativa do gene *TP53*, na estimulação da síntese de aldosterona e na regulação do transporte de glicose nos adipócitos. Em 1990, Keniry e colaboradores demonstraram que o (-)-Gossipol se liga ao domínio catalítico da PKC e verificaram ainda que este composto possui a capacidade de inibir fortemente, de uma maneira dependente da dose, PKC purificadas a partir de linhas celulares humanas de cancros considerados resistentes (Keniry *et al.*, 1990). Considerando que a elevada

expressão de PKC se correlaciona com a resistência à quimioterapia em diversos tipos de cancro tudo indica que a co-administração de gossipol com os citostáticos pode ser útil para reverter esse processo.

Por outro lado, já em 1988 Kable e Parsons haviam publicado um trabalho onde demonstraram que uma vez no interior da célula, o gossipol é oxidado a gossipolone o qual, por sua vez, reage com a ADN polimerase induzindo a inibição da síntese de ADN assim como quebras na dupla cadeia desta macromolécula (Kable & Parsons, 1988).

Posteriormente, em 2002, um estudo veio demonstrar que a actividade anticancerígena do gossipol pode também estar correlacionada com o seu efeito na inibição das telomerasas (Mego, 2002).

Paralelamente, foram realizados estudos que indicam que o gossipol parece influenciar também o ciclo celular e os mecanismos regulatórios do mesmo. Alguns desses estudos demonstraram que o efeito antiproliferativo do gossipol na linha celular humana de cancro da mama MCF7 é mediado pela indução do TGF- β 1, um regulador negativo da síntese de ADN e da proteína tirosina fosfatase γ (PTP γ , do inglês *protein tyrosine phosphatase- γ*), uma proteína supressora tumoral expressa em células normais humanas mas sub-expressa em células tumorais. O efeito antiproliferativo deste composto na linha celular MCF7 é também mediado pela sub-regulação da expressão e fosforilação do RB e da ciclina D1. A forma não fosforilada do RB é inibidora da síntese de ADN através da ligação ao factor de transcrição E2F e inactivação do mesmo. Deste modo, ao induzir uma sub-regulação da expressão desta proteína poderá estar a ser comprometida a capacidade proliferativa das células neoplásicas (Ligueros *et al.*, 1997). De um modo semelhante ao que acontece no cancro da mama, estudos demonstraram que a mistura racémica de gossipol inibe a síntese de ADN numa linha celular humana de cancro da próstata, a PC3, através da indução da expressão de TGF-1 β (Jiang *et al.*, 2004). Em 2003 Zhang e colaboradores demonstraram ainda que numa linha celular humana de cancro do cólon, a HT-29, o tratamento com 10 μ M de gossipol inibiu a expressão de ciclina D1, de RB e a fosforilação deste último. Já a utilização de 20 μ M regulou positivamente a P21, uma proteína que inibe a formação do complexo ciclina D1-CDK4/6 (Zhang *et al.*, 2003).

São vários os estudos que indicam que, associada à inibição da proliferação celular, o gossipol induz a morte celular por apoptose. Os resultados demonstraram ainda que o efeito pró-apoptótico do gossipol envolve a inibição de membros anti-apoptóticos da família BCL-2 e está também correlacionado com interacções com a via das caspases mitocondriais, ou seja, este composto parece induzir a morte celular por apoptose através da via intrínseca ou mitocondrial. Já

em 2003 Kitada e colaboradores demonstraram que o gossipol é um composto capaz de se ligar ao domínio BH3 das proteínas anti-apoptóticas BCL-XL e BCL-2 e antagonizar os seus efeitos, revertendo a resistência à apoptose presente em diversos tumores (Kitada *et al.*, 2003; Oliver *et al.*, 2005). Posteriormente, em 2005, Bauer e colaboradores publicaram um estudo que corrobora as afirmações anteriores uma vez que eles demonstraram que o gossipol induziu selectivamente a apoptose em linhas celulares de tumores de cabeça e pescoço resistentes à cisplatina devido a uma sobreexpressão de BCL-XL (Bauer *et al.*, 2005). Para além da família BCL-2, existem outros resultados que indicam que a indução da apoptose pelo gossipol envolve uma disfunção mitocondrial. Neste sentido, estudos indicam que em resposta ao tratamento com gossipol, na célula neoplásica, ocorre uma activação da caspase 8 que, de seguida, medeia a libertação do citocromo c e a activação das caspases 3 e 9 (Hou *et al.*, 2004).

Para além das características anteriormente referidas contribuem para o efeito anticancerígeno do gossipol a sua capacidade de induzir alterações na actividade da Ca^{2+} ATPase, mudanças na fluidez membranar e alterações na captação de glicose. Ao que tudo indica, a capacidade que o gossipol possui de inibir o influxo de glicose prende-se também com o facto deste composto inibir competitivamente o transportador de glicose 1 e é nesta característica que nos vamos debruçar de seguida (Rodríguez-enríquez *et al.*, 2009).

Embora, devido à sua estrutura não seja óbvio que o gossipol seja um inibidor competitivo do GLUT-1, são já extensos os estudos que demonstram que os transportadores de glicose também interagem com compostos que não possuem semelhanças estruturais óbvias com a glicose. Encontramos nesta classe, tal como referido anteriormente, a citoclasina-B (Kasahara & Hinkle, 1977), compostos anti-estrogénicos (Afzal *et al.*, 2002) ou flavonóides (Vera *et al.*, 2001). Neste grupo podemos incluir também o gossipol, tendo já sido demonstrado em vários estudos que este possui a capacidade de inibir a captação de glicose, embora o mecanismo exacto através do qual ocorre essa inibição não esteja ainda perfeitamente esclarecido (On *et al.*, 1986; Nakamura *et al.*, 1988). À semelhança de outros inibidores competitivos do GLUT-1, tais como as tirfostinas, o gossipol possui características de estruturas hidroxiladas planares que podem fornecer a base estrutural para a inibição dos GLUTs (Pérez *et al.*, 2009). Em 2009 Pérez e colaboradores publicaram um estudo onde se confirma que o gossipol é um forte inibidor competitivo do GLUT-1. No seu estudo os autores demonstraram, com base em testes cinéticos, que o gossipol interage com o transportador na superfície endofacial do mesmo. De modo similar, já havia sido demonstrado que outros compostos hidrofóbicos incluindo a citocalasina-B ou os esteróides interagem com

o GLUT-1 na superfície endofacial (Afzal *et al.*, 2002; Pérez *et al.*, 2009). Assim, tudo indica que em alguns tipos de cancro, os efeitos anti-proliferativos do gossipol poderão estar relacionados com a sua capacidade de inibir a actividade do GLUT-1. Deste modo, uma vez que a expressão deste transportador está aumentada nos tumores primários do fígado induzindo a tumorigénese, o gossipol pode constituir uma arma terapêutica de elevado valor no tratamento destes tumores.

Capítulo III

Objetivos

Tendo em conta a baixa eficácia da maioria das opções terapêuticas disponíveis para o tratamento de tumores primitivos do fígado torna-se imperativo investigar novos métodos biológicos e farmacológicos para tratar estes tumores. É cada vez mais necessário conhecer a biologia tumoral de cada situação tumoral, de modo a adoptar uma terapêutica cada vez mais personalizada. Durante as últimas décadas, verificaram-se grandes avanços quer no diagnóstico destas neoplasias quer na investigação dos mecanismos moleculares que as distinguem. Para além disso também se têm verificado grandes avanços na área do tratamento. Neste sentido, a terapia génica tem vindo a ser exaustivamente estudada para o tratamento de vários tumores incluindo o carcinoma hepatocelular e é neste contexto que o transportador de glicose 1 aparece equacionado enquanto alvo terapêutico para os tumores primários do fígado.

Também a utilização de compostos naturais no tratamento de neoplasias tem sido exaustivamente estudada nas últimas décadas, com resultados bastante promissores. Assim, a utilização da quercetina e do gossipol pode fornecer informação de inegável interesse no tratamento dos tumores primários do fígado. Por outro lado, estudos recentes demonstraram que a utilização da PET com recurso ao ^{18}F -FDG poderá fornecer alguma informação acerca da biologia tumoral e auxiliar na escolha de uma terapêutica mais personalizada e eficaz.

Assim, o principal objectivo deste trabalho experimental foi avaliar a possibilidade da utilização do transportador de glicose 1 enquanto alvo terapêutico para o carcinoma hepatocelular e para o colangiocarcinoma, utilizando três linhas celulares humanas de carcinoma hepatocelular e uma linha celular humana de colangiocarcinoma. Dentro desta temática objectivou-se avaliar o potencial efeito de inibidores competitivos deste transportador, nomeadamente a quercetina e o gossipol, no tratamento destas neoplasias, sendo também objectivo de estudo a utilização de terapia génica no tratamento de carcinoma hepatocelular.

Tendo em conta que os tumores primitivos do fígado são altamente heterogéneos no que diz respeito à expressão de determinados biomarcadores que poderão influenciar a resposta às terapêuticas utilizadas, e mais precisamente à quimioterapia, um dos objectivos deste trabalho experimental foi também caracterizar as linhas celulares utilizadas no que respeita à expressão de P53, de AFP, de CK19, de KI67, de GLUTs, de PGP, de MRP1 e de LRP. Foi igualmente objectivo deste estudo avaliar a resposta destas linhas celulares ao tratamento com cisplatina, doxorrubicina, 5-fluorouracilo e sorafenib.

Por fim, tendo em conta que dados recentes indicam que o ^{18}F -FDG é substrato das proteínas MDR, objectivou-se também estudar a possível utilização deste radiofármaco no estudo da expressão e função destes transportadores.

Parte II
Trabalho Experimental

Capítulo IV

Materiais e Métodos

As taxas de incidência e mortalidade dos tumores primários do fígado têm crescido marcadamente nas últimas décadas. Neste sentido urge investigar novas formas de diagnóstico e de tratamento para estes tipos de neoplasias, de modo a obter diagnósticos mais precoces assim como tratamentos mais eficazes. A utilização do GLUT-1, enquanto marcador de mau prognóstico e alvo terapêutico em alguns tipos de tumores incluindo os primitivos do fígado, tem sido amplamente defendida nos últimos anos (Evans *et al.*, 2008; Amann & Hellerbrand, 2009; Amann *et al.*, 2009). Neste sentido, ao longo deste trabalho experimental procurou-se explorar o papel deste transportador na terapêutica e no diagnóstico do carcinoma hepatocelular e do colangiocarcinoma.

Para tal começaram por se utilizar culturas celulares, sendo que para a realização dos estudos *in vitro* foram utilizadas todas as metodologias adequadas a esta técnica. De seguida efectuou-se uma análise imunocitoquímica das linhas celulares em estudo. Por citometria de fluxo avaliou-se a expressão dos GLUTs -1, -2, -3, -5 e -12 e das bombas de efluxo PGP, MRP1 e LRP, e através de estudos de captação e de retenção de radiofármacos avaliou-se a funcionalidade dos mesmos transportadores. Realizaram-se também estudos de citotoxicidade dos fármacos comumente utilizados na terapia destes tipos de tumores assim como de inibidores competitivos do GLUT-1, utilizando para tal o ensaio do MTT, o ensaio clonogénico e a citometria de fluxo. Por fim procedeu-se à inibição génica do GLUT-1.

Todas as metodologias adoptadas estão de seguida descritas em pormenor.

Cultura e caracterização das linhas celulares

Ao longo deste trabalho experimental foram utilizadas quatro linhas celulares humanas de tumores primários do fígado, três linhas celulares de carcinoma hepatocelular e uma de colangiocarcinoma. As linhas celulares de carcinoma hepatocelular são designadas por HepG2 (ATCC® HB-8065™), HuH7 (JCRB0403) e Hep3B2.1-7 (ATCC® HB-8064™), e a linha celular de colangiocarcinoma é designada por TFK-1 (ACC 344).

A linha celular HepG2, adquirida à ATCC (*American Type Culture Collection*) é uma linha de células epiteliais humanas isoladas a partir do fígado de um doente do sexo masculino caucasiano de 15 anos de idade com um carcinoma hepatocelular bem diferenciado. Esta linha celular expressa a forma normal da

proteína P53 (wtP53). Por sua vez, a linha celular HuH7 disponibilizada pela JCRB (*Japanese Collection of Research Bioresources*) é uma linha celular de células epiteliais humanas, isoladas a partir do fígado de um doente japonês do sexo masculino de 57 anos de idade com carcinoma hepatocelular bem diferenciado. A linha celular HuH7 possui uma mutação no gene *TP53*, codão 220, exão 6 cys-tyr que induz uma sobreexpressão da proteína P53. As células Hep3B2.1-7, cujo repositório é a ATCC foram isoladas a partir de um fígado humano de um doente do sexo masculino, de raça negra, com 8 anos de idade. Esta linha celular contém o vírus da hepatite B integrado e possui uma deleção homozigótica no exão 11 do gene *TP53*, que, segundo a literatura, conduz a uma não expressão da proteína correspondente (Nakabayashi *et al.*, 1982; Constanzo *et al.*, 1989; Bressac *et al.*, 1990; Kaino, 1997; Reiser *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2004). A linha celular TFK-1, da DSMZ (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*) foi obtida a partir de uma peça cirúrgica de um doente japonês de 63 anos, do sexo masculino, com colangiocarcinoma extra-hepático moderadamente diferenciado. Estas células possuem uma mutação no gene *TP53* que conduz a uma expressão residual e não funcional da proteína correspondente (Saijo *et al.*, 1995; Jia *et al.*, 1997; Tanno *et al.*, 2004).

Após a recepção, as linhas celulares foram descongeladas e propagadas em cultura aderente de acordo com as indicações do fornecedor. As linhas celulares foram mantidas numa incubadora, a 37°C, em atmosfera humidificada com 95% de ar e 5% de CO₂. Para propagar as linhas celulares HepG2, HuH7 e Hep3B2.1-7 utilizou-se o meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, DMEM (Sigma, D5648), enquanto que a linha celular TFK-1 foi propagada no meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute Medium 1640*, RPMI-1640 (Sigma, R4130). Estes meios de cultura foram os indicados pelos fornecedores, e contêm uma concentração de glicose de 25 mM, sendo a partir daqui denominados por meios de cultura *high glucose* (HG). Para a realização de algumas componentes experimentais, foi necessário recorrer a meios de cultura com uma concentração de glicose inferior, de modo a mimetizar a glicemia humana, pelo que se utilizou o DMEM (Sigma, D5523) para as linhas celulares de carcinoma hepatocelular e o RPMI (Sigma, R1383) para a linha celular de colangiocarcinoma, com a concentração de glicose ajustada a 5 mM. A estes meios de cultura atribuiu-se a denominação *low glucose* (LG). Todos os meios de cultura foram suplementados com 5% de soro bovino fetal (FBS, do inglês *fetal bovine serum*; Sigma, F7524), 1% de antibiótico (100 U/mL de penicilina e 10 µg/mL estreptomicina; Sigma, A5955) e piruvato de sódio (Gibco, 11360) numa concentração de 400 mM no caso do RPMI e 100mM para o DMEM. O pH dos meios de cultura foi acertado para 7,4.

Tendo em conta que as linhas celulares utilizadas crescem em cultura aderente, para a realização dos diversos estudos foi necessário destacar as células dos frascos e preparar suspensões celulares, pelo que se utilizou uma solução de tripsina-EDTA a 0,25% (Gibco, 25200).

Para determinar o número de células de uma cultura, diluiu-se um volume conhecido da suspensão celular em igual volume de azul tripano e procedeu-se à contagem num microscópio invertido (Nikon, Eclipse TS 100) com ampliação de 100 vezes, com recurso a uma câmara de *Neubauer*.

Caracterização morfológica

Para a caracterização morfológica das linhas celulares, começámos pela realização de uma centrifugação *cytospin* de uma amostra de um milhão de células de cada linha celular em estudo. Essa centrifugação foi efectuada numa citocentrífuga Shandon Cytospin II, a 500 G durante 3 minutos, com o objectivo de obter blocos de parafina contendo os *pellets*. A partir dos blocos obtiveram-se conjuntos de lâminas com cortes para análise histopatológica. Para a caracterização morfológica, as lâminas foram posteriormente coradas com hematoxilina e eosina (H & E) e com a coloração de Papanicolau.

As amostras foram observadas num microscópio de luz (Nikon Eclipse 50i) e as imagens foram adquiridas com uma câmara digital (Nikon-Digital Sight DS-Fi1).

Expressão de citoqueratina 19

As linhas celulares em estudo foram também caracterizadas sob o ponto de vista da expressão de vários biomarcadores. Em relação aos tumores primários do fígado tem vindo a ser defendida a utilização da citoqueratina-19 (CK19, do inglês *cytokeratin-19*) com o propósito de diferenciar carcinoma hepatocelular de colangiocarcinoma. Para além desta diferenciação, a CK19 pode ser considerada como factor de prognóstico para o carcinoma hepatocelular, o que torna primordial a sua análise neste trabalho experimental (Lee *et al.*, 2012).

A análise da expressão de CK19 foi efectuada por imunocitoquímica. Para tal procedeu-se à centrifugação a 500 G, durante 5 minutos, de 1 milhão de células

de cada linha celular. Após a centrifugação, o *pellet* resultante foi fixado em formalina tamponada a 10% e, posteriormente, incluído em parafina para se constituírem os blocos. Os blocos de parafina foram depois cortados, e os fragmentos montados em lâminas de vidro, para avaliação por imunocitoquímica através da técnica do complexo avidina-biotina peroxidase. A expressão de CK19, realizada por coloração citoplasmática foi feita com base numa avaliação qualitativa e classificada enquanto ausente (A), focal (F), difusa (D), fraca (W, do inglês *weak*) e forte (S, do inglês *strong*). Para tal utilizou-se o anticorpo anti-CK19 (A53-B/A 2.26, Cell Marque) com uma diluição de 1:50.

As amostras foram observadas num microscópio de luz (Nikon Eclipse 50i) e as imagens foram adquiridas com uma câmara digital (Nikon-Digital Sight DS-Fi1).

Expressão de alfafetoproteína

A alfafetoproteína (AFP), uma glicoproteína sintetizada pelo fígado, é utilizada como marcador tumoral para diversos tipos de tumores incluindo o carcinoma hepatocelular (El-Serag & Rudolph, 2007). Já em relação ao colangiocarcinoma, a AFP não é normalmente utilizada enquanto marcador tumoral, embora existam casos isolados em que se demonstrou uma forte expressão da mesma (Vij & Wang, 2008).

Assim, dada a sua importância neste contexto, procedeu-se à análise da expressão de AFP nas linhas celulares em estudo. A metodologia utilizada foi a descrita na análise da expressão de CK19, recorrendo-se ao anticorpo anti-AFP (Policlonal, Cell Marque) com uma diluição de 1:50. A expressão de AFP, realizada por coloração nuclear, foi feita com base numa avaliação qualitativa e classificada enquanto ausente, focal, difusa, fraca e forte.

Expressão de KI67

A KI67 constitui uma proteína nuclear comumente relacionada com a proliferação celular e que tem vindo a ser amplamente utilizada em oncobiologia como marcador de proliferação celular (Scholzen & Gerdes, 2000). A sua expressão

pelas células tumorais é considerada como factor de prognóstico, o que enfatiza a importância da análise da sua expressão.

Deste modo procedeu-se à análise imunocitoquímica da expressão de KI67, nas linhas celulares estudadas, através do protocolo anteriormente descrito para a expressão de CK19. A expressão de KI67 foi avaliada em termos percentuais em que 0% significa ausência de expressão e 100% significa expressão total. Utilizou-se o anticorpo anti-KI67 (MIB-1, Dako) com uma diluição de 1:50.

Expressão de P53

De entre as mutações comumente encontradas no carcinoma hepatocelular e no colangiocarcinoma assumem especial importância as mutações no gene *TP53*, que induzem alterações na expressão da proteína correspondente, a P53, o que por sua vez irá influenciar a resposta à terapêutica (Khan *et al.*, 2005; Hussain *et al.*, 2007; Briggs *et al.*, 2009).

Assim, à semelhança do que havia ocorrido para a CK19, a AFP e a KI67, procedeu-se à análise da expressão da P53 nas linhas celulares em estudo por imunocitoquímica. Para tal utilizou-se o anticorpo anti-P53 (DO-7, Dako) com uma diluição de 1:50. A expressão de P53 foi avaliada em termos percentuais, e classificada de 0 a 4 em que 0 significa ausência de expressão, 1 expressão entre 1 e 25%, 2 expressão entre 26 e 50%, 3 expressão entre 51 e 75% e 4 quando a expressão varia entre 76 e 100%.

Estudo de transportadores

No âmbito desta dissertação foi de importância primordial avaliar a expressão de vários transportadores. Começou-se pela avaliação da expressão proteica do GLUT-1. Para além do papel que este transportador possui na tumorigénese de alguns tipos de cancro, incluindo o carcinoma hepatocelular, é sabido que ele também possui um papel fundamental no diagnóstico de diversas neoplasias, na medida em que é um dos principais transportadores do ¹⁸F-FDG (Amann & Hellerbrand, 2009; Amann *et al.*, 2009).

No entanto, alguns estudos têm demonstrado que para além do GLUT-1 existem outros GLUTs que possuem um papel importante no transporte deste radiofármaco, nomeadamente os GLUT-2, -3, -5 e -12 (Jadvar *et al.*, 2009). É também sabido que os tumores primários do fígado são considerados quimiorresistentes, o que poderá estar correlacionado com a expressão de bombas de efluxo (Bonin *et al.*, 2002; Tepsiri *et al.*, 2005; Brito *et al.*, 2014). Assim, foi também objectivo de estudo a avaliação da expressão proteica de todos os GLUTs referidos, assim como das bombas de efluxo PGP, MRP1 e LRP.

Adicionalmente, estudos recentes indicaram também que o ^{18}F -FDG pode ser extrusado para o exterior das células neoplásicas pelas proteínas de MDR (Tibor *et al.*, 2010). Deste modo, e tendo em conta a elevada quimiorresistência observada pelos tumores primitivos do fígado, assume uma grande importância a avaliação da cinética de transporte deste radiofármaco através de estudos de captação e de retenção, o que indirectamente, nos dará informação útil acerca da biologia celular e da presença ou não de resistência aos citostáticos pelas linhas celulares em estudo. O método mais comumente utilizado para a quantificação da função deste tipo de proteínas envolve o uso de outros substratos radiomarcados como o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI, através da quantificação da sua percentagem de captação e de retenção (Casalta-Lopes *et al.*, 2011). Assim, neste trabalho experimental realizaram-se também estudos de captação e de retenção de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI, de modo a estudar a cinética de entrada e de saída deste radiofármaco nas linhas celulares em estudo, e a correlacionar os seus perfis de captação e de retenção com os obtidos com o ^{18}F -FDG.

Tanto os transportadores de glicose como as bombas de efluxo PGP e MRP1 localizam-se preferencialmente na membrana celular, onde realizam as suas funções enquanto transportadores transmembranares. Apesar disso, sabe-se que estes transportadores também podem ser encontrados no citoplasma e em alguns organelos intracelulares, podendo, a partir daí, ser translocados para a membrana celular em resposta a alguns estímulos (Blok *et al.*, 1988; Widnell, 1995). Deste modo, neste trabalho experimental, estudámos a expressão de ambas as fracções, citoplasmática e membranar do GLUT-1, -2, -3, -5 e -12 e das proteínas de efluxo PGP e MRP1. Quanto à LRP, pertence à família das proteínas *Vault* que são complexos ribonucleicos e, assim, apenas se determinou a expressão da fracção citoplasmática desta proteína (Blok *et al.*, 1988; Widnell, 1995; Casalta-Lopes *et al.*, 2011).

No caso dos GLUTs, tendo em conta a sua função enquanto transportadores de glicose, assumiu importância primordial a avaliação da expressão dos mesmos em células cultivadas em meio de cultura HG e em meio de cultura LG, de modo a

aferir se a concentração de glicose no meio de cultura afectava a expressão destes transportadores.

Assim, com o intuito de avaliar a expressão membranar dos GLUT-1, -2, -3, -5 e -12 e das proteínas de efluxo PGP e MRP1, após a tripsinização de um milhão de células, centrifugou-se a suspensão celular a 1300 G durante 5 minutos. De seguida, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* resultante em 2 mL de PBS procedendo-se, posteriormente, a nova centrifugação. Após decantar o sobrenadante, marcaram-se as células com 3 μ L de anticorpo monoclonal anti-hGLUT1-PE (PE, do inglês *phycoerythrin*) (R&D Systems, MAB1349), ou anti-hGLUT2-PE (R&D Systems, FAB1414P), ou anti-hGLUT3 (R&D Systems, MAB1415), ou anti-hGLUT5 (R&D Systems, MAB1349), ou anti-hGLUT12 (Santa Cruz, sc-161659), ou anti-hPGP-FITC (FITC, do inglês *fluorescein isothiocyanate*) (BD Pharmingen, 557002) ou anti-hMRP1-FITC (BD Pharmingen, 557593), durante 15 minutos à temperatura ambiente e no escuro. Posteriormente, lavaram-se as células com 2 mL de PBS, após o que se centrifugaram durante 5 minutos a 1300 G. No caso das marcações anti-hGLUT1, anti-hGLUT-2, anti-hPGP e anti-hMRP1, de seguida, decantou-se o sobrenadante e o *pellet* resultante foi ressuspensão pela adição de 400 μ L de PBS e a suspensão celular resultante foi guardada à temperatura de 4°C até aquisição no citómetro.

Como os anticorpos anti-hGLUT3, anti-hGLUT5 e anti-hGLUT12 utilizados não se encontram marcados com nenhum fluorocromo foi necessário proceder a uma marcação com anticorpo secundário. Assim, após marcação com o anticorpo primário e lavagem por centrifugação, ao *pellet* resultante adicionaram-se 2 μ L de anticorpo secundário goat anti-mouseIgG-PE (Santa Cruz Biotechnology, sc-3818) no caso das marcações anti-hGLUT3 e anti-hGLUT5 e rabbit anti-goatIgG-PE (Santa Cruz, sc-3755) no caso da marcação anti-hGLUT12. Incubou-se no escuro, à temperatura ambiente durante 20 minutos, após o que se adicionaram 2 mL de PBS e se centrifugou durante 5 minutos a 1300 G. Seguidamente, decantou-se o sobrenadante, e ressuspenderam-se as células em 400 μ L de PBS. As células foram guardadas à temperatura de 4°C e posteriormente analisadas no citómetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences), utilizando o comprimento de onda de excitação de 585 nm para as marcações com PE ou o comprimento de onda de excitação de 530 nm para as marcações com FITC. Para a análise e quantificação da informação, utilizou-se *software* específico (Paint-a-Gate 3.02, Machintosh Software) e os resultados obtidos foram expressos em média de intensidade de fluorescência (MIF).

De modo a avaliar a expressão citoplasmática dos GLUT-1, -2, -3, -5 e -12, e também da PGP, da MRP1 e da LRP, após tripsinização, centrifugou-se a suspensão celular a 1300 G durante 5 minutos e, posteriormente, decantou-se o sobrenadante. De seguida, ressuspenderam-se as células em 2 mL de PBS e procedeu-se a nova centrifugação a 1300 G durante 5 minutos. Após descartar o sobrenadante, adicionaram-se 100 µL de solução fixante (solução A - Immunostep, Intracell Kit) e incubaram-se as células durante 15 minutos no escuro, à temperatura ambiente. Passado este tempo, lavaram-se as células com 2 mL de PBS, após o que foram centrifugadas durante 5 minutos a 1300 G. Posteriormente, decantou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* com 100 µL de solução permeabilizante (solução B - Immunostep, Intracell Kit). Adicionaram-se 3 µL de cada um dos anticorpos monoclonais específicos. Para os GLUTs, a PGP e a MRP1 utilizaram-se os anticorpos mencionados anteriormente na avaliação da expressão membranar, enquanto que para a LRP se utilizou o anticorpo anti-hLRP (Santa Cruz Biotechnology, sc-59585). Procedeu-se a nova incubação das células durante 15 minutos à temperatura ambiente, na ausência de luz. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS e seguidamente centrifugadas a 1300 G. De seguida, decantou-se o sobrenadante, e no caso das marcações anti-hGLUT1, anti-hGLUT-2, anti-hPGP e anti-hMRP1 adicionaram-se às células 400 µL de PBS, no qual se ressuspenderam as células, guardando-se depois à temperatura de 4°C até aquisição no citómetro. Uma vez que os anticorpos anti-hGLUT3, anti-hGLUT5, anti-hGLUT12 e anti-hLRP utilizados não se encontram conjugados com nenhum fluorocromo foi necessário marcar com um anticorpo secundário apropriado, utilizando-se a metodologia descrita na avaliação da expressão membranar. No que diz respeito à marcação para a LRP utilizou-se o anticorpo goat anti-mouseIgG-PE (Santa Cruz Biotechnology, sc-3818).

As células foram posteriormente analisadas no citómetro de fluxo FACSCalibur, utilizando os comprimentos de onda de excitação de 585 nm para as marcações com PE ou de 530 nm para as marcações com FITC. Os resultados obtidos foram expressos em termos de MIF.

Para a realização dos estudos de captação e de retenção de ¹⁸F-FDG e de ^{99m}Tc-MIBI as linhas celulares foram cultivadas em meio de cultura HG e em meio de cultura LG.

De modo a realizar este procedimento, as células foram tripsinizadas, e após centrifugação, preparou-se uma suspensão celular com 2X10⁶ células/mL, em frascos de cultura de 25 cm². Seguidamente, para recuperarem da acção da tripsina, as células ficaram a repousar durante 60 minutos, numa incubadora, à

temperatura de 37°C e com atmosfera com 5% de CO₂ e 95% de ar. Após o período de repouso, adicionou-se a cada frasco de cultura com a suspensão celular 0,925 MBq/mL de ¹⁸F-FDG ou ^{99m}Tc-MIBI. Passados 5, 30, 60, 90 e 120 minutos de incubação com o radiofármaco, retiraram-se alíquotas de 200 µL da suspensão celular para microtubos que continham PBS gelado. Seguidamente, centrifugaram-se as amostras durante 60 segundos a 5600 G de modo a proceder a uma completa separação entre o *pellet* e o sobrenadante. Recolheu-se o sobrenadante para um tubo de RIA previamente identificado, efectuando-se de seguida uma nova lavagem com 500 µL de PBS gelado seguida de nova centrifugação para a separação do *pellet* e do sobrenadante. Os sobrenadantes resultantes das várias centrifugações foram recolhidos para os tubos identificados e os *pellets* permaneceram nos respectivos microtubos igualmente identificados.

Para os estudos de retenção incubaram-se as células com 0,925 MBq/mL do radiofármaco em estudo (¹⁸F-FDG ou ^{99m}Tc-MIBI) durante 60 minutos. Após este tempo, as células foram centrifugadas a 500 G durante 5 minutos, numa centrífuga refrigerada a 4°C, e separou-se o *pellet* do sobrenadante. Após a centrifugação, decantou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* resultante em meio de cultura novo sem radiofármaco, seguindo-se o mesmo procedimento descrito anteriormente para os estudos de captação.

Após as incubações com os radiofármacos em estudo, e a colheita separada dos *pellets* e dos sobrenadantes, foi possível calcular as percentagens de captação e de retenção de cada radiofármaco para cada tempo e condição referidas. Para tal, no final de cada procedimento experimental mediu-se a radioactividade de ambas as fracções (*pellets* e sobrenadantes) em contagens por minuto (CPM) num contador de poço apropriado, o CAPINTEC CRC-15W no caso do ¹⁸F-FDG e o DPC Gamma C12 no caso do ^{99m}Tc-MIBI. Deste modo, foi possível calcular a percentagem de captação ou de retenção de cada radiofármaco, para cada linha celular em estudo, utilizando a expressão seguinte.

$$\text{Percentagem de captação (ou retenção)} = \frac{CPM_{\text{pellet}}}{CPM_{\text{pellet+sobrenadante}}} \times 100$$

Equação 1: Cálculo da percentagem de captação ou retenção.

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

Com o intuito de avaliar o efeito da modulação das proteínas MDR no transporte de ^{18}F -FDG e de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI, realizaram-se estudos de retenção com os referidos radiofármacos nas linhas celulares em estudo, na presença de verapamil, um inibidor competitivo da PGP (Stavrovskaya, 2000).

Para tal, incubaram-se as suspensões celulares com verapamil (Sigma, V4629) durante 60 minutos. A concentração de verapamil utilizada baseou-se em estudos prévios em outras linhas celulares (Ballinger *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 2003; Casalta-Lopes *et al.*, 2011). Inicialmente começámos por incubar as células com 45 μM deste composto para todas as linhas celulares em estudo não se observando diferenças na retenção dos radiofármacos. Realizaram-se então estudos com 90 e 180 μM de verapamil, sendo que para as linhas celulares HuH7 e TFK-1 se observaram diferenças a partir da concentração de 90 μM , e para as outras linhas celulares (HepG2 e Hep3B2.1-7) apenas se observaram diferenças com 180 μM . Assim, as concentrações de verapamil utilizadas foram 90 μM para as linhas celulares HuH7 e TFK-1 e 180 μM para as linhas celulares HepG2 e Hep3B2.1-7. Passados os 60 minutos de incubação com verapamil realizaram-se os procedimentos descritos anteriormente para os estudos de retenção.

Efeito da quimioterapia

Tal como referido na contextualização teórica, os tumores primários do fígado são considerados altamente quimiorresistentes. Contudo, devido à escassez de tratamentos eficazes, a quimioterapia é ainda amplamente utilizada, embora na grande maioria das vezes com um papel meramente paliativo.

No que diz respeito ao carcinoma hepatocelular, a doxorrubicina e a cisplatina são os citostáticos mais utilizados na prática clínica, embora as taxas de resposta sejam desanimadoras. A utilização do 5-fluorouracilo é controversa, mas defendida por alguns autores (Johnson, 2000; Villanueva, 2011; Brito *et al.*, 2012). Mais recentemente o sorafenib tem sido utilizado em doentes com carcinoma hepatocelular irressuscável, com bons resultados quando comparado com os outros fármacos (Johnson, 2000; Villanueva, 2011; Brito *et al.*, 2012).

Já em relação ao colangiocarcinoma, as estratégias de quimioterapia passam na maioria das vezes pela utilização do 5-fluorouracilo em monoterapia ou em combinação com outros fármacos como a cisplatina, a doxorrubicina ou a gencitabina (Anderson *et al.*, 2004; Thongprasert, 2005; Blechacz & Gores, 2008).

Actividade metabólica

O efeito citotóxico dos vários fármacos referidos como utilizados na quimioterapia foi estudado, após incubação com concentrações crescentes dos mesmos, nas diferentes linhas celulares em estudo, três de carcinoma hepatocelular (HepG2, HuH7 e Hep3B2.1-7) e uma de colangiocarcinoma (TFK-1). Dos fármacos em questão usámos a cisplatina (Sigma, P4394), a doxorubicina (Sigma, 44583), o 5-fluorouracilo (Sigma, F6627) e o sorafenib (Bayer Healthcare¹). As concentrações usadas diferiram com o fármaco em estudo. Deste modo, as concentrações de cisplatina variaram de 100 nM a 100 µM, as de doxorubicina variaram de 12,5 nM a 250 µM, as de 5-fluorouracilo variaram de 500 nM a 500 µM e as de sorafenib variaram de 250 nM a 100 µM. A avaliação do efeito citotóxico foi realizada, para as diferentes concentrações e para as diferentes linhas celulares, após 24, 48, 72 e 96 horas de incubação com os fármacos.

Para todos os estudos de citotoxicidade foram preparadas soluções de concentração apropriada, dos compostos em estudo, de modo a que a sua adição apenas alterasse no máximo em 1% o volume do meio de cultura. Nas experiências foram ainda utilizados dois controlos: culturas celulares em que não houve administração de nenhum composto e culturas celulares tratadas com o solvente do fármaco em teste.

Após 24, 48, 72 e 96 horas de incubação com as várias concentrações dos compostos em estudo a actividade metabólica celular foi avaliada pelo teste colorimétrico denominado por brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Este ensaio baseia-se na capacidade das enzimas desidrogenases, presentes nas células viáveis, clivarem os anéis de tetrazólio do MTT e formar cristais de formazano de cor azul arroxeadada. Esta reacção ocorre essencialmente na mitocôndria, através da acção da succinato desidrogenase, embora alguns estudos indiquem que a redução do MTT pode ocorrer também no citoplasma (Bernas & Dobrucki, 2002; Berridge *et al.*, 2005). Posteriormente, os cristais formados podem ser solubilizados e quantificados recorrendo a meios espectrofotométricos. Assim, a quantidade de cristais de formazano produzida é proporcional ao número de células metabolicamente activas e, deste modo, o ensaio do MTT é considerado um método indirecto para determinar a actividade metabólica (Cardoso *et al.*, 2001).

Para a realização destes estudos foi necessário preparar uma suspensão celular com 5×10^4 células/mL em meio de cultura. A suspensão celular foi

¹ O Sorafenib foi gentilmente cedido pela Bayer Healthcare, 1024-03D.

distribuída por placas de 24 poços, contendo cada poço 500 μ L desta suspensão. As placas foram colocadas a repousar na incubadora durante 24 horas de modo a permitir a adesão das células ao fundo de cada poço. Findo este tempo, as células foram incubadas com as diferentes concentrações dos fármacos acima referidas.

Após incubação, durante 24, 48, 72 e 96 horas com os fármacos, foi avaliada a actividade metabólica. Para tal, removeu-se o meio de cultura dos poços das placas, lavou-se de seguida cada um dos poços com 500 μ L de PBS (do inglês *phosphate buffer saline*) e, posteriormente, adicionaram-se 150 μ L de uma solução de MTT (0,5 mg/mL; Sigma, M2128) em PBS com pH final de 7,4 e incubaram-se as placas a 37°C, no escuro, durante 3 horas. No final acrescentaram-se, a cada poço, 150 μ L de uma solução de 40 mM de ácido clorídrico (Sigma, 258148) em isopropanol (Sigma, P4394) com o objectivo de solubilizar os cristais de formazano obtidos. De seguida, o conteúdo de cada poço foi transferido para uma placa de 96 poços e a absorvância lida num espectrofotómetro ELISA (Biotek® Synergy HT), com um comprimento de onda de 570 nm utilizando um filtro de referência de 620 nm.

A citotoxicidade foi expressa como a percentagem de actividade metabólica nas culturas submetidas ao tratamento em relação à actividade metabólica das culturas incubadas com o solvente. Através deste procedimento foi possível estabelecer curvas dose-resposta e, conseqüentemente, determinar a concentração inibitória média (IC₅₀), ou seja, a concentração de composto necessária para inibir 50% da actividade metabólica. Os resultados obtidos foram posteriormente analisados e processados no programa OriginPro 8.0.

Viabilidade e morte celular

Para avaliar a viabilidade celular e, conseqüentemente, os tipos de morte celular induzidos pela incubação com os fármacos referidos, utilizou-se a citometria de fluxo com recurso à dupla marcação com anexina-V (AV) e iodeto de propídeo (IP). Através da utilização desta técnica consegue-se distinguir as células mortas das células viáveis, assim como discriminar qual o tipo de morte celular predominante (necrose ou apoptose).

Uma das principais características das células apoptóticas é a alteração da distribuição dos fosfolípidos na bicamada lipídica da membrana celular. Deste modo, ao iniciar-se a morte celular por apoptose ocorre a translocação da fosfatidilserina, um fosfolípido de carga negativa, do folheto interno para o folheto

externo da membrana celular. A AV é uma molécula com grande afinidade por fosfolípidos de carga negativa, tais como a fosfatidilserina, aos quais se liga. Assim, quando conjugada com um fluorocromo, a AV permite determinar a localização da fosfatidilserina na membrana celular e, deste modo, identificar as células na fase inicial da apoptose. Por outro lado, o IP é um composto fluorescente que tem a capacidade de se intercalar na dupla cadeia de ADN se a conseguir atingir. As células necróticas perdem a integridade da membrana celular, o que permite a entrada do IP para o interior da célula. No entanto, a perda da integridade membranar não é característica exclusiva das células em necrose, pois também em fases mais avançadas da apoptose ocorre ruptura da membrana citoplasmática, o que permite a entrada de IP. Deste modo, tal como se pode constatar na Tabela 1, com a dupla marcação com AV e IP, é possível distinguir quatro populações celulares. As células vivas que se apresentam negativas para ambas as marcações, as células em apoptose inicial que se apresentam positivas para a marcação com AV-FITC e negativas para a marcação com IP, as células em apoptose tardia/necrose que se apresentam positivas para ambas as marcações, e as células necróticas que se apresentam positivas para a marcação com IP e negativas para a AV (van Engeland *et al.*, 1998).

Tabela 1: Padrões de marcação com anexina-V e iodeto de propídeo para os diferentes tipos de morte celular.

Grupo	Anexina-V	Iodeto de Propídeo
Células vivas	-	-
Células em apoptose inicial	+	-
Células em apoptose tardia/necrose	+	+
Células em necrose	-	+

Deste modo, para a avaliação da viabilidade celular e dos tipos de morte celular induzidos, as linhas celulares foram incubadas com diferentes concentrações de cisplatina, de doxorubicina, de 5-fluorouracilo e de sorafenib, durante 48 horas, tendo em conta os resultados obtidos através da avaliação da actividade metabólica. Assim, e de acordo com as curvas dose-resposta obtidas para cada linha celular foram seleccionadas três concentrações: a concentração correspondente ao valor do IC₅₀, uma concentração superior a este valor e uma concentração inferior. As concentrações utilizadas apresentam-se na tabela seguinte (Tabela 2). Avaliaram-se também células controlo, ou seja, células não sujeitas a tratamento.

Tabela 2: Diferentes concentrações de cisplatina, de doxorubicina, de 5-fluorouracilo e de sorafenib com que as linhas celulares em estudo foram incubadas para a avaliação da viabilidade celular.

	HepG2	HuH7	Hep3B2.1-7	TFK-1
Cisplatina (μM)	2*; 8#; 30 ^{\$}	0,75*; 3,5#; 30 ^{\$}	0,75*; 4#; 30 ^{\$}	2*; 23#; 60 ^{\$}
Doxorrubicina (μM)	0,1*; 0,7#; 5 ^{\$}	0,05*; 0,25#; 5 ^{\$}	0,1*; 0,85#; 5 ^{\$}	0,1*; 15#; 50 ^{\$}
5-fluorouracilo (μM)	2*; 200#; 500 ^{\$}	2*; 390#; 500 ^{\$}	2*; 200#; 500 ^{\$}	2*; 118#; 500 ^{\$}
Sorafenib (μM)	2,5*; 7,5#; 100 ^{\$}	5*; 18#; 100 ^{\$}	5*; 13#; 100 ^{\$}	5*; 15#; 100 ^{\$}

#concentrações iguais ao IC₅₀; *concentrações inferiores ao IC₅₀; \$concentrações superiores ao IC₅₀.

Para a realização desta marcação, as culturas celulares foram destacadas das paredes dos frascos de cultura e, posteriormente, centrifugadas a 1300 G durante 5 minutos. De seguida, retirou-se o sobrenadante e lavou-se o *pellet* com PBS. Após decantar o sobrenadante, procedeu-se a nova lavagem com PBS, por centrifugação. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi incubado com uma solução constituída por 100 μL de tampão de ligação, 5 μL de AV marcada com FITC e 2 μL de IP (kit BD Pharmingen, 51-65874X), durante 15 minutos à temperatura ambiente e em ambiente escuro. Após esta incubação, adicionaram-se 400 μL de tampão de ligação e as células foram guardadas a 4°C até aquisição no citómetro de fluxo. A análise foi efectuada num citómetro FACSCalibur utilizando o laser de argon com comprimento de onda de excitação a 488 nm e os comprimentos de onda de emissão 530 nm para a AV-FITC e 585 nm para o IP, correspondentes aos canais de emissão de fluorescência 1 (FL1) e 2 (FL2), respectivamente. Para a avaliação dos tipos de morte celular, analisaram-se 10 000 eventos que, neste caso, corresponde ao número de células. Os resultados são mostrados sob a forma de percentagem de células em cada uma das quatro populações referidas.

Expressão de BAX e de BCL-2

Uma ampla variedade de moléculas está envolvida no controlo das vias de activação da apoptose, tendo especial importância as proteínas anti- e pró-apoptóticas e as caspases. A família BCL-2 é uma família de proteínas indutoras e

repressoras de morte celular por apoptose que participam activamente na regulação deste processo (Borner, 2003). Alguns membros desta família de proteínas, como a BCL-2 e a BCL-XL, são chamados de reguladores anti-apoptóticos ou proteínas anti-apoptóticas e inibem a apoptose ao prevenirem a libertação de citocromo-c (Vander *et al.*, 1999). Por outro lado, alguns outros membros da família como a BAX, a BID e a BAK são proteínas pró-apoptóticas (Hengartner, 2000). A homeostasia é mantida através do balanço entre a quantidade de proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas. Estímulos, tais como danos induzidos no ADN, conduzem ao aumento da expressão de proteínas pró-apoptóticas e diminuição da expressão de proteínas anti-apoptóticas, induzindo um desequilíbrio que irá conduzir à apoptose (Murphy *et al.*, 2000; Petros *et al.*, 2004).

Assim, após a avaliação do tipo de morte celular induzida, fomos verificar qual o efeito dos compostos anteriormente referidos na expressão proteica de BAX e de BCL-2. Para esta análise as linhas celulares foram incubadas, durante 48 horas, apenas com o valor correspondente ao IC₅₀ obtido para cada fármaco, valores assinalados na Tabela 2 pelo símbolo #. O mesmo tipo de estudo foi efectuado em células controlo. Deste modo, após a tripsinização, centrifugaram-se as suspensões celulares a 1300 G durante 5 minutos, decantou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* resultante em 1 mL de PBS. Procedeu-se de seguida a uma nova centrifugação, após a qual o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspense em 100 µL de solução A (solução fixante – Immunostep, Intracell Kit), e de seguida as células foram incubadas durante 15 minutos, no escuro e à temperatura ambiente. Posteriormente, adicionaram-se 2 mL de PBS e procedeu-se a nova centrifugação da suspensão celular a 1300 G durante 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e adicionaram-se 100 µL de solução B (solução permeabilizante – Immunostep, Intracell Kit), 3 µL de anti-BAX-PE (SantaCruz, sc-20067PE) e 3 µL de anti-BCL2-FITC (Santa Cruz, sc-509FITC). Após agitação, incubou-se a suspensão celular durante 15 minutos, no escuro à temperatura ambiente, e posteriormente adicionaram-se 2 mL de PBS, efectuando-se de seguida uma nova centrifugação a 1300 G durante 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante, ressuspenderam-se as células em 400 µL de PBS e guardaram-se a 4°C até aquisição no citómetro de fluxo. A detecção foi feita utilizando para a BAX o comprimento de onda de excitação de 585 nm, e para a BCL-2 de 530 nm. Os resultados obtidos foram expressos em termos de MIF, tendo-se calculado, à *posteriori*, a razão BAX/BCL-2, que foi normalizada em relação à razão BAX/BCL-2 da condição controlo.

Inibidores competitivos do GLUT-1: quercetina e gossipol

Alguns estudos indicam que a sobreexpressão do GLUT-1 induz a tumorigênese e, conseqüentemente, quimiorresistência e radiorresistência no carcinoma hepatocelular (Amann & Hellerbrand, 2009; Amann *et al.*, 2009). Sabe-se também que a quercetina e o gossipol (inibidores competitivos do GLUT-1) possuem actividade anti-proliferativa numa ampla variedade de tumores podendo deste modo constituir uma opção para o tratamento dos tumores primários do fígado (Qiu *et al.*, 2002; Dodou, 2005; Elmore, 2007; Kim *et al.*, 2008). Para avaliar esta possibilidade, estudou-se o efeito da quercetina e do gossipol nas linhas celulares de carcinoma hepatocelular e de colangiocarcinoma em estudo.

Actividade metabólica

De modo a avaliar o efeito citotóxico da quercetina (Sigma, F2003) e do gossipol (Sigma, 48761) as diferentes linhas celulares foram incubadas com concentrações crescentes destes compostos. Para a quercetina utilizaram-se concentrações de 1 μM a 250 μM e para o gossipol concentrações de 250 nM a 20 μM . Ambos os compostos foram solubilizados em DMSO (dimetilsulfóxido). Para todos os estudos foram preparadas soluções de quercetina e de gossipol de concentração apropriada de modo a que a sua adição apenas alterasse, no máximo, em 1% o volume do meio de cultura. Para estes estudos, realizaram-se dois controlos constituídos por células tratadas apenas com DMSO e por células que não foram sujeitas a qualquer tratamento. Após 24, 48, 72 e 96 horas de incubação com os compostos a actividade metabólica das células das diversas linhas celulares foi avaliada pelo teste do MTT, anteriormente descrito.

Sobrevivência celular

Com o intuito de verificar o efeito induzido pela quercetina e pelo gossipol para tempos de incubação mais longos, ou seja, se o efeito observado na avaliação do efeito na actividade metabólica permanece ou é reversível, avaliou-se, com recurso ao ensaio clonogénico a sobrevivência celular após a exposição das linhas celulares em estudo a estes dois compostos. Este tipo de teste é, por excelência,

utilizado quando se pretende efectuar uma análise com tempos mais longos, complementando assim, a informação fornecida pelo teste do MTT.

O ensaio clonogénico é um teste que visa determinar a sobrevivência celular com base na capacidade de uma única célula ser capaz de formar uma colónia, após ser submetida a um tratamento ou a uma agressão. Considera-se que uma colónia é visível quando constituída por, pelo menos, cinquenta células (Rafehi *et al.*, 2011).

Assim, para a realização deste ensaio, e para cada linha celular em estudo, numa placa de 6 poços semearam-se 500 células por poço, às quais foram adicionados 3 mL de meio de cultura. As placas de cultura assim preparadas foram colocadas na incubadora durante 24 horas de modo a promover a adesão celular. Passado este tempo, cada um dos poços foi submetido a tratamento com gossipol ou com quercetina. As condições testadas estão descritas na tabela 3 e as concentrações foram escolhidas com base nos valores de IC₅₀ obtidos após 48 horas de incubação com os referidos compostos, através do ensaio do MTT. Deste modo, testaram-se três concentrações para cada composto, uma correspondente ao valor aproximado ao IC₅₀, outra a uma concentração inferior e outra a uma concentração superior. Utilizou-se também um controlo, ou seja, células sem tratamento.

Tabela 3: Diferentes concentrações de quercetina e de gossipol com que as linhas celulares em estudo foram incubadas para a avaliação da sobrevivência celular pelo ensaio clonogénico.

	HepG2	HuH7	Hep3B2.1-7	TFK-1
Quercetina (µM)	5*; 38#; 100\$	5*; 91#; 200\$	5*; 50#; 100\$	5*; 49#; 100\$
Gossipol (µM)	1*; 2,5#; 15\$	1*; 4#; 15\$	0,25*; 1#; 15\$	1*; 4#; 15\$

#concentrações iguais ao IC₅₀; *concentrações inferiores ao IC₅₀; \$concentrações superiores ao IC₅₀.

Assim, 24 horas após a distribuição das células pelas placas, procedeu-se à incubação com quercetina ou com gossipol, durante 48 horas. Passado este tempo, o meio de cultura com o fármaco foi retirado e substituído por igual volume (3 mL) de meio de cultura novo. Este procedimento foi repetido ao 5º dia após o tratamento. Doze dias após o tratamento procedeu-se à visualização e à contagem das colónias. Para tal, após aspiração do meio de cultura, adicionaram-se 2 mL de PBS a cada um dos poços para lavagem. Aspirou-se o PBS e, seguidamente, adicionaram-se 2 mL de metanol a cada poço, durante 5 minutos, com o intuito de

fixar as colónias. Este procedimento foi efectuado duas vezes. Posteriormente aspirou-se o metanol e, após secagem das placas, foram adicionados 2 mL de uma solução de violeta de cristal (Sigma, M12128) a 0,5% em metanol (Sigma, 32213). Passados 5 minutos, aspirou-se o corante e lavaram-se as placas em água tépida, que foram posteriormente deixadas a secar. Após este procedimento, contou-se o número de colónias, o que permitiu calcular a eficiência da placa e o factor de sobrevivência de acordo com as equações seguintes:

$$\text{Eficiência da placa} = \frac{\text{número de colónias contadas}}{\text{número de colónias semeadas}} \times 100$$

Equação 2: Cálculo da *eficiência da placa*.

$$\text{Factor de sobrevivência} = \frac{\text{eficiência da placa das células tratadas}}{\text{eficiência da placa das células controlo}} \times 100$$

Equação 3: Cálculo do factor de sobrevivência.

Viabilidade e morte celular

Após a avaliação do efeito da quercetina e do gossipol na actividade metabólica e na sobrevivência celular, e uma vez estabelecidos os valores de IC₅₀ em resposta ao tratamento com os referidos compostos, avaliou-se o seu efeito na viabilidade celular.

Assim, incubaram-se as células, durante 48 horas, com as diferentes concentrações de quercetina ou de gossipol apresentadas na Tabela 3. Avaliaram-se também células não sujeitas a tratamento, ou seja, a condição considerada controlo.

A análise da viabilidade celular e dos tipos de morte celular induzida foi efectuada por citometria de fluxo, com recurso à dupla marcação com AV e IP de acordo com o protocolo anteriormente descrito.

Expressão de BAX e de BCL-2

Depois de avaliados os tipos de morte celular induzidos em resposta ao tratamento com quercetina e com gossipol procedeu-se à análise da expressão proteica de BAX e de BCL-2 em resposta ao tratamento com estes compostos nas diversas linhas celulares em estudo.

Para tal, incubaram-se as células com as concentrações de quercetina ou de gossipol apresentadas na Tabela 3, durante 48 horas. Utilizaram-se também controlos, ou seja, células não sujeitas a tratamento. O protocolo utilizado para a avaliação da expressão destas proteínas foi o mesmo que previamente se descreveu na componente de quimioterapia.

Avaliação do ciclo celular

A inibição da proliferação celular ou até o aparecimento de morte celular são muitas vezes acompanhadas por bloqueios em fases específicas do ciclo celular. Assim, com o intuito de determinar a existência de bloqueios no ciclo celular em resposta ao tratamento com gossipol e com quercetina e, em caso afirmativo, em que fase do ciclo ocorreram, utilizou-se o iodeto de propídio (IP). O IP tem a capacidade de se intercalar e se ligar na dupla cadeia de ADN. Deste modo, a quantidade de corante ligado será proporcional à quantidade de ADN existente na célula, conseguindo-se assim, quantificar o conteúdo de ADN e conhecer a distribuição das diversas populações celulares pelas diferentes fases do ciclo celular. Deste modo é possível identificar as várias populações de células nas diferentes fases do ciclo celular, como as fases G₀/G₁, a fase S e as fases G₂/M. É possível ainda determinar o aparecimento de uma população celular adicional, que se traduz por um pico pré-G₀, que é indicativo de apoptose, o qual é comumente denominado por pico apoptótico (Linke *et al.*, 1996).

Para a realização deste ensaio, as quatro linhas celulares em estudo foram incubadas durante 48 horas com as concentrações de quercetina e de gossipol indicadas na Tabela 3. Para além destas culturas que foram sujeitas a tratamento, células controlo foram mantidas sem tratamento. Passadas as 48 horas de incubação, as células tratadas e as células controlo foram destacadas, e as suspensões celulares transferidas para tubos que foram posteriormente centrifugados a 1300 G durante 5 minutos, descartando-se de seguida o

sobrenadante. Ao *pellet* resultante, adicionaram-se 200 µL de etanol a 70%, com o tubo em agitação no *vórtex*. De seguida incubaram-se os tubos a 4°C no escuro, durante 30 minutos de modo a promover a fixação celular. Após este tempo lavaram-se as células com 2 mL de PBS. Posteriormente, centrifugaram-se novamente as células a 1300 G durante 5 minutos e descartou-se o sobrenadante. Depois adicionaram-se 500 µL de uma solução de IP/RNase (Immunostep, PI/RNase solution), e incubaram-se as células à temperatura ambiente e no escuro, durante 15 minutos. Finalizado o procedimento, as células foram guardadas a 4°C até à análise no citómetro de fluxo. A detecção foi realizada num citómetro FACSCalibur utilizando a combinação de excitação e emissão referida para o iodeto de propídeo na análise da viabilidade celular e tipos de morte celular induzidos. Os resultados foram obtidos em percentagem de células existentes em cada fase do ciclo celular: fase pré-G0, fase G0/G1, fase S e fase G2/M. Para a análise e quantificação da informação, utilizou-se *software* específico (ModFit LT™, Verity Software House).

Stresse oxidativo

Como foi referenciado na contextualização teórica, alguns estudos têm indiciado que a quercetina se comporta como um composto pró-oxidante, outros referem ainda que este composto poderá ter alguma acção anti-oxidante (Ferraresi *et al.*, 2005; Seufi *et al.*, 2009). Também em relação ao gossipol, têm surgido trabalhos que apontam para o seu papel dual como anti-oxidante e pró-oxidante (Kovacic, 2003). Torna-se portanto imperativo, no âmbito deste trabalho, avaliar a produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) assim como das defesas anti-oxidantes.

O stresse oxidativo descreve um desequilíbrio entre a formação excessiva de espécies reactivas de oxigénio e as respectivas defesas antioxidantes. Desta forma, pequenas oscilações nas concentrações do estado basal destes oxidantes possuem um papel importante na sinalização intracelular (Turrens, 2003). A formação de ROS pode resultar de uma resposta a uma agressão celular ou a um tratamento com um determinado composto. Entre as ROS mais importantes encontram-se os peróxidos e o radical superóxido. Para além das ROS e/ou como resposta à produção das mesmas, ocorre também a produção de defesas antioxidantes, tais como a glutathiona (GSH). O balanço existente entre as ROS e as defesas antioxidantes é de elevada importância, uma vez que permite manter a

homeostase celular.

Deste modo, com o intuito de avaliar a produção de peróxidos e de radical superóxido e a expressão de GSH em resposta ao tratamento com quercetina ou com gossipol, incubaram-se as linhas celulares em estudo, durante 48 horas, com as concentrações dos compostos, referenciadas na Tabela 3. Avaliaram-se também células não sujeitas a tratamento, que serviram como controlo negativo.

Para avaliar a produção intracelular de peróxidos, utilizou-se a citometria de fluxo com recurso à sonda DCFH2-DA (2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato). O composto DCFH2-DA é uma sonda fluorescente lipossolúvel que possui a capacidade de atravessar a membrana celular. Uma vez no espaço intracelular, este composto acumula-se no citosol, onde é desacetilado por esterases, sob a forma de 2'-7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH), um produto não fluorescente. Na presença de peróxidos, o DCFH é oxidado e dá origem a 2'-7'-diclorofluoresceína (DCF), um composto que emite fluorescência. Assim, a intensidade de fluorescência é proporcional à concentração de peróxidos intracelulares, nomeadamente (mas não só) do peróxido de hidrogénio (Dikalov *et al.*, 2007).

Deste modo, após o período de incubação com os compostos, destacaram-se as células que foram posteriormente centrifugadas durante 5 minutos a 1300 G. De seguida, descartou-se o sobrenadante, e lavou-se o *pellet* resultante através da adição de 2 mL de PBS e posterior centrifugação a 1300 G durante 5 minutos. Descartou-se novamente o sobrenadante, ressuspenderam-se as células com 1 mL de PBS e adicionaram-se 3 µL de DCFH2-DA (Sigma, 35848) na concentração de 1 mM, solubilizado em DMSO, de modo a obter uma concentração final de 3 µM. Incubaram-se as células durante 45 minutos a 37°C, no escuro. Passado este tempo, adicionaram-se 2 mL de PBS à suspensão celular, e procedeu-se a uma nova centrifugação a 1300 G durante 5 minutos. Por fim, descartou-se o sobrenadante, ressuspenderam-se as células em 400 µL de PBS e guardaram-se a 4°C até aquisição no citómetro de fluxo. A detecção foi feita utilizando os comprimentos de onda de 504 nm para a excitação e de 529 nm para a emissão. Os resultados obtidos foram expressos em termos de MIF e, posteriormente, normalizados em relação ao valor obtido na correspondente condição controlo.

Para avaliar a produção intracelular de radical superóxido, recorreu-se à citometria de fluxo com utilização da sonda DHE (dihidroetidina). O DHE atravessa facilmente as membranas celulares para o espaço intracelular, ocorrendo aí a sua conversão a etídio através da acção do radical superóxido. O etídio é um composto

vermelho fluorescente que possui a capacidade de se intercalar no ADN e permanecer no interior da célula. Esta reacção é relativamente específica para o radical superóxido, ocorrendo oxidações mínimas pelo peróxido de hidrogénio, pelo peróxido de nitrito ou pelo ácido hipocloroso (Dikalov *et al.*, 2007).

Assim, após a incubação com os compostos, as células foram tripsinizadas e posteriormente centrifugadas a 1300 G durante 5 minutos. O *pellet* obtido a partir desta centrifugação foi ressuspensão em 2 mL de PBS e novamente centrifugado a 1300 G durante 5 minutos. Após decantar o sobrenadante, ressuspenderam-se as células em 1 mL de PBS e adicionaram-se à suspensão celular 5 µL de DHE, na concentração de 1 mM (Sigma, D7008) solubilizado em DMSO, de modo a obter uma concentração final de 5 µM. Incubaram-se as células, com esta solução, durante 15 minutos no escuro, à temperatura ambiente e, posteriormente, lavou-se a suspensão celular com 2 mL de PBS e centrifugou-se a 1300 G durante 5 minutos. Por fim, descartou-se o sobrenadante, ressuspendeu-se o *pellet* em 400 µL de PBS e guardou-se esta suspensão celular a 4°C até à análise no citómetro de fluxo. No citómetro a detecção foi realizada utilizando o comprimento de onda de excitação de 620 nm. Os resultados obtidos foram expressos em termos de MIF e *à posteriori* normalizados em relação aos resultados obtidos na condição de controlo.

Com o intuito de avaliar a expressão intracelular de glutationa, uma defesa anti-oxidante não enzimática, recorreu-se também à técnica de citometria de fluxo, utilizando o alaranjado de mercúrio, um composto fluorescente. O alaranjado de mercúrio reage rapidamente com a GSH dando origem a um produto de reacção que emite fluorescência vermelha quando excitado com uma luz com comprimento de onda de 488 nm (Hedley & Chow, 1994).

Para a realização deste ensaio, terminado o tempo de incubação com os compostos destacaram-se as células por tripsinização e centrifugaram-se as mesmas a 1300 G durante 5 minutos, descartando-se de seguida o sobrenadante. Posteriormente, ressuspendeu-se o *pellet* resultante em 1 mL de PBS, e adicionaram-se 4 µL de uma solução de alaranjado de mercúrio (Sigma, M7750) na concentração de 10m M diluído em acetona (Sigma, 34850). Homogeneizou-se a suspensão celular e incubou-se a 37°C, no escuro, durante 15 minutos. De seguida, lavou-se a suspensão celular com 2 mL de PBS e centrifugou-se a 1300 G durante 5 minutos. Após descartar o sobrenadante, ressuspendeu-se o *pellet* em 400 µL de PBS e guardou-se a suspensão celular a 4°C. A avaliação foi feita no citómetro de fluxo utilizando o comprimento de onda de emissão de 620 nm e os resultados obtidos foram expressos em termos de MIF e, posteriormente, normalizados em

relação aos valores obtidos na condição de controlo correspondente.

Expressão de P53

Sabe-se que a proteína P53 tem um papel fundamental na oncogénese e na resposta à terapêutica em diversos tipos de cancro incluindo os tumores primários do fígado. Para além disso, está descrito que as linhas celulares em estudo variam na expressão desta proteína tornando-se imperativa a avaliação da expressão da P53 nas linhas celulares de carcinoma hepatocelular e de colangiocarcinoma em estudo, em condições basais e em resposta ao tratamento com quercetina e com gossipol.

Para avaliar a expressão de P53 usou-se a técnica de *western blot*. As diferentes linhas celulares foram incubadas, durante 48 horas, com as diferentes concentrações de quercetina e de gossipol referenciadas na Tabela 3.

Numa primeira fase, foi necessário preparar extractos de proteína total de todas as linhas celulares em estudo, para todas as condições testadas. Assim, utilizaram-se frascos de cultura de 25 cm² e, quando a confluência das culturas atingiu valores próximos dos 90%, procedeu-se à incubação com os compostos referidos. Passadas as 48 horas de incubação, o meio de cultura foi descartado, e as células lavadas 3 vezes com PBS frio. A cada frasco de cultura foram adicionados 200 µL de tampão de lise, tendo-se utilizado o tampão RIPA (do inglês *radio-immunoprecipitation assay buffer*), constituído por 150 mM de NaCl (Sigma, S7653), 50 mM de Trizma base (Sigma, T1503), 5m M de ácido tetracético etileno glicol (EGTA, do inglês *ethylene glycol tetraacetic acid*) (E4378), 1% de Triton (Merk, K34979403), 0,5% de desoxicolato de sódio e 1% de dodecil sulfato de sódio (SDS, do inglês *sodium dodecyl sulphate*) (Sigma, 436143), que foi suplementado, no momento da utilização, com um cocktail de inibidores de proteases, o complete mini (Roche, 11836153001) e um inibidor das fosfatases, o phosSTOP (Roche, 04906837001) nas concentrações recomendadas e 1 mM de ditioneitol (DTT) (Sigma, 43815). Com o auxílio de raspadores soltaram-se e lisaram-se as células da superfície do frasco, transferindo-se posteriormente o lisado para microtubos que foram mantidos em gelo. De seguida, após agitação no *vórtex*, as amostras foram sonicadas três vezes durante cerca de 10 segundos em cada sonicação, utilizando para tal uma amplitude de 30% de um sonicador Vibra Cell (Sonic and Materials inc. EUA, modelo: VC50 de 240V, 50W e 20KHz). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 14000 G, numa centrífuga refrigerada a 4°C durante 10 minutos. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram transferidos para novos microtubos devidamente identificados e as amostras foram guardadas a -80°C.

A proteína total foi quantificada pelo método do ácido bicinonínico (BCA,

do inglês *bicinchoninic acid*) (BCATM Protein Assay kit, Pierce). Depois de efectuada a quantificação proteica, as amostras foram desnaturadas a 100°C durante 5 minutos após solubilização em solução desnaturante constituída por 250 mM de Tris-HCl, com pH de 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 das proteínas em SDS-PAGE (do inglês, *sodium dodecyl sulphate – poly-acrilamide gel electrophoresis*) prepararam-se géis de 10% de acrilamida (Bio-Rad, 161-0158), que foram posteriormente colocados na tina de electroforese com tampão constituído por 25 mM de Trizma base, 192 mM de glicina e 0,1% de SDS com pH de 8,3 (Bio-Rad). Em seguida, procedeu-se à colocação do padrão de pesos moleculares (Precision PlusStandards, Dual Color, Bio-rad, 161-0373) e das amostras nos poços do gel. O protocolo de electroforese consistiu na aplicação de uma diferença de potencial de 80 V durante cerca de 30 minutos, após os quais se aumentou a diferença de potencial para 150 V. Terminado o período de electroforese colocaram-se os géis em contacto directo com as membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF, do inglês *polyvinylidene fluoride*; Bio-Rad) previamente activadas com metanol (Sigma, 32213).

Em seguida realizou-se a electrotransferência utilizando um tampão de 100 mM de CAPS (*N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid*) (Sigma, C2632), com pH de 11, e 10% de metanol e com a aplicação de uma diferença de potencial de 100 V durante uma hora. Após a electrotransferência coraram-se as membranas com ponceau S (Sigma, P7170). As membranas foram lavadas com TBS-T a 1%, para remoção do corante em excesso, e bloqueadas com uma solução TBST-BSA a 4% (do inglês *tris-buffered saline tween-20 – bovine serum albumine*). Posteriormente, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário anti-P53 (Santa Cruz Biotech, Sc-47698) durante a noite, a 4°C, sob agitação constante. No dia seguinte, lavaram-se as membranas com TBS-T a 1% e, posteriormente, incubaram-se com o anticorpo secundário apropriado (anti-mouse, GE) sob agitação constante, durante uma hora à temperatura ambiente. No final da incubação com o anticorpo secundário procedeu-se a novo ciclo de lavagens das membranas com TBS-T a 1% e, no final das lavagens, incubaram-se as membranas com o substrato enzimático ECF (ECF Western Blotting Reagent Pack, Amershan Biosciences) durante aproximadamente 5 minutos. Após este tempo, as membranas foram reveladas utilizando um leitor de fluorescência (Typhoon FLA 9000).

Seguidamente, as membranas foram activadas e submetidas à imunodeteccção com o anticorpo anti-actina (Sigma, A5441) conforme o

procedimento descrito para o anticorpo anterior.

Após a aquisição das imagens, o processamento das bandas foi realizado com recurso 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, ou seja, de 53 KDa no caso da P53 e de 42 KDa para a actina. Realizou-se em seguida o cálculo da razão entre a intensidade da banda da P53 e a intensidade da banda da actina.

Danos no ADN

No âmbito deste trabalho, realizou-se a electroforese em microgel de agarose, também conhecida como ensaio cometa, com o intuito de avaliar a extensão dos danos causados no ADN por acção do tratamento com quercetina ou com gossipol nas linhas celulares em estudo.

O ensaio cometa é uma técnica simples e sensível para a detecção e avaliação de danos nas cadeias de ADN em células eucarióticas (Singh *et al.*, 1988; Ostling, 1984; Collins, 2004; Olive & Banáth, 2006). Neste ensaio, o ADN sem danos apresenta-se como uma esfera densa e compacta sem arrastamento de fragmentos, enquanto nas células com ADN danificado, ou seja, com quebras das cadeias, se apresenta com uma cauda que traduz o arrastamento dos fragmentos com vários pesos moleculares, que se assemelha à cauda de um cometa e que dá o nome ao ensaio. A cauda aparece quando se aplica uma diferença de potencial e os fragmentos de ADN negativamente carregados migram para o ânodo durante a electroforese. Neste teste, o tamanho e a forma da cauda reflectem a extensão dos danos causados na molécula de ADN, constituindo um método de avaliação quantitativa, pois a extensão dos danos celulares causados pode ser quantificada com recurso a *software* dedicado.

As condições de quercetina e de gossipol testadas foram as concentrações correspondentes aos IC₅₀ e superior aos IC₅₀, ou seja, os valores representados por # e por \$ na Tabela 3, tendo as células sido incubadas durante 48 horas. Em todos os ensaios foram preparadas em simultâneo culturas que serviram como controlo negativo, ou seja, culturas cujas células não foram sujeitas a tratamento e culturas correspondentes ao controlo positivo, em que houve incubação com peróxido de hidrogénio.

Para a realização deste procedimento, após a incubação com os compostos, prepararam-se suspensões celulares com 5X10⁴ células/mL. As células

correspondentes ao controlo positivo foram incubadas com 20 nM de uma solução de peróxido de hidrogénio (Panreac, 121076) à temperatura de 4°C durante 15 minutos. Findo o tempo de incubação, centrifugaram-se as células a 1300 G durante 5 minutos, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* resultante em PBS, num volume igual ao inicial, de modo a manter a concentração celular em 5×10^4 células/mL.

Lâminas de vidro StarFrost® (26X76mm) foram cobertas com uma fina camada de agarose de ponto de fusão normal (APFN) a 1% (Sigma, A2790) em apenas um dos lados, esperando-se de seguida que a agarose solidificasse. Posteriormente, preparou-se uma solução de agarose de baixo ponto de fusão (ABPF) a 1% (Sigma, A9414) e num microtubo adicionaram-se porções iguais de agarose ABPF e da suspensão celular previamente preparada. Homogeneizou-se a suspensão, e espalhou-se 1 mL da mesma sobre uma das lâminas previamente cobertas com APFN. Em seguida, cobriu-se a suspensão celular, já nas lâminas, com uma lamela e deixou-se arrefecer à temperatura de 4°C durante 30 minutos, sendo depois retirada a lamela. Incubaram-se as lâminas durante a noite e à temperatura de a 4°C com a solução de lise alcalina, preparada de fresco, que continha 2,5 M de NaCl, 100 mM de EDTA (do inglês *ethylenediaminetetraacetic acid*), 10 mM de Trizma base, 10% de DMSO e 1% de Triton®X-100. No dia seguinte, as lâminas foram submersas em tampão de electroforese de pH superior a 13, igualmente preparado de fresco, e constituído por 30 mM de NaOH (Merk, C294798) e 1 mM de EDTA (Sigma, E4884) e deixou-se durante pelo menos uma hora em equilíbrio. Realizou-se a electroforese num único passo de 15 minutos, aplicando-se uma diferença de potencial de 25 V. Terminada a electroforese, embeberam-se as lâminas em solução de neutralização de Tris-HCl na concentração de 0,4 M durante 5 minutos. Repetiu-se este último passo durante 3 vezes, descartando-se sempre a solução de neutralização. Com o auxílio de uma pipeta, dispensaram-se algumas gotas de brometo de etídio (Bio-Rad, 161-0433) na concentração de 25 µg/mL sobre as lâminas neutralizadas, ficando as mesmas protegidas da luz durante 20 minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água ultra-pura de modo a remover o excesso de brometo de etídio.

A aquisição e a análise das imagens foram realizadas num microscópio de fluorescência invertido, utilizando uma ampliação de 250X, e um filtro de excitação de 546 nm utilizando uma lâmpada de mercúrio com uma potência de 100 W, sendo a emissão de fluorescência monitorizada a 580 nm no reflector com um filtro a 590 nm.

A obtenção e o processamento das imagens dos cometas foram efectuados com o auxílio do *software* Motic Images versão 2.0 (Microscope World). A análise

dos cometas foi efectuada com recurso ao *software* TriTek CometScore™ Freeware versão 1.5, que permite o cálculo de dezassete parâmetros que contribuem para a compreensão do grau de lesão do ADN. Assim, neste estudo, considerámos três parâmetros que são essenciais neste tipo de análise, sendo eles, o comprimento da cauda do cometa, a percentagem de ADN presente na cauda e o momento da cauda do cometa que relaciona os dois parâmetros anteriores.

Avaliação da expressão de GLUT-1

No âmbito desta dissertação foi de importância primordial avaliar a expressão proteica do GLUT-1 em resposta ao tratamento com os inibidores competitivos do mesmo. Assim, a expressão membranar e citoplasmática deste transportador foi avaliada em células controlo, isto é, em células que não foram expostas a qualquer tratamento, e em células incubadas durante 48 horas com as concentrações de quercetina e de gossipol apresentadas na Tabela 3.

A análise da expressão proteica de GLUT-1 foi efectuada por citometria de fluxo, em células cultivadas em meio de cultura HG e em meio de cultura LG, de acordo com o protocolo descrito anteriormente.

Estudo funcional do GLUT-1

Uma vez que a quercetina e o gossipol são inibidores competitivos do GLUT-1, um dos principais transportadores de ^{18}F -FDG, a avaliação da cinética de captação do referido traçador na presença e na ausência destes compostos poderá fornecer uma informação fundamental acerca da inibição funcional deste transportador. Deste modo, realizaram-se estudos de captação de ^{18}F -FDG em células não tratadas que correspondem ao estudo de controlo e em células incubadas durante uma hora com as concentrações de quercetina ou de gossipol assinaladas por # na Tabela 3. As concentrações correspondem ao valor de IC_{50} após 48 horas de incubação com os referidos compostos.

Para a realização dos estudos de captação de ^{18}F -FDG as linhas celulares foram cultivadas em meio de cultura HG e em meio de cultura com LG e, após tripsinização, incubadas durante uma hora com as concentrações de quercetina e gossipol referenciadas. Findo esse tempo procedeu-se aos estudos de captação de ^{18}F -FDG de acordo com o protocolo anteriormente descrito.

Terapia combinada

A combinação de fármacos tem sido utilizada em tratamentos de diversas doenças com o intuito de obter efeitos sinérgicos ou potenciadores e diminuir os efeitos secundários. Deste modo, têm sido equacionados diversos modelos que visam clarificar o potencial terapêutico da combinação de fármacos em diversas doenças, onde se inclui o cancro. O raciocínio que está por detrás da terapia combinada tem como base a possibilidade de se atingir ao mesmo tempo vários alvos da doença, reduzindo a toxicidade para o doente (Chou, 2007).

No caso do cancro, para além da associação entre fármacos comumente utilizados em quimioterapia, tem igualmente sido investigado o efeito combinado destes fármacos com compostos naturais, pelo que se estudou o efeito combinado da quercetina ou do gossipol com a doxorrubicina ou o sorafenib. O facto destes compostos naturais e dos fármacos utilizados na prática clínica possuírem mecanismos de acção diferentes poderá constituir uma arma terapêutica bastante promissora no combate aos tumores primários do fígado.

Deste modo, para avaliar o tipo de resposta induzida pela combinação da quercetina ou do gossipol com o sorafenib ou a doxorrubicina, utilizou-se o método de Chou Talalay com o intuito de verificar se o tratamento combinado induz sinergia, adição ou antagonismo (Chou & Talalay, 1984). A utilização deste método pretende avaliar o tipo de resposta produzida a nível da actividade metabólica utilizando os valores de IC₅₀ obtidos em cada uma das terapias isoladamente e em combinação, calculando-se o índice de combinação (IC) através da equação seguinte:

$$IC = \frac{(D)_1}{(D_x)_1} + \frac{(D)_2}{(D_x)_2}$$

Equação 4: Cálculo do índice de combinação (T. Chou & Talalay, 1984).

Nesta equação, IC representa o índice de combinação, (D)1 o valor do IC₅₀ obtido em resposta ao tratamento com o fármaco 1 sozinho, (D)2 representa o valor de IC₅₀ obtido para o efeito isolado do fármaco 2, e (Dx)1 e (Dx)2 representam os valores de IC₅₀ obtidos em combinação para os fármacos 1 e 2, respectivamente. Quando os valores de IC obtidos são inferiores a 1 significa que se obtem sinergia, para valores iguais a 1 significa que ocorre adição, e quando os

valores são superiores a 1 verifica-se antagonismo.

Assim, para avaliar a resposta combinada da doxorrubicina ou do sorafenib com a quercetina ou com o gossipol, optou-se por incubar as células com um valor fixo de quercetina ou de gossipol, inferior ao IC₅₀ ($\frac{1}{4}$ do valor do IC₅₀) anteriormente obtido após 48 horas de incubação com estes compostos isoladamente, e com concentrações crescentes de doxorrubicina ou de sorafenib. Incubaram-se pois as células com as concentrações de quercetina, ou de gossipol representadas na Tabela 4, e as concentrações de doxorrubicina utilizadas variaram entre 250 nM e 100 μ M e no caso do sorafenib utilizaram-se concentrações entre 12,5 nM e 30 μ M.

Tabela 4: Concentrações de quercetina e de gossipol com que as diferentes linhas celulares foram incubadas para a análise do efeito combinado com doxorrubicina ou com sorafenib.

	HepG2	HuH7	Hep3B2.1-7	TFK-1
Quercetina (μ M)	9,42	22,65	12,59	12,25
Gossipol (μ M)	0,55	1,06	0,22	1,09

A adição do sorafenib ou da doxorrubicina efectuou-se em simultâneo com a adição de quercetina ou de gossipol, e a avaliação da resposta produzida a nível da actividade metabólica foi avaliada com recurso ao teste do MTT, 48 horas após a incubação com os compostos naturais, de acordo com o método anteriormente descrito.

Terapia génica

Alguns estudos indicam que o GLUT-1 está sobreexpresso no carcinoma hepatocelular o que promove a tumorigénese e aumenta a resistência às terapias actualmente utilizadas (Amann & Hellerbrand, 2009; Amann *et al.*, 2009). A utilização de métodos farmacológicos para inibição deste transportador apresenta alguma inespecificidade e não permite a identificação de alguns mecanismos moleculares envolvidos neste processo. Nesse sentido, realizou-se também neste trabalho experimental a inibição génica do GLUT-1 com recurso a shRNA.

Transfecção celular

De modo a silenciar o GLUT-1 utilizou-se um vector contendo um shRNA e não um siRNA, com o objectivo de obter uma linha celular com uma transfecção estável durante mais tempo. Para este procedimento apenas se utilizou a linha celular HuH7 por ser aquela que apresentou maior expressão deste transportador.

Iniciou-se o trabalho experimental com a optimização da concentração de puromicina (Bioaustralis, BIA-P1230) a utilizar. A puromicina foi escolhida por ser um antibiótico utilizado em biologia celular para seleccionar linhas celulares que tenham sido transformadas com vectores que expressem a puromicina-N-acetil-transferase.

Assim, células HuH7 foram distribuídas por placas de 48 poços e quando a confluência celular atingiu cerca de 70% adicionaram-se a alguns poços 1 µg/mL de puromicina, a outros 5 µg/mL e a outros ainda 10 µg/mL. Para cada condição a experiência foi realizada em triplicado e para além disso, repetiu-se em três dias diferentes. Ao terceiro, quarto e quinto dia após a incubação com puromicina determinou-se a viabilidade celular com recurso ao teste de exclusão do azul de tripano. Verificou-se que ao quinto dia, para todas as concentrações de puromicina testadas, a viabilidade celular era de 0%, pelo que se escolheu a concentração de 1 µg/mL para os passos seguintes.

Nesta parte da componente experimental utilizou-se um vector contendo três plasmídeos lentivirais específicos, codificando cada um entre 19 a 25 nucleótidos, e dirigidos a alvos específicos com o intuito de inibir a expressão de GLUT-1 (Glut1 shRNA Plasmid (h): sc-35493-SH, Santa Cruz Biotechnology). Cada plasmídeo contém um gene de resistência à puromicina de modo a seleccionar as células que estavelmente expressem o shRNA.

Para proceder ao protocolo de transfecção começou por se distribuir a linha celular em estudo para placas de 6 poços. As células foram colocadas a repousar na incubadora de modo a promover a adesão celular e monitorizaram-se as células até se atingir uma confluência de cerca de 90%. Posteriormente, tripsinizaram-se as células, inibiu-se a acção da tripsina com o meio de cultura apropriado e procedeu-se à contagem celular com recurso a um hemocitómetro. De seguida, em microtubos centrifugaram-se 1×10^6 células a 150 G durante 10 minutos, de modo a promover a obtenção de um *pellet*.

Paralelamente, colocaram-se 100 µL de meio de cultura apropriado sem FBS num microtubo, ao qual se adicionaram 2 µg do vector que havia sido previamente dissolvido em água ultra-pura de modo a obter uma concentração de

0,1 µg/µL. Num outro microtubo diluíram-se 8 µL do reagente de transfecção polyjet (SL100688, SigmaGen Laboratories) em meio de cultura apropriado sem FBS, após o que se juntaram as duas soluções homogeneizando bem.

Às células anteriormente centrifugadas retirou-se o meio de cultura e ressuspendeu-se o *pellet* resultante com a mistura de soluções preparada. Esta suspensão celular foi sujeita a uma incubação de 20 minutos numa incubadora de CO₂ à temperatura de 37°C. Terminado este tempo adicionaram-se 2 mL de meio completo à suspensão celular que foi transferida para uma placa de 6 poços. As células ficaram a incubar a 37°C, numa atmosfera enriquecida com 5% de CO₂ durante 12 horas após as quais se mudou o meio de cultura. Passadas 48 horas incubaram-se as células com 1 µg/µL de puromicina em meio de cultura. A incubação com puromicina foi realizada durante 20 dias, de modo a promover a selecção celular, sendo o meio de cultura mudado todos os dias.

Após este tempo, promoveu-se à expansão das células restantes, e a linha celular resultante deste processo foi a partir daí denominada de HuH7shGLUT1.

Expressão de GLUT-1

Com o intuito de comprovar a eficácia da transfecção recorreu-se à técnica de *western blot*, para determinar os níveis de expressão de GLUT-1. Para tal efectuaram-se extractos proteicos da linha celular transfectada, a HuH7shGLUT1 e também da linha celular parental, a HuH7 e, de acordo com o procedimento anteriormente descrito para a análise da expressão de P53 por *western blot*, procedeu-se de seguida à quantificação proteica pelo método do BCA e ao *western blot* de acordo com as metodologias também anteriormente descritas. Utilizou-se o anticorpo primário anti-GLUT1 (sc-7903, Santa Cruz Biotechnology) e o anticorpo secundário apropriado (anti-rabbit, GE).

Seguidamente, as membranas foram activadas e submetidas à imunodeteccção com o anticorpo anti-actina (Sigma, A5441) conforme o procedimento anteriormente descrito. Realizou-se em seguida o cálculo da razão entre a intensidade da banda do GLUT-1 e a intensidade da banda da actina.

Actividade metabólica

Depois de comprovada a eficácia da transfecção avaliou-se a actividade

metabólica da linha celular resultante. Assim, em placas de 24 poços distribuíram-se por 6 poços 500 μL de uma suspensão celular com 5×10^4 células/mL da linha celular HuH7shGLUT1 e 6 poços com a mesma concentração celular da linha parental HuH7. Passadas 24, 48 e 72 horas após esta distribuição pelos poços da placa, procedeu-se à avaliação da actividade metabólica, recorrendo ao teste do MTT, de acordo com o descrito anteriormente.

O efeito da transfecção na actividade metabólica foi avaliado através do cálculo da razão entre a actividade metabólica da linha celular transfectada e da linha celular parental.

De modo a avaliar o efeito dos fármacos anteriormente testados (cisplatina, doxorrubicina, 5-fluorouracilo e sorafenib) na actividade metabólica da linha celular HuH7shGLUT1, numa placa de 24 poços distribuíram-se 500 μL por poço de uma suspensão celular com 5×10^4 células/mL da referida linha celular. Vinte e quatro horas após a distribuição pelos poços incubaram-se as células com concentrações de cisplatina, doxorrubicina, 5-fluorouracilo e sorafenib semelhantes aos IC_{50} obtidos para estes fármacos na linha parental para as 48 horas de incubação. Esses valores estão representados na Tabela 5. Reservaram-se também poços controlo e poços incubados com ambos os solventes utilizados, o DMSO e o soro fisiológico.

Tabela 5: Concentrações de cisplatina, doxorrubicina, 5-fluorouracilo e sorafenib com que a linha celular HuH7shGLUT1 foi incubada para a avaliação da actividade metabólica.

	Concentração (μM)
Cisplatina	3,50
Doxorrubicina	0,25
5-fluorouracilo	390
Sorafenib	18

Passado o tempo de incubação mencionado (48 horas), procedeu-se ao já descrito teste do MTT, seguindo o protocolo apresentado anteriormente, de modo a avaliar o efeito na actividade metabólica.

Viabilidade e morte celular

Com o intuito de avaliar o efeito da doxorrubicina, do 5-fluorouracilo e do

sorafenib na viabilidade celular e também avaliar o tipo de morte celular induzida incubaram-se as células HuH7shGLUT1, durante 48 horas com as concentrações de doxorubicina, 5-fluorouracilo e sorafenib referenciadas na tabela 5. Passado este tempo avaliou-se a viabilidade celular através da citometria de fluxo e com recurso à dupla marcação com AV e IP, seguindo a metodologia anteriormente descrita. Optou-se por não se efectuar este ensaio com cisplatina, uma vez que os resultados obtidos através da actividade metabólica não haviam demonstrado diferenças em relação à linha celular parental (HuH7).

Análise estatística

A análise estatística foi realizada com recurso ao *software* IBM® SPSS® Statistics, versão 20.0 (IBM Corporation, Armonk, New York, EUA). A análise descritiva das variáveis quantitativas em estudo foi realizada pelo cálculo de estimadores de tendência central, de dispersão e de localização.

Na análise inferencial, a normalidade de distribuição das variáveis quantitativas foi avaliada segundo o teste de Shapiro-Wilk.

A comparação entre as condições experimentais para cada linha celular no que respeita à viabilidade celular, ao ciclo celular e aos parâmetros do ensaio cometa foi realizada segundo o teste análise de variância (ANOVA) de um factor (no caso de distribuição normal e homogeneidade de variâncias) ou segundo o teste Kruskal-Wallis (caso contrário). As comparações múltiplas foram realizadas segundo a correcção de Bonferroni.

Na comparação da razão BAX/BCL-2, das ROS, da GSH, dos ensaios clonogénicos, da expressão de GLUT-1 membranar e citoplasmático e da actividade metabólica entre as condições experimentais e o controlo para cada linha celular foi utilizado o teste t de Student para uma média, comparando os valores experimentais obtidos com o valor de padronização 1, com correcção de Bonferroni para comparações múltiplas. Na comparação entre as restantes condições experimentais, foi utilizado o teste t de Student para amostras independentes no caso de haver normalidade da distribuição dos valores ou o teste de Mann-Whitney em caso contrário, ambos corrigidos para comparações múltiplas segundo Bonferroni.

A comparação entre a expressão de GLUTs membranar e citoplasmático para cada linha celular foi realizada de acordo com o teste t de Student para amostras emparelhadas (caso se tenha verificado normalidade das distribuições)

ou o teste de Wilcoxon (caso contrário), com correcção de Bonferroni para comparações múltiplas.

Na comparação das diferentes variáveis quantitativas entre linhas celulares (para as mesmas condições experimentais) foram utilizados os testes ANOVA de um factor (no caso de distribuição normal e homogeneidade de variâncias) ou segundo o teste Kruskal-Wallis (caso contrário), com comparações múltiplas com correcção de Bonferroni.

A determinação de IC₅₀ foi feita por ajuste dos dados experimentais a uma curva sigmoideal, utilizando o *software* OriginPro (OriginLab Corporation, Northampton, EUA), versão 8.0, segundo a equação 5:

$$Actividade\ Metabólica = \frac{100}{1 + 10^{(\log(IC_{50}) - \log C) \times p}}$$

Equação 5: Determinação do IC₅₀ através da actividade metabólica.

onde C representa a concentração (variável independente), p o declive da curva na sua porção central e IC₅₀ a concentração para a qual a actividade metabólica é reduzida a metade. Os IC₅₀ obtidos foram comparados com recurso ao teste ANOVA de um factor, com comparações múltiplas segundo a correcção de Bonferroni. Nos estudos de combinação, foram ainda determinados os índices de combinação, segundo o método de Chou & Talalay (Chou & Talalay, 1984).

Na análise das captações, os valores experimentais obtidos para cada condição experimental foram ajustados a um modelo exponencial utilizando o *software* OriginPro (OriginLab Corporation, Northampton, EUA), versão 8.0, através da equação 6:

$$Captação\ (\%) = A_{máx} \cdot (1 - e^{\ln(2) \cdot t / T_{50}})$$

Equação 6: Cálculo da percentagem de captação.

onde A_{máx} representa a % de captação máxima obtida (steady state) e T₅₀ representa o tempo que demora a ser atingida metade 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 análise da retenção de ¹⁸F-FDG e ^{99m}Tc-MIBI, os valores experimentais

obtidos foram ajustados a um modelo exponencial utilizando o *software* OriginLab v. 8.0, através da equação 7:

$$\text{Retenção (\%)} = A_{\min} + (100 - A_{\min}) e^{-\ln(2) \cdot t / T_{1/2}}$$

Equação 7: Cálculo da percentagem de retenção.

onde A_{\min} representa a % de retenção de ^{18}F -FDG ou $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI em equilíbrio (steady state) e $T_{1/2}$ representa o tempo que demora a ser atingido o valor de retenção correspondente a metade do efluxo máximo (considerando efluxo = 100 - retenção).

Os parâmetros obtidos foram comparados com recurso ao teste ANOVA de um factor, com comparações múltiplas segundo a correcção de Bonferroni.

Foi considerado um erro tipo I de 0,05 para todas as comparações.

Capítulo V

Resultados

Ao longo deste capítulo irão ser descritos os resultados obtidos. Começa-se por descrever as características morfológicas e imunocitoquímicas das linhas celulares em estudo, assim como a dinâmica do transporte dos radiofármacos ^{18}F -FDG e $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI nas mesmas linhas celulares. De seguida serão enumerados os resultados obtidos com os fármacos utilizados na prática clínica, passando posteriormente para os resultados obtidos com os inibidores competitivos do GLUT-1, a quercetina e o gossipol. Por fim serão enunciados os resultados adquiridos através da inibição genética do GLUT-1.

Cultura e caracterização das linhas celulares

Caracterização morfológica e expressão de P53, CK19, AFP, e KI67

Através das colorações de H&E e de Papanicolau caracterizaram-se morfológicamente as linhas celulares em estudo. As Figuras 12 e 13 esquematizam os resultados obtidos através dessas colorações.

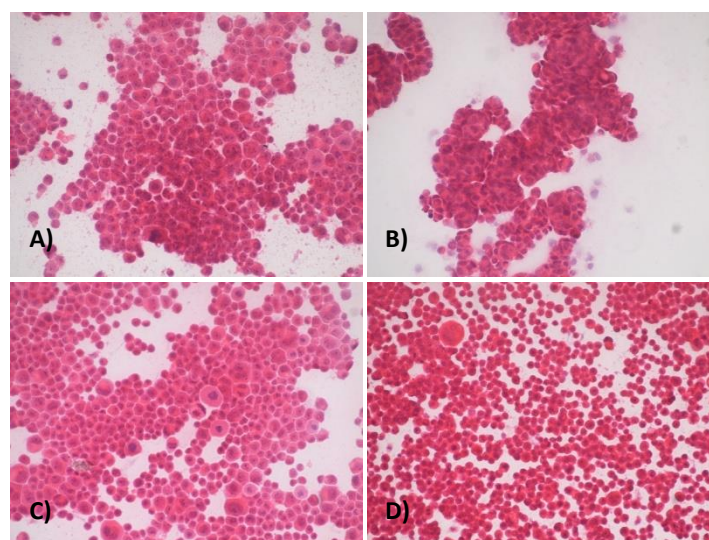


Figura 12: Morfologia das linhas celulares em estudo. As imagens são relativas à coloração H&E. As imagens A, B, C e D referem-se, respectivamente, às linhas celulares HepG2, HuH7, Hep3B2.1-7, e TFK-1 (ampliação 200X).

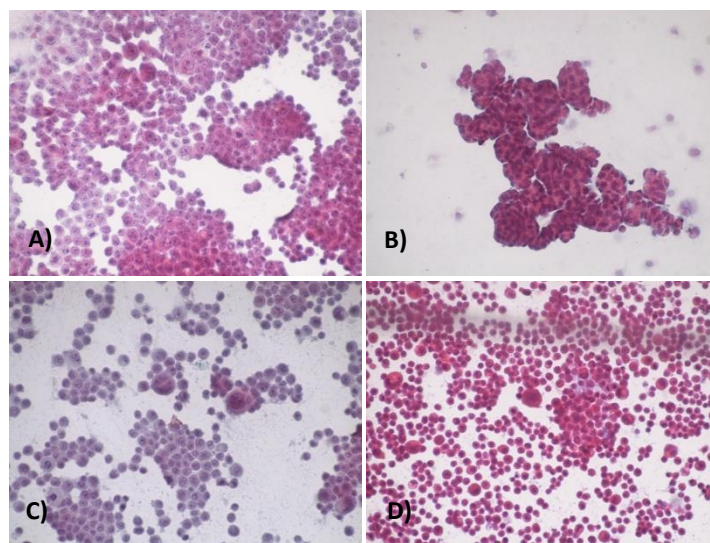


Figura 13: Morfologia das linhas celulares em estudo. As imagens são relativas à coloração papanicolau. As imagens A, B, C e D referem-se, respectivamente, às linhas celulares HepG2, HuH7, Hep3B2.1-7, e TFK-1 (ampliação 200X).

De acordo com as Figuras 12 e 13, no caso das linhas celulares HepG2 e Hep3B2.1-7 (Figuras 12 e 13 A e C) a análise morfológica revelou células com tamanho e forma variáveis, alto pleomorfismo nuclear, cromatina fina com nucléolo visível e citoplasma hipereosinofílico. Quanto à linha celular HuH7 (Figuras 12B e 13B) observou-se um pequeno grau de pleomorfismo nuclear, núcleo hiper Cromático e citoplasma hipereosinofílico. Relativamente à linha celular TFK-1 (Figuras 12D e 13D) presenciou-se uma elevada variação no tamanho e na forma das células, alto pleomorfismo nuclear, núcleo hiper Cromático com nucléolos ocasionalmente visíveis e citoplasma hipereosinofílico.

Os resultados obtidos através da avaliação imunohistoquímica da expressão de P53, CK19, de AFP e de KI67 estão representados nas Figuras 14, 15, 16 e 17, respectivamente.

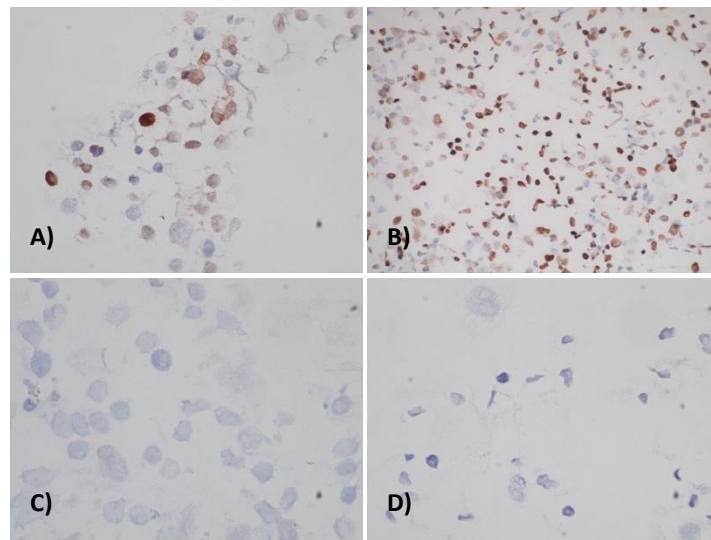


Figura 14: Imunohistoquímica da expressão de P53 nas linhas celulares HepG2 (A), HuH7 (B), Hep3B2.1-7 (C) e TFK-1 (D) (Ampliação 400X).

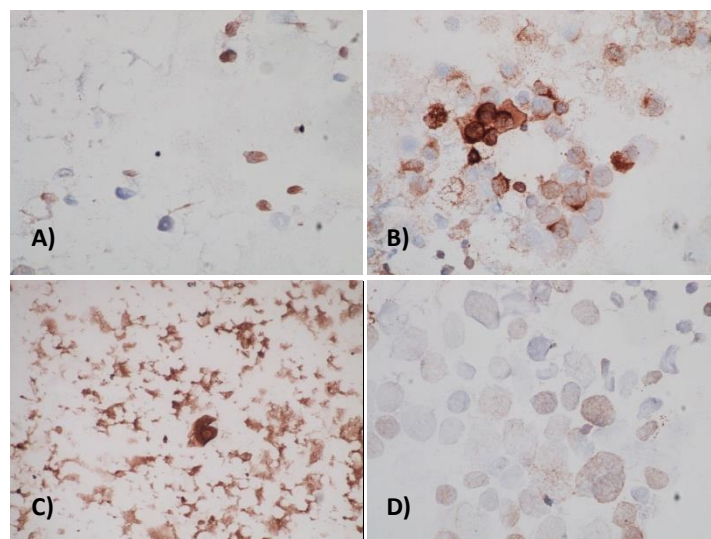


Figura 15: Imunohistoquímica da expressão de CK19 nas linhas celulares HepG2 (A), HuH7 (B), Hep3B2.1-7 (C) e TFK-1 (D) (Ampliação 400X).

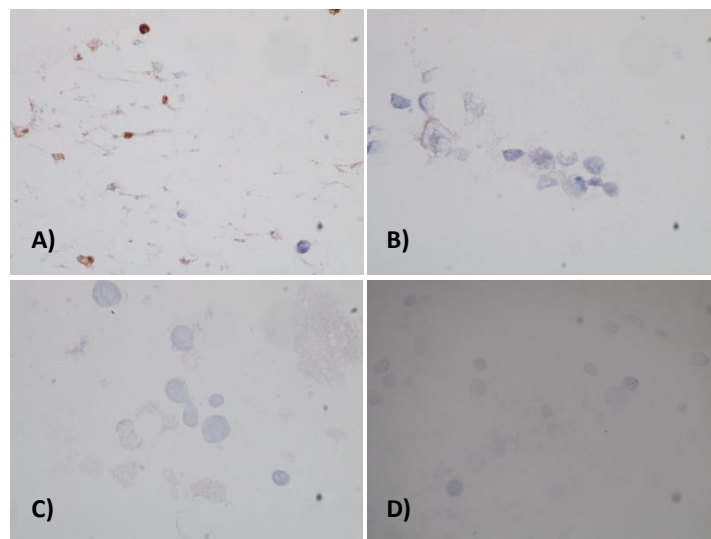


Figura 16: Imunohistoquímica da expressão de AFP nas linhas celulares HepG2 (A), HuH7 (B), Hep3B2.1-7 (C) e TFK-1 (D) (Ampliação 400X).

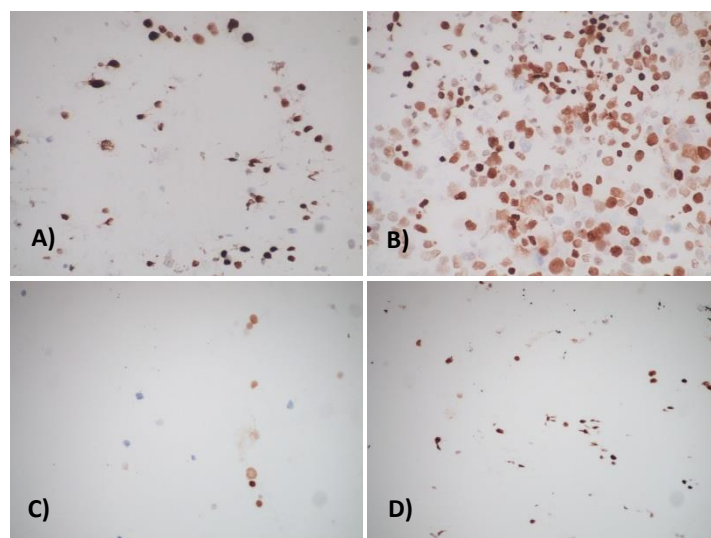


Figura 17: Imunohistoquímica da expressão de KI67 nas linhas celulares HepG2 (A), HuH7 (B), Hep3B2.1-7 (C) e TFK-1 (D) (Ampliação 400X).

De acordo com os resultados obtidos, para a linha celular HepG2, registou-se uma marcação citoplasmática de CK19 focal mas forte, e ao nível nuclear uma marcação igualmente focal e forte no que diz respeito à AFP. Observou-se ainda uma expressão de P53 na região nuclear de cerca de 30%, correspondendo à classificação 2, e um índice de proliferação (KI67) de cerca de 90%.

À semelhança da linha celular HepG2, as células HuH7 apresentaram no citoplasma uma marcação focal mas forte de CK19. Nesta linha celular, não se registou no entanto presença de AFP. A marcação nuclear de P53 foi de cerca de 80% (grau 4), e o índice proliferativo 90%.

A análise imunohistoquímica revelou que as células Hep3B2.1-7 têm marcação citoplasmática de CK19 forte e difusa, ausência de marcação para a AFP e para a P53 e um índice de proliferação de cerca da 50%.

Finalmente, a linha celular TFK-1 apresentou uma marcação citoplasmática de CK19 fraca e focal, ausência de expressão de AFP e P53 e um índice proliferativo de 90%.

Na Tabela 6 podemos ver, sumariamente, as características imunohistoquímicas das três linhas celulares.

Tabela 6: Classificação imunohistoquímica sumária das três linhas celulares relativamente à expressão de P53, CK19, AFP e KI67. A avaliação da expressão de CK19 e AFP foi feita qualitativamente e classificada enquanto ausente (A), focal (F), difusa (D), fraca (W) e forte (S). A expressão de P53 foi avaliada em termos de percentagem, e classificada de 0 a 4 em que 0 significa ausência de expressão, 1 expressão entre 1% a 25%, 2 entre 26% e 50%, 3 entre 51% e 75% e 4 entre 76% e 100%. Por sua vez a expressão de Ki67 foi avaliada em termos percentuais.

Linha celular	P53	CK19	AFP	KI67 (%)
HePG2	2	F/S	F/S	90%
HuH7	4	F/S	A	90%
Hep3B2.1-7	0	D/S	A	50%
TFK-1	0	F/W	A	90%

Estudo de transportadores

Nesta parte do trabalho experimental foram analisadas as expressões proteicas de cinco transportadores de glicose, nomeadamente os GLUTs -1, -2, -3, -5 e -12. Determinou-se a sua componente membranar e citoplasmática, para todas as linhas celulares em estudo, quando cultivadas em meio de cultura HG e também em meio de cultura LG. Os resultados obtidos para as linhas celulares HepG2,

HuH7, Hep3B2.1-7 e TFK-1 estão representados, respectivamente, nas Figuras 18, 19, 20 e 21.

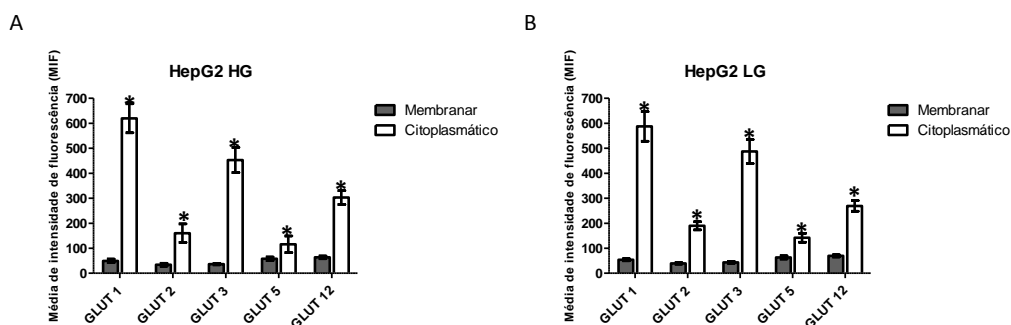


Figura 18: Expressão membranar e citoplasmática dos transportadores de glicose 1, 2, 3, 5 e 12 pela linha celular HepG2. As células foram cultivadas em meio com elevado teor de glicose (25 mM) (A) e em meio com baixo teor de glicose (5 mM) (B). Os níveis de expressão estão representados em termos de média de intensidade de fluorescência (MIF). A figura representa a média e o desvio padrão de quatro experiências independentes. As diferenças estatisticamente significativas entre a expressão membranar e citoplasmática de um mesmo GLUT estão representadas por * que significa $p < 0,05$.

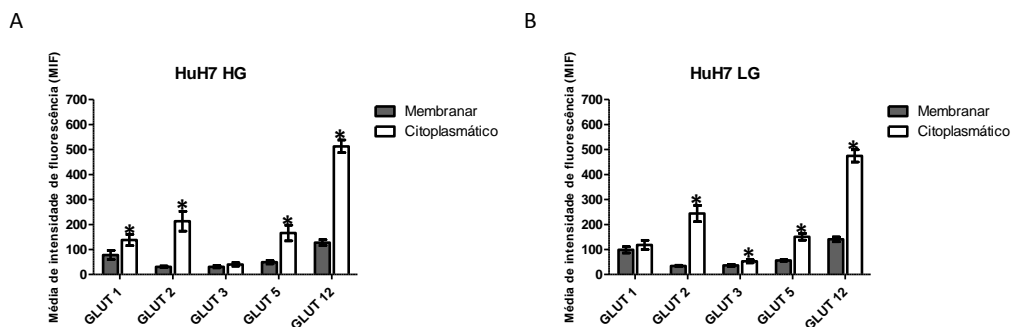


Figura 19: Expressão membranar e citoplasmática dos transportadores de glicose 1, 2, 3, 5 e 12 pela linha celular HuH7. As células foram cultivadas em meio com elevado teor de glicose (25 mM) (A) e em meio com baixo teor de glicose (5 mM) (B). Os níveis de expressão estão representados em termos de MIF. A figura representa a média e o desvio padrão de quatro experiências independentes. As diferenças estatisticamente significativas entre a expressão membranar e citoplasmática de um mesmo GLUT estão representadas por * que significa $p < 0,05$.

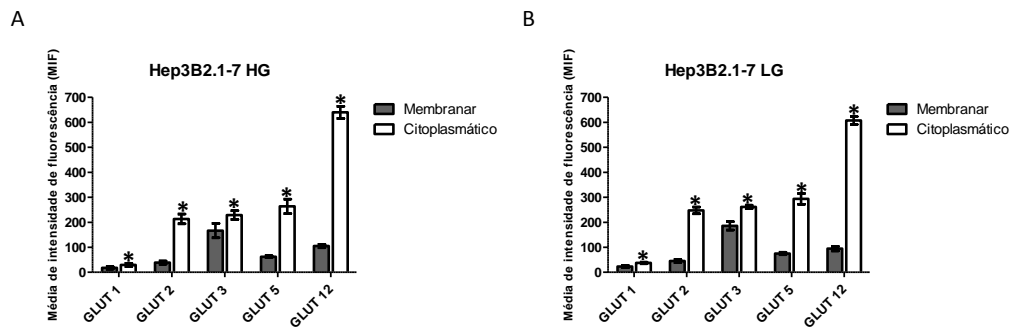


Figura 20: Expressão membranar e citoplasmática dos transportadores de glicose 1, 2, 3, 5 e 12 pela linha celular Hep3B2.1-7. As células foram cultivadas em meio com elevado teor de glicose (25 mM) (A) e em meio com baixo teor de glicose (5 mM) (B). Os níveis de expressão estão representados em termos de MIF. A figura representa a média e o desvio padrão de quatro experiências independentes. As diferenças estatisticamente significativas entre a expressão membranar e citoplasmática de um mesmo GLUT estão representadas por * que significa $p < 0,05$.

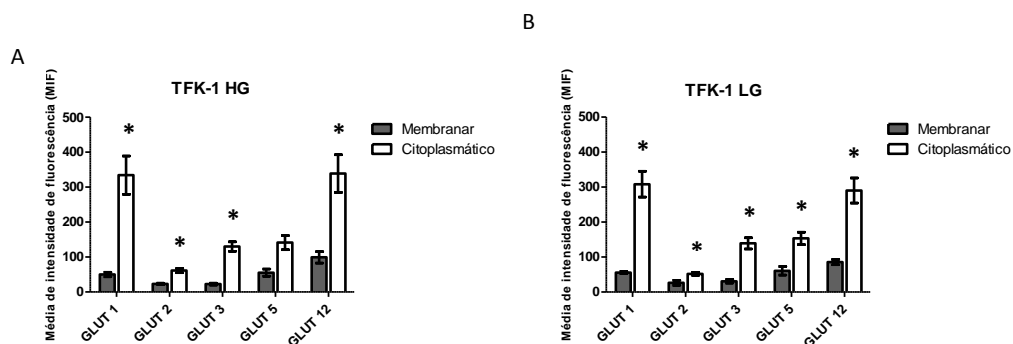


Figura 21: Expressão membranar e citoplasmática dos transportadores de glicose 1, 2, 3, 5 e 12 pela linha celular TFK-1. As células foram cultivadas em meio com elevado teor de glicose (25 mM) (A) e em meio com baixo teor de glicose (5 mM) (B). Os níveis de expressão estão representados em termos de MIF. A figura representa a média e o desvio padrão de quatro experiências independentes. As diferenças estatisticamente significativas entre a expressão membranar e citoplasmática de um mesmo GLUT estão representadas por * que significa $p < 0,05$.

De acordo com os resultados obtidos constata-se que para todas as linhas celulares em estudo e para ambos os meios de cultura utilizados a expressão citoplasmática é sempre superior à correspondente expressão membranar (Figuras 18, 19, 20 e 21). Dentro da mesma linha celular, entre a expressão membranar e citoplasmática de cada GLUT ocorrem sempre diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) excepto no caso do GLUT-3 na linha celular HuH7 quando cultivada em meio HG (Figura 19A), do GLUT-1 na mesma linha celular quando cultivada em meio LG (Figura 19B) e do GLUT-5 na linha celular TFK-1 quando cultivada em meio HG (Figura 21A).

Tanto na componente membranar como na citoplasmática, de um modo geral não se verificam diferenças com significado estatístico a nível da expressão proteica dos GLUTs analisados dentro da mesma linha celular quando cultivada em meio HG e em meio LG, com excepção da expressão membranar do GLUT-3 na

linha celular HepG2 ($p < 0,05$) (Figura 18), da expressão citoplasmática dos GLUTs -1 e -12 ($p < 0,05$) na linha celular HuH7 (Figura 19) e da expressão membranar do GLUT-5 ($p < 0,01$) e citoplasmática dos GLUTs -2 ($p < 0,05$), -3 ($p < 0,01$) e -12 ($p < 0,05$) para a linha celular Hep3B2.1-7 (Figura 20).

Analisando a expressão de cada transportador de glicose individualmente, constata-se que para os dois meios de cultura testados, a nível membranar, O GLUT-1 é mais expresso pela linha celular HuH7, seguida pelas linhas celulares HepG2 e TFK-1 e, finalmente, a linha celular Hep3B2.1-7 ($p < 0,01$). Relativamente à expressão citoplasmática deste transportador, este é mais expresso pelas células HepG2, seguidas das células TFK-1, das HuH7 e, finalmente, as Hep3B2.1-7 ($p < 0,01$) (Figuras 18, 19, 20 e 21).

No que diz respeito à expressão do GLUT-2, verifica-se que a sua componente membranar é bastante semelhante para todas as linhas celulares em estudo. Por sua vez, relativamente à expressão citoplasmática deste transportador constata-se que é de igual modo bastante similar entre as linhas celulares de carcinoma hepatocelular, sendo bastante inferior para a linha celular TFK-1 ($p < 0,01$) (Figuras 18, 19, 20 e 21).

Na membrana, o GLUT-3 encontra-se bastante mais expresso na linha celular Hep3B2.1-7 ($p < 0,05$) enquanto que as outras linhas celulares apresentam níveis de expressão bastante semelhantes (Figuras 18, 19, 20 e 21). Relativamente à expressão citoplasmática deste transportador, as células HepG2 são as que apresentam os níveis de expressão mais elevados seguidas pelas Hep3B2.1-7, TFK-1 e, por fim, HuH7 ($p < 0,05$) (Figuras 18, 19, 20 e 21).

A expressão membranar de GLUT-5 é bastante similar para todas as linhas celulares estudadas. Já relativamente à sua expressão citoplasmática esta é semelhante para todas as linhas celulares em estudo excepto para as Hep3B2.1-7 onde se encontra aumentada comparativamente às outras linhas celulares (Figuras 18, 19, 20 e 21).

Por fim, a linha celular que mais expressa GLUT-12 a nível membranar é a HuH7 seguida pelas linhas celulares Hep3B2.1-7 e TFK-1 com níveis de expressão similares e finalmente a linha celular HepG2 ($p < 0,05$). No que diz respeito à expressão citoplasmática, este transportador encontra-se mais expresso na linha celular Hep3B2.1-7 seguida das células HuH7 e por fim, com expressões semelhantes as linhas celulares HepG2 e TFK-1 ($p < 0,05$) (Figuras 18, 19, 20 e 21).

Analisando a expressão dos transportadores de glicose, verifica-se que para a linha celular HepG2 os transportadores mais expressos ao nível membranar são os GLUTs -5 e -12, contudo, no citoplasma o GLUT-12 é aquele que se encontra presente em maior quantidade (Figura 18). A linha celular HuH7 expressa mais

GLUT-12 do que qualquer um dos outros transportadores de glicose analisados, quer na membrana, quer no citoplasma (Figura 19). Relativamente à linha celular Hep3B2.1-7, o GLUT-3 é aquele que é mais expresso na membrana, enquanto que o GLUT-12 é aquele que está mais presente no citoplasma (Figura 20).

Por fim, no que diz respeito à linha celular TFK-1, o GLUT-12 é aquele que se encontra mais expresso na membrana celular, estando também bastante expresso no citoplasma em níveis similares ao de GLUT-1 (Figura 21).

Uma vez que na literatura existem estudos que indicam que o ^{99m}Tc -MIBI e também o ^{18}F -FDG são substratos das proteínas MDR analisou-se a expressão proteica dos transportadores PGP, MRP1 e LRP em todas as linhas celulares em estudo, estando os resultados representados nas Figuras 22 e 23.

Relativamente à expressão de PGP, de acordo com os resultados obtidos, constata-se que na membrana, este transportador é mais expresso pela linha celular HuH7, seguida da linha celular HepG2, da Hep3B2.1 e, por fim, a linha celular TFK-1. Verificam-se diferenças estatisticamente significativas entre os valores de membranas de expressão deste transportador nas linhas celulares HuH7 e Hep3B2.1-7 ($p < 0,01$), assim como entre as células HuH7 e TFK-1 ($p < 0,01$). No citoplasma, existe uma tendência para este transportador ser mais expresso pela linha celular HuH7, seguida da HepG2, da Hep3B2.1-7 e, por fim, a TFK-1.

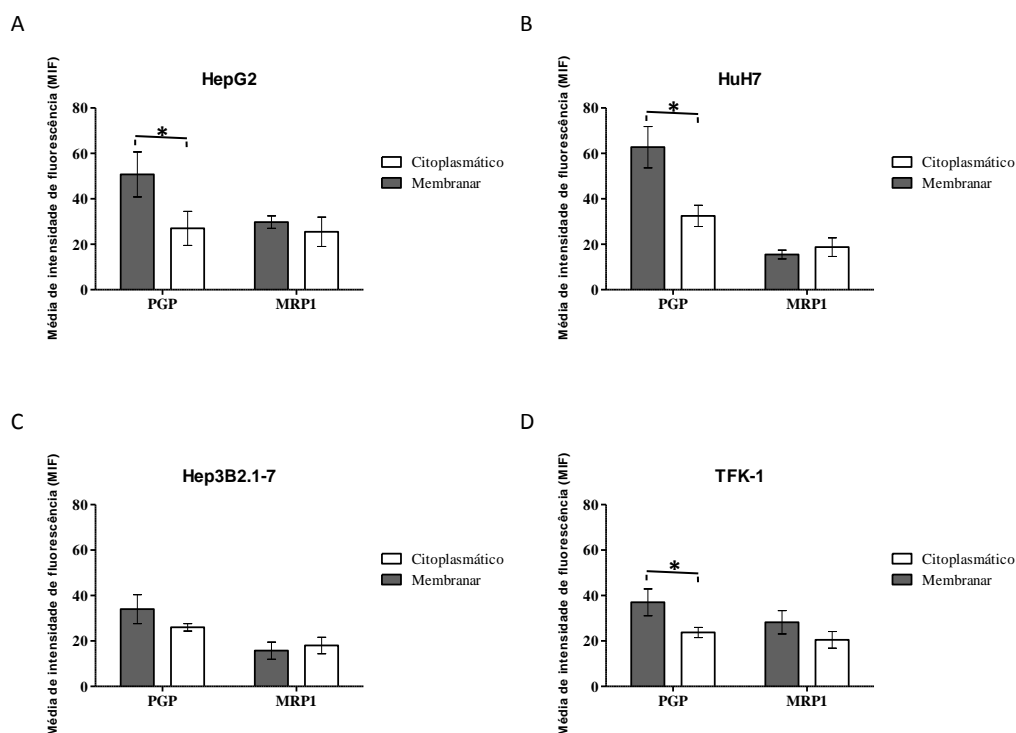


Figura 22: Expressão membranar e citoplasmática de PGP e MRP1 pelas linhas celulares HepG2 (A), HuH7 (B), Hep3B2.1-7 (C) e TFK-1 (D). Os níveis de expressão estão representados em termos de MIF. A figura representa a média e o desvio padrão de quatro experiências independentes.

Na membrana a proteína MRP1 é mais expressa pela linha celular HepG2 com valores semelhantes aos obtidos para a linha celular TFK-1, seguidas da linha celular HuH7 cuja expressão é similar à das células Hep3B2.1-7. Existe significância estatística ($p < 0,01$) entre os valores obtidos para as linhas celulares HepG2 e HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7, HuH7 e TFK-1 e finalmente Hep3B2.1-7 e TFK-1. Em relação à expressão citoplasmática de MRP1, existe uma tendência para esta ser superior na linha celular HepG2 seguindo-se as células TFK-1 e, por fim, com valores de expressão semelhantes as linhas celulares HuH7 e Hep3B2.1-7.

Comparando entre si a expressão membranar e citoplasmática das bombas de efluxo anteriormente referidas, constata-se que, para todas as linhas celulares em estudo, a expressão membranar de PGP é superior à correspondente expressão citoplasmática, ocorrendo diferenças estatisticamente significativas no caso das linhas celulares HepG2, HuH7 e TFK-1 ($p < 0,05$). Por sua vez, existe uma tendência para nas linhas celulares HepG2 e TFK-1 a expressão membranar de MRP1 ser superior à citoplasmática, observando-se uma tendência inversa para as outras duas linhas celulares em estudo.

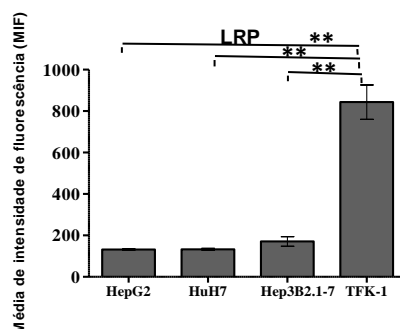


Figura 23: Expressão de LRP pelas linhas celulares HepG2, HuH7, Hep3B2.1-7 e TFK-1. Os níveis de expressão estão representados em termos de MIF. A figura representa a média e o desvio padrão de quatro experiências independentes. As diferenças estatisticamente significativas estão representadas com ** que representa $p < 0,01$.

No que diz respeito à proteína *vault* LRP, esta é bastante mais expressa pela linha celular TFK-1 do que pelas outras linhas celulares em estudo, existindo diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$) entre os valores de expressão nesta linha celular e nas linhas celulares de carcinoma hepatocelular. Já em relação às linhas celulares de carcinoma hepatocelular, aquela que mais expressa este transportador é a linha celular Hep3B2.1-7 seguida da linha celular HuH7 com níveis de expressão semelhantes aos das células HepG2 (Figura 23).

Para todas as linhas celulares em estudo, a bomba de efluxo mais expressa à membrana é a PGP, e no citoplasma a LRP, seguida da PGP e por fim a MRP1.

Através dos estudos de captação de ^{18}F -FDG foi possível traçar os perfis de captação do radiofármaco ao longo do tempo para todas as linhas celulares em estudo. Deste modo, de acordo com a Figura 24, para cada linha celular foi traçada a curva correspondente à captação das células que cresceram em meio com elevada e com baixa concentração de glicose.

A partir das curvas traçadas foi possível determinar os parâmetros $A_{\text{máx}}$ e T_{50} em que $A_{\text{máx}}$ representa a captação máxima (%) e T_{50} o tempo (minutos) necessário para que a captação seja igual a $A_{\text{máx}}/2$. Os referidos parâmetros estão descritos na Tabela 7.

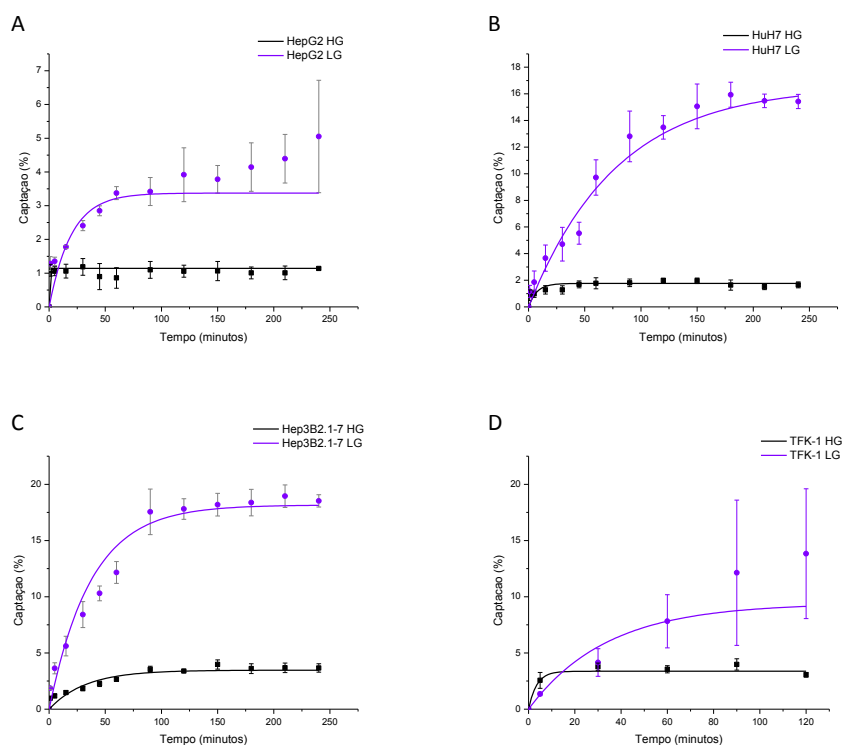


Figura 24: Percentagem de captação de ^{18}F -FDG pelas linhas celulares HepG2 (A), HuH7 (B), Hep3B2.1-7 (C) e TFK-1 (D). As células cresceram em meio com elevado teor de glicose e em meio com baixo teor de glicose. Os resultados representam a média e o desvio padrão de quatro experiências independentes efectuadas em duplicado. O r^2 obtido foi sempre igual ou superior a 0,9.

De acordo com a Figura 24, observaram-se diferenças nos perfis de captação de ^{18}F -FDG entre as quatro linhas celulares em estudo, e também entre a mesma linha celular quando cultivada em meios de cultura com concentrações de glicose diferentes. Para todas as linhas celulares em estudo verificou-se que a

percentagem de captação de ^{18}F -FDG foi maior quando as células foram cultivadas em meio LG do que quando cresceram em meio HG.

Para ambas as concentrações de glicose no meio de cultura, a linha celular que mais captou o radiofármaco referido foi a Hep3B2.1-7 seguida das linhas celulares TFK-1, HuH7 e HepG2 quando as células foram cultivadas em meio com elevado teor de glicose, e seguida das células HuH7, TFK-1 e por fim HepG2 quando as células cresceram em meio LG (Figura 24 e Tabela 7).

Tabela 7: Valores dos parâmetros $A_{\text{máx}}$ e T_{50} e correspondentes erros padrão relativos à captação de ^{18}F -FDG e obtidos para todas as linhas celulares em estudo quando as células cresceram em meio com baixo teor de glicose e em meio com elevado teor de glicose.

Linha celular	Concentração de glicose no meio	Parâmetro	Média	Erro Padrão
HepG2	LG	$A_{\text{máx}}$ (%)	3,37	0,37
		T_{50} (minutos)	13,62	2,73
	HG	$A_{\text{máx}}$ (%)	1,14	0,01
		T_{50} (minutos)	0,15	0,31
HuH7	LG	$A_{\text{máx}}$ (%)	16,60	0,75
		T_{50} (minutos)	54,25	8,43
	HG	$A_{\text{máx}}$ (%)	1,76	0,08
		T_{50} (minutos)	5,02	1,95
Hep3B2.1-7	LG	$A_{\text{máx}}$ (%)	18,16	1,64
		T_{50} (minutos)	25,96	8,38
	HG	$A_{\text{máx}}$ (%)	3,47	0,28
		T_{50} (minutos)	22,51	6,35
TFK-1	LG	$A_{\text{máx}}$ (%)	9,41	2,82
		T_{50} (minutos)	23,40	8,65
	HG	$A_{\text{máx}}$ (%)	3,37	0,20
		T_{50} (minutos)	2,42	2,02

Comparando os valores de $A_{\text{máx}}$ e T_{50} determinados para a mesma linha celular quando cultivada nos dois meios de cultura com diferentes concentrações de glicose verifica-se que no caso da linha celular HepG2, para ambos os parâmetros os valores determinados foram mais elevados quando as células foram cultivadas em meio LG, ocorrendo diferenças estatisticamente significativas entre os valores de A ($p < 0,001$). Também no caso da linha celular HuH7 os valores de $A_{\text{máx}}$ e T_{50} obtidos foram mais elevados quando as células cresceram em meio LG, verificando-se diferenças com significado estatístico para ambos os parâmetros ($p < 0,001$). De modo semelhante, para as células Hep3B2.1-7 constatou-se que os

parâmetros $A_{máx}$ e T_{50} determinados foram maiores quando as células cresceram em meio LG, ocorrendo diferenças com significância estatística somente entre os valores de $A_{máx}$ ($p < 0,001$). À semelhança do que ocorreu para as linhas celulares de carcinoma hepatocelular, também no caso da linha celular TFK-1 os parâmetros $A_{máx}$ e T_{50} apresentaram valores superiores quando as células cresceram em meio LG, verificando-se significância estatística para ambos os parâmetros ($p < 0,001$).

Comparando as quatro linhas celulares entre si, verifica-se que quando as células cresceram em meio com elevado teor de glicose os valores de $A_{máx}$ e T_{50} obtidos foram maiores para a linha celular Hep3B2.1-7, seguida das linhas celulares TFK-1, HuH7 e finalmente HepG2, ocorrendo diferenças estatisticamente significativas, entre todas as linhas celulares, apenas para o parâmetro $A_{máx}$ ($p < 0,001$), de acordo com os valores apresentados na Tabela 7. Por sua vez, quando as células foram cultivadas em meio com baixo teor de glicose o maior valor de $A_{máx}$ obtido foi também para a linha celular Hep3B2.1-7 seguindo-se as linhas celulares HuH7, TFK-1 e HepG2, ocorrendo diferenças com significado estatístico entre todas elas ($p < 0,001$), excepto entre as células Hep3B2.1-7 e HuH7. Já relativamente ao parâmetro T_{50} , o maior valor obtido foi para a linha celular HuH7, seguindo-se as células Hep3B2.1-7, TFK-1 e HepG-2, com diferenças estatisticamente significativas apenas entre as linhas celulares HuH7 e HepG2 ($p < 0,001$) (Tabela 7).

O teste de exclusão do azul de tripano demonstrou que aquando da conclusão dos estudos de captação, a viabilidade celular foi sempre igual ou superior a 95%.

Tendo em conta que um dos objectivos deste trabalho experimental é avaliar a utilidade do ^{18}F -FDG no estudo da resistência multifármacos, efectuaram-se também estudos de retenção com este radiotraçador.

De modo similar ao que ocorreu para os estudos de captação, através dos estudos de retenção de ^{18}F -FDG foi possível traçar os perfis de retenção do radiofármaco ao longo do tempo para todas as linhas celulares em estudo. Assim, para cada linha celular foi traçada a curva correspondente à retenção das células quando cresceram em meio com elevado teor de glicose e quando foram cultivadas em meio com baixo teor de glicose (Figura 25).

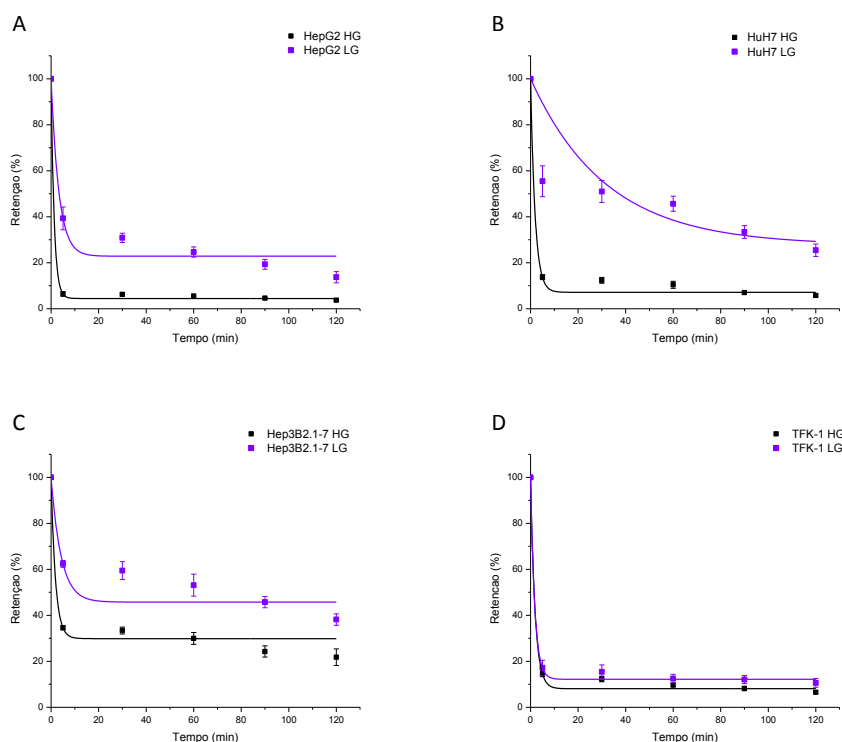


Figura 25: Percentagem de retenção de ^{18}F -FDG pelas linhas celulares HepG2 (A), HuH7 (B), Hep3B2.1-7 (C) e TFK-1 (D). As células cresceram em meio com elevado teor de glicose e em meio com baixo teor de glicose. Os resultados representam a média e o desvio padrão de quatro experiências independentes efectuadas em duplicado. O r^2 obtido foi sempre igual ou superior a 0,9.

A partir das curvas anteriormente traçadas foi possível determinar os parâmetros A_{\min} (%) e $T_{1/2}$ (minutos), em que A_{\min} representa a percentagem de retenção mínima e $T_{1/2}$ o tempo necessário para que a retenção seja igual a $(100 - A_{\min})/2$. Os referidos parâmetros estão descritos na Tabela 8.

De acordo com a Figura 25, observaram-se diferenças nos perfis de retenção de ^{18}F -FDG entre as quatro linhas celulares em estudo, e também entre a mesma linha celular quando cultivada nos meios de cultura com diferentes concentrações de glicose. Tanto para as linhas celulares de carcinoma hepatocelular como para a linha celular de colangiocarcinoma constatou-se que a percentagem de retenção de ^{18}F -FDG foi maior quando as células cresceram em meio LG do que quando foram cultivadas em meio HG.

Quando as células cresceram em meio de cultura HG a linha celular que mais reteve ^{18}F -FDG foi a Hep3B2.1-7 seguida das linhas celulares TFK-1, HuH7 e HepG2. Por sua vez, quando as linhas celulares em estudo foram cultivadas em meio com baixo teor de glicose a seguir à linha celular Hep3B2.1-7, as células que mais retiveram o referido radiofármaco foram as HuH7, depois as HepG2 e, por fim, as TFK-1 (Figura 25 e Tabela 8).

Tabela 8: Valores dos parâmetros A_{\min} (%) e $T_{1/2}$ (minutos) e correspondentes erros padrão relativos à retenção de ^{18}F -FDG e obtidos para todas as linhas celulares em estudo quando as células cresceram em meio com baixo teor de glicose e em meio com elevado teor de glicose.

Linha celular	Concentração de glicose no meio	Parâmetro	Média	Erro Padrão
HepG2	LG	A_{\min} (%)	22,85	3,64
		$T_{1/2}$ (minutos)	2,26	1,48
	HG	A_{\min} (%)	4,46	0,51
		$T_{1/2}$ (minutos)	0,89	0,29
HuH7	LG	A_{\min} (%)	27,65	10,36
		$T_{1/2}$ (minutos)	21,95	13,35
	HG	A_{\min} (%)	7,16	1,18
		$T_{1/2}$ (minutos)	1,31	0,26
Hep3B2.1-7	LG	A_{\min} (%)	45,75	4,30
		$T_{1/2}$ (minutos)	2,94	0,77
	HG	A_{\min} (%)	29,86	2,50
		$T_{1/2}$ (minutos)	1,29	0,31
TFK-1	LG	A_{\min} (%)	12,18	0,78
		$T_{1/2}$ (minutos)	1,21	0,23
	HG	A_{\min} (%)	8,08	1,08
		$T_{1/2}$ (minutos)	1,31	0,28

Comparando os valores de A_{\min} e $T_{1/2}$ determinados para a mesma linha celular quando cultivada nos dois meios de cultura utilizados verificou-se que no caso da linha celular HepG2, para ambos os parâmetros os valores determinados foram mais elevados quando as células foram cultivadas em meio LG, ocorrendo diferenças estatisticamente significativas apenas entre os valores de A_{\min} ($p < 0,01$). De modo similar, embora não tenham ocorrido diferenças estatisticamente significativas, também no caso da linha celular HuH7 os valores de A_{\min} e $T_{1/2}$ alcançados foram mais elevados quando as células cresceram em meio LG. Também no caso das células Hep3B2.1-7 se verificou que os parâmetros A_{\min} e $T_{1/2}$ determinados foram maiores quando as células cresceram em meio LG, embora não ocorram diferenças estatisticamente significativas. À semelhança do que ocorreu para as linhas celulares de carcinoma hepatocelular, também no caso da linha celular TFK-1, o parâmetro A_{\min} foi superior quando as células cresceram em meio LG. Ainda para a linha celular TFK-1, observou-se que o parâmetro $T_{1/2}$, determinado quando as células foram cultivadas em meio LG foi ligeiramente inferior ao correspondente parâmetro nas células cultivadas em meio HG (Tabela 8).

Comparando as quatro linhas celulares entre si, verifica-se que quando as células cresceram em meio de cultura HG os valores de A_{\min} obtidos foram maiores

para a linha celular Hep3B2.1-7, seguida das linhas celulares TFK-1, HuH7 e, finalmente, HepG2, ocorrendo diferenças estatisticamente significativas, entre os valores determinados para as linhas celulares HepG2 e Hep3B2.1-7 ($p < 0,001$) e HuH7 e Hep3B2.1-7 ($p < 0,01$) (Tabela 8). Relativamente ao parâmetro $T_{1/2}$, o valor mais elevado foi determinado para a linha celular TFK-1, seguindo-se as linhas celulares Hep3B2.1-7 e HuH7 com valores semelhantes e, por fim, as células HepG2. Contudo, não se observaram diferenças estatisticamente significativas.

Já quando as células foram cultivadas em meio com baixo teor de glicose o maior valor de A_{\min} foi obtido também para a linha celular Hep3B2.1-7 seguindo-se as linhas celulares HuH7, HepG2 e TFK-1, não se observando diferenças estatisticamente significativas. Por sua vez, no que diz respeito ao parâmetro $T_{1/2}$, o maior valor foi observado para a linha celular HuH7, seguindo-se as células Hep3B2.1-7, HepG2 e TFK1, não se tendo observado diferenças com significância estatística entre os valores determinados (Tabela 8).

Também neste caso, o teste de exclusão do azul de tripano demonstrou que no final do procedimento experimental a viabilidade celular foi sempre igual ou superior a 95%.

Tendo por base o facto de o ^{99m}Tc -MIBI ser considerado, por excelência, o radiofármaco ideal para o estudo da resistência multifármacos efectuaram-se, em paralelo com o ^{18}F -FDG estudos de captação deste radiofármaco para todas as linhas celulares em estudo, e para ambas as concentrações de glicose nos meios de cultura utilizadas. Os resultados obtidos estão representados na Figura 26.

A partir das curvas traçadas e representadas na figura 26 foi possível determinar os parâmetros A_{\max} e T_{50} em que A_{\max} representa a captação máxima (%) e T_{50} (minutos) o tempo necessário para que a captação seja igual a $A_{\max}/2$. Os referidos parâmetros estão descritos na Tabela 9.

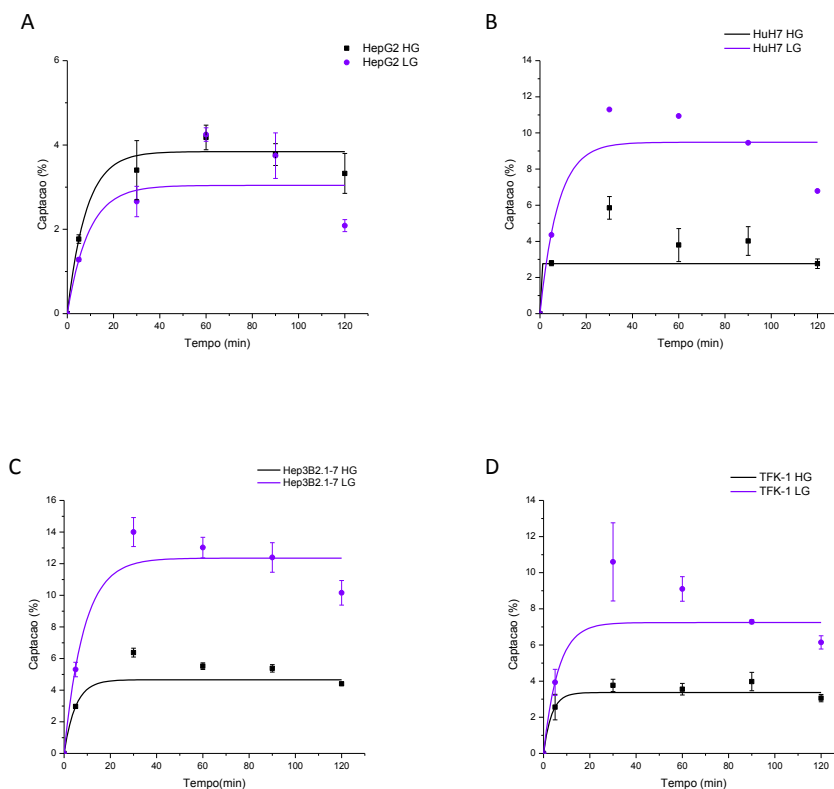


Figura 26: Percentagem de captação de ^{99m}Tc -MIBI pelas linhas celulares HepG2 (A), HuH7 (B), Hep3B2.1-7 (C) e TFK-1 (D). As células cresceram em meio com elevado teor de glicose e em meio com baixo teor de glicose. Os resultados representam a média e o desvio padrão de quatro experiências independentes efectuadas em duplicado. O r^2 obtido foi sempre igual ou superior a 0,9.

De acordo com a Figura 26 e a Tabela 9 observaram-se diferenças nos perfis de captação de ^{99m}Tc -MIBI entre as quatro linhas celulares em estudo, e também entre a mesma linha celular quando cultivada em meios de cultura com diferentes concentrações de glicose.

Com a excepção da linha celular HepG2, constata-se que para todas as linhas celulares em estudo a percentagem de captação de ^{99m}Tc -MIBI foi maior quando as células foram cultivadas em meio LG do que quando cresceram em meio HG (Figura 26).

Quando as células foram cultivadas em meio com baixo teor de glicose verificou-se que a linha celular que mais captou o referido traçador foi a Hep3B2.1-7, seguida da HuH7, da TFK-1 e, por fim, a HepG2. Por sua vez, quando as células cresceram em meio HG, de igual modo, a linha celular Hep3B2.1-7 foi aquela que mais captou ^{99m}Tc -MIBI, seguindo-se a HepG2, a TFK-1 e, por fim, a HuH7.

Tabela 9: Valores dos parâmetros $A_{m\acute{a}x}$ (%) e T_{50} (minutos) e correspondentes erros padrão relativos à captação de ^{99m}Tc -MIBI e obtidos para todas as linhas celulares em estudo quando as células cresceram em meio com baixo teor de glicose e em meio com elevado teor de glicose.

Linha celular	Concentração de glicose no meio	Parâmetro	Média	Erro Padrão
HepG2	LG	$A_{m\acute{a}x}$ (%)	3,04	0,60
		T_{50} (minutos)	6,33	2,34
	HG	$A_{m\acute{a}x}$ (%)	3,84	0,17
		T_{50} (minutos)	5,63	0,56
HuH7	LG	$A_{m\acute{a}x}$ (%)	9,48	1,17
		T_{50} (minutos)	5,39	2,00
	HG	$A_{m\acute{a}x}$ (%)	2,77	3,26
		T_{50} (minutos)	0,027	0,013
Hep3B2.1-7	LG	$A_{m\acute{a}x}$ (%)	12,35	0,89
		T_{50} (minutos)	5,92	1,59
	HG	$A_{m\acute{a}x}$ (%)	4,63	0,31
		T_{50} (minutos)	3,40	1,07
TFK-1	LG	$A_{m\acute{a}x}$ (%)	7,24	0,27
		T_{50} (minutos)	4,34	3,05
	HG	$A_{m\acute{a}x}$ (%)	3,37	0,20
		T_{50} (minutos)	2,41	2,03

Comparando os valores de $A_{m\acute{a}x}$ e T_{50} determinados para a mesma linha celular quando cultivada nos dois meios de cultura utilizados verifica-se que, no caso da linha celular HepG2, para ambos os parâmetros, os valores determinados foram similares. Por sua vez, no caso da linha celular HuH7 os valores de $A_{m\acute{a}x}$ e T_{50} obtidos foram mais elevados quando as células cresceram em meio LG, verificando-se diferenças com significado estatístico para ambos os parâmetros ($p < 0,01$) entre os valores determinados em LG e os valores calculados para células que cresceram em meio de cultura HG. Também no caso das células Hep3B2.1-7 se constata que os parâmetros $A_{m\acute{a}x}$ e T_{50} foram maiores quando as células cresceram em meio LG, ocorrendo diferenças com significância estatística ($p < 0,001$) somente entre os valores de $A_{m\acute{a}x}$. À semelhança do que ocorreu para as linhas celulares HuH7 e Hep3B2.1-7, de modo similar, no caso da linha celular TFK-1 os parâmetros $A_{m\acute{a}x}$ e T_{50} apresentaram valores superiores quando as células cresceram em meio LG, observando-se diferenças estatisticamente significativas para o parâmetro $A_{m\acute{a}x}$ ($p < 0,001$).

Comparando as quatro linhas celulares, verifica-se que quando as células cresceram em meio com elevada concentração de glicose os valores de $A_{m\acute{a}x}$ e T_{50} obtidos foram maiores para a linha celular Hep3B2.1-7, seguida das linhas

celulares HepG2, TFK-1 e, finalmente, a HuH7 (Tabela 9). Por sua vez, quando as células foram cultivadas em meio com baixa concentração de glicose, o maior valor de $A_{\text{máx}}$ obtido foi também para a linha celular Hep3B2.1-7 seguindo-se as linhas celulares HuH7, TFK-1 e HepG2. Quando as células foram cultivadas em meio LG, observaram-se diferenças com significado estatístico entre os valores de $A_{\text{máx}}$ para as linhas celulares HepG2 e HuH7 ($p < 0,05$), HepG2 e Hep3B2.1-7 ($p < 0,01$) e HepG2 e TFK-1 ($p < 0,05$).

Já relativamente ao parâmetro T_{50} , embora nunca se tenham observado diferenças estatisticamente significativas, quando as células foram cultivadas em meio HG o maior valor de T_{50} foi obtido para a linha celular HepG2, seguindo-se as células Hep3B2.1-7, TFK-1 e HuH7. Por sua vez, quando as células cresceram em meio LG, observou-se que o valor de T_{50} mais elevado foi alcançado para a linha celular HepG2 à qual se seguiram a Hep3B2.1-7, a TFK-1 e, por fim, a HuH7 (Tabela 9).

O teste de exclusão do azul de tripano evidenciou que aquando da conclusão dos estudos de captação a viabilidade celular foi sempre igual ou superior a 95%.

Em paralelo com os estudos de captação de $^{99\text{m}}\text{Tc-MIBI}$, efectuaram-se também estudos de retenção com o mesmo radiofármaco. A partir dos resultados obtidos através dos estudos de retenção de $^{99\text{m}}\text{Tc-MIBI}$ foi possível traçar, para todas as linhas celulares estudadas, as curvas de efluxo de seguida representadas (Figura 27).

Posteriormente, e através das curvas de retenção apresentadas determinaram-se os parâmetros A_{min} (%) e $T_{1/2}$ (minutos) relativos ao efluxo de $^{99\text{m}}\text{Tc-MIBI}$ para todas as linhas celulares em estudo quando cultivadas quer em meio HG, quer em meio LG.

Através da análise da Figura 27 constata-se que ocorrem diferenças nos perfis de retenção de $^{99\text{m}}\text{Tc-MIBI}$ entre todas as linhas celulares estudadas, e também entre a mesma linha celular quando cultivada em meio de cultura HG ou quando as células cresceram em meio de cultura LG.

Para todas as linhas celulares em estudo constatou-se que a percentagem de retenção de $^{99\text{m}}\text{Tc-MIBI}$ foi maior quando as células cresceram em meio LG do que quando foram cultivadas em meio HG.

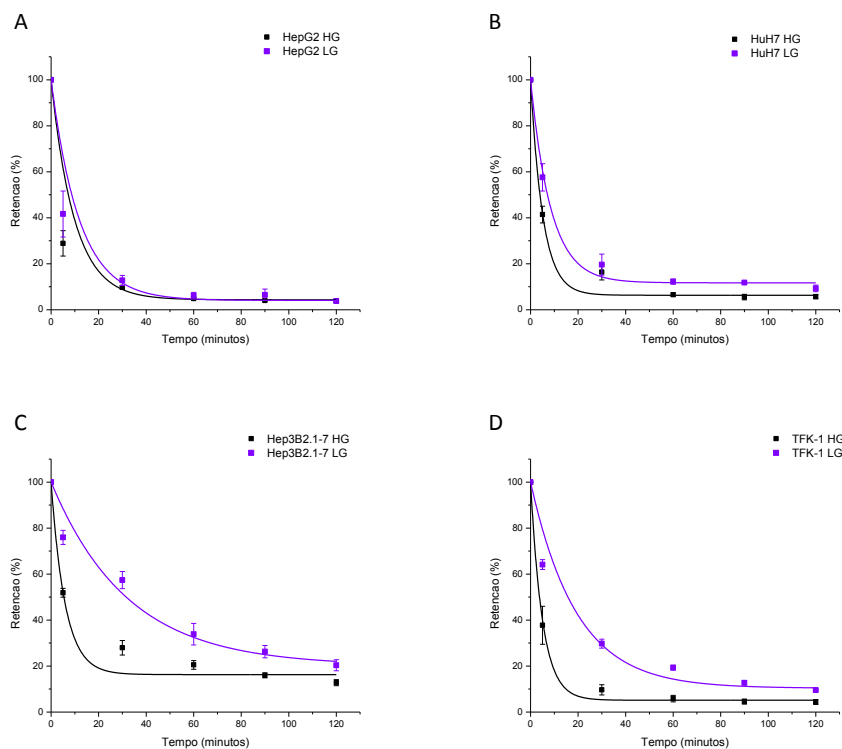


Figura 27: Percentagem de retenção de ^{99m}Tc -MIBI pelas linhas celulares HepG2 (A), HuH7 (B), Hep3B2.1-7 (C) e TFK-1 (D). As células cresceram em meio com elevado teor de glicose e em meio com baixo teor de glicose. Os resultados representam a média e o desvio padrão de quatro experiências independentes efectuadas em duplicado. O r^2 obtido foi sempre igual ou superior a 0,9.

Quando as células foram cultivadas em meio de cultura HG, a linha celular que mais reteve ^{99m}Tc -MIBI foi a Hep3B2.1-7 seguida das linhas celulares HepG2, HuH7 e TFK-1. Por sua vez, quando se utilizou meio de cultura com baixa concentração de glicose, de igual forma a linha celular Hep3B2.1-7 foi a que mais reteve ^{99m}Tc -MIBI, seguida das linhas celulares HepG2, HuH7 e TFK-1 (Figura 27 e Tabela 10).

Comparando os valores de A_{\min} e $T_{1/2}$ determinados para a mesma linha celular quando cultivada nos meios de cultura com diferentes concentrações de glicose verifica-se que, embora não ocorram diferenças estatisticamente significativas, para todas as linhas celulares os valores de A_{\min} e de $T_{1/2}$ obtidos foram superiores quando as células cresceram em meio com baixo teor de glicose (Tabela 10).

Ao comparar as quatro linhas celulares entre si, constata-se que quando as células cresceram em meio com elevada concentração de glicose, os valores de A_{\min} alcançados foram maiores para a linha celular Hep3B2.1-7, seguida das linhas celulares HuH7, TFK-1 e, por fim, a HepG2, ocorrendo diferenças estatisticamente significativas, entre os valores de A_{\min} obtidos para as linhas celulares HepG2 e Hep3B2.1-7 ($p < 0,05$) (Tabela 10). Relativamente ao parâmetro $T_{1/2}$, o valor mais

elevado foi determinado para a linha celular HepG2, seguindo-se as linhas celulares Hep3B2.1-7, HuH7 e, finalmente, as células TFK-1, não se observando no entanto diferenças com significado estatístico.

Tabela 10: Valores dos parâmetros A_{\min} (%) e $T_{1/2}$ (minutos) e correspondentes erros padrão relativos à retenção de ^{99m}Tc -MIBI e obtidos para todas as linhas celulares em estudo quando as células cresceram em meio com baixo teor de glicose e em meio com elevado teor de glicose.

Linha celular	Concentração de glicose no meio	Parâmetro	Média	Erro Padrão
HepG2	LG	A_{\min} (%)	15,98	4,35
		$T_{1/2}$ (minutos)	21,98	10,18
	HG	A_{\min} (%)	4,36	0,87
		$T_{1/2}$ (minutos)	6,80	1,23
HuH7	LG	A_{\min} (%)	11,73	0,46
		$T_{1/2}$ (minutos)	5,89	1,40
	HG	A_{\min} (%)	6,33	0,92
		$T_{1/2}$ (minutos)	3,59	0,66
Hep3B2.1-7	LG	A_{\min} (%)	20,15	7,01
		$T_{1/2}$ (minutos)	22,26	8,01
	HG	A_{\min} (%)	16,29	2,13
		$T_{1/2}$ (minutos)	4,10	0,76
TFK-1	LG	A_{\min} (%)	10,36	2,17
		$T_{1/2}$ (minutos)	13,36	3,70
	HG	A_{\min} (%)	5,15	0,81
		$T_{1/2}$ (minutos)	3,48	1,04

Por sua vez, quando as células foram cultivadas em meio de cultura LG, o maior valor de A_{\min} foi também para a linha celular Hep3B2.1-7, seguindo-se as linhas celulares HepG2, HuH7 e TFK-1. Contudo, não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre os vários valores de A_{\min} determinados. Já relativamente ao parâmetro $T_{1/2}$, obteve-se o maior valor para a linha celular Hep3B2.1-7, seguindo-se as células HepG2, TFK-1 e, por fim, as HuH7, não se tendo observado diferenças estatisticamente significativas (Tabela 10).

Através do teste de exclusão do azul de tripano constatou-se que, aquando da conclusão dos estudos de retenção, a viabilidade celular foi sempre igual ou superior a 95%.

Já foi referido anteriormente na primeira parte, contextualização teórica, que o verapamil é um inibidor competitivo da PGP. Nesse sentido, efectuaram-se estudos de retenção de ^{18}F -FDG em células pré-incubadas com este composto, de

modo a avaliar o seu efeito na retenção do referido radiofármaco. Os resultados obtidos assim como os respectivos controlos estão representados na Figura 28.

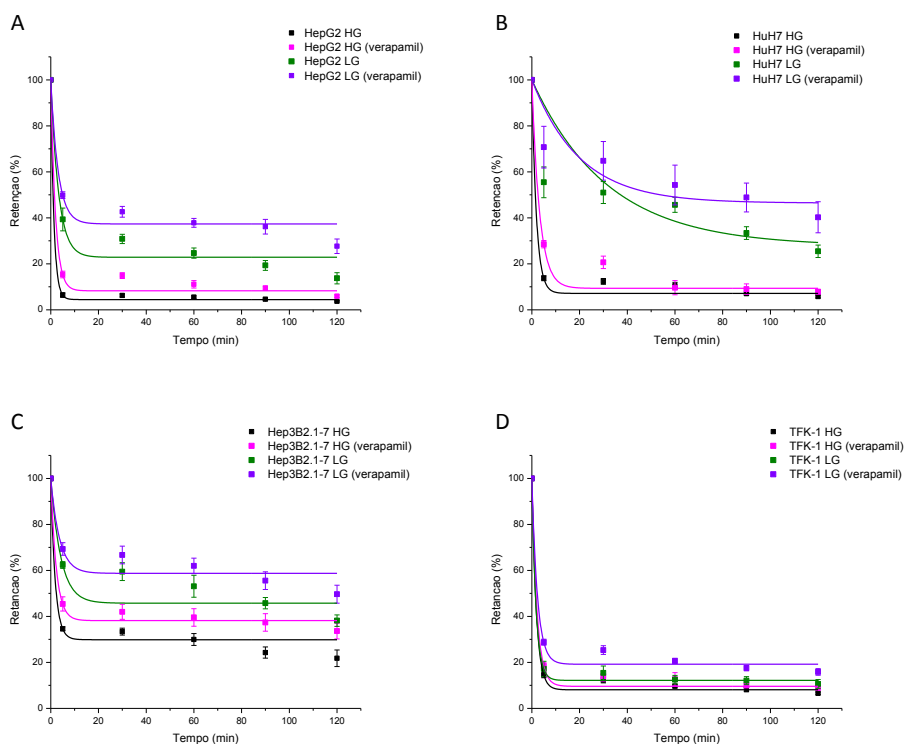


Figura 28: Percentagem de retenção de ¹⁸F-FDG pelas linhas celulares HepG2 (A), HuH7 (B), Hep3B2.1-7 (C) e TFK-1 (D). As células cresceram em meio com elevado teor de glicose e em meio com baixo teor de glicose, e os estudos foram efectuadas em células pré-incubadas com verapamil e em células controlo. Os resultados representam a média e o desvio padrão de quatro experiências independentes efectuadas em duplicado. O r² obtido foi sempre igual ou superior a 0,9.

Através das curvas anteriormente representadas foi possível determinar os parâmetros A_{\min} (%) e $T_{1/2}$ (minutos) relativos à retenção de ¹⁸F-FDG em células pré-incubadas com verapamil. Os referidos parâmetros apresentam-se na Tabela 11.

Através da observação dos gráficos da Figura 28 denota-se que tanto para as linhas celulares de carcinoma hepatocelular como para a linha celular de colangiocarcinoma ocorreu um aumento da percentagem de retenção de ¹⁸F-FDG quando as células foram previamente incubadas com verapamil, tal como se pode constatar através da comparação dos parâmetros A_{\min} apresentados nas Tabelas 8 e 11. O aumento na retenção de ¹⁸F-FDG ocorreu para ambas as concentrações de glicose nos meios de cultura utilizados. Deste modo, embora não se denotem diferenças estatisticamente significativas, o parâmetro A_{\min} calculado quando as células foram previamente incubadas com verapamil foi sempre superior ao obtido

com as correspondentes células controlo.

Tabela 11: Valores dos parâmetros A_{\min} (%) e $T_{1/2}$ (minutos) e correspondentes erros padrão relativos à retenção de ^{18}F -FDG e obtidos para todas as linhas celulares em estudo quando as células cresceram em meio com baixo teor de glicose e em meio com elevado teor de glicose, em células previamente incubadas com verapamil.

Linha celular	Concentração de glicose no meio	Parâmetro	Média	Erro Padrão
HepG2	LG	A_{\min} (%)	37,35	2,74
		$T_{1/2}$ (minutos)	2,15	0,42
	HG	A_{\min} (%)	8,27	1,80
		$T_{1/2}$ (minutos)	1,35	0,45
HuH7	LG	A_{\min} (%)	46,42	6,56
		$T_{1/2}$ (minutos)	13,84	8,96
	HG	A_{\min} (%)	9,35	2,31
		$T_{1/2}$ (minutos)	2,23	0,33
Hep3B2.1-7	LG	A_{\min} (%)	58,73	3,61
		$T_{1/2}$ (minutos)	2,55	1,05
	HG	A_{\min} (%)	38,17	1,88
		$T_{1/2}$ (minutos)	1,62	0,38
TFK-1	LG	A_{\min} (%)	19,19	1,72
		$T_{1/2}$ (minutos)	1,62	0,28
	HG	A_{\min} (%)	9,59	0,73
		$T_{1/2}$ (minutos)	1,49	0,16

No que diz respeito ao parâmetro $T_{1/2}$, também não se observaram diferenças com significado estatístico entre os valores controlo e os valores obtidos nas células pré-incubadas com verapamil. Apesar disso, ao incubar as células com verapamil, houve um aumento do valor do parâmetro $T_{1/2}$ para todas as linhas celulares em estudo, quando as células cresceram em meio HG, assim como para a linha celular TFK-1 quando cultivada em meio LG. Denotou-se também uma diminuição deste parâmetro no caso da linha celular HuH7 quando as células foram cultivadas em meio com baixo teor de glicose.

O teste de exclusão do azul de tripano demonstrou que, aquando da conclusão dos estudos de retenção, a viabilidade celular foi sempre igual ou superior a 95%.

De modo semelhante ao efectuado para o ^{18}F -FDG, efectuaram-se estudos de retenção de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI em células incubadas com verapamil. Os resultados obtidos para todas as linhas celulares estudadas estão representados na figura

seguinte (Figura 29).

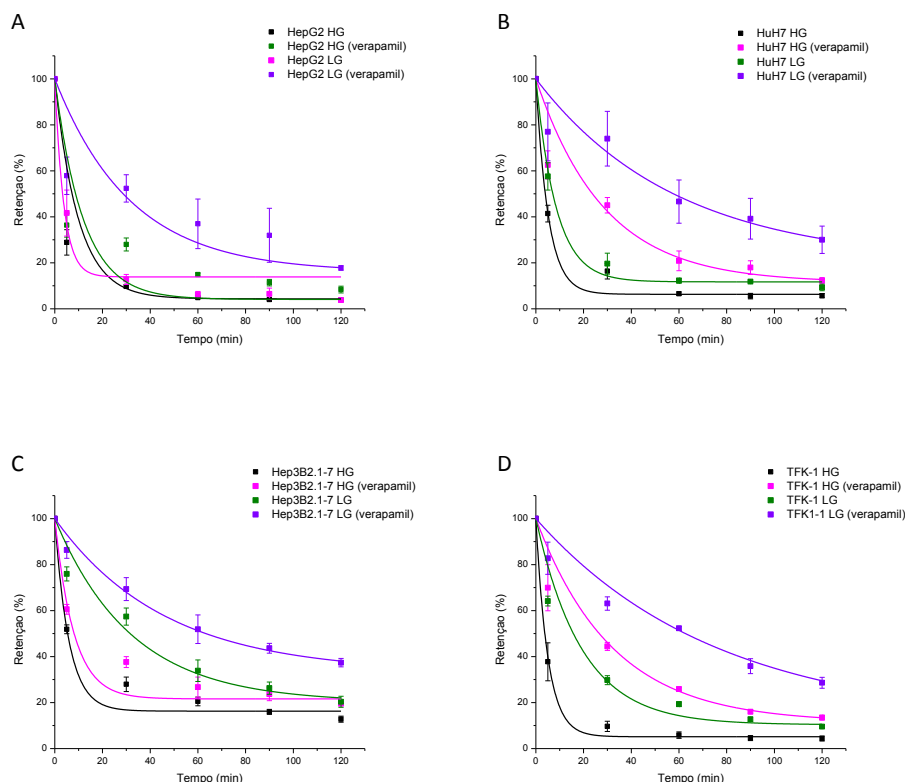


Figura 29: Percentagem de retenção de $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ pelas linhas celulares HepG2 (A), HuH7 (B), Hep3B2.1-7 (C) e TFK-1 (D). As células cresceram em meio com elevado teor de glicose e em meio com baixo teor de glicose, e os estudos foram efectuadas em células pré-incubadas com verapamil e em células controlo. Os resultados representam a média e o desvio padrão de quatro experiências independentes efectuadas em duplicado. O r^2 obtido foi sempre igual ou superior a 0,9.

Assim, a partir das curvas de retenção anteriormente representadas foi possível determinar os parâmetros A_{\min} (%) e $T_{1/2}$ (minutos) para todas as linhas celulares em estudo quando pré-incubadas com verapamil, e para ambas as concentrações de glicose nos meio de cultura utilizadas. Os respectivos valores estão representados na Tabela 12.

Observando os gráficos da Figura 29 constata-se que para todas as linhas celulares em estudo e para ambos os meios de cultura utilizados ocorreu um aumento da percentagem de retenção de $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ quando as células foram previamente incubadas com verapamil. Esse facto pode ser confirmado através da comparação dos parâmetros A_{\min} apresentados nas Tabelas 10 e 12. Tal como no caso do $^{18}\text{F-FDG}$ também para o $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ se verificou o aumento da percentagem de retenção para ambas as concentrações de glicose no meio de cultura. Deste modo, embora não se tenham observado diferenças com significado estatístico, o valor relativo ao parâmetro A_{\min} quando as células foram incubadas com verapamil

foi sempre superior ao obtido para as células controlo correspondentes.

Tabela 12: Valores dos parâmetros A_{\min} (%) e $T_{1/2}$ (minutos) e correspondentes erros padrão relativos à retenção de ^{99m}Tc -MIBI e obtidos para todas as linhas celulares em estudo quando as células cresceram em meio com baixo teor de glicose e em meio com elevado teor de glicose, em células previamente incubadas com verapamil.

Linha celular	Concentração de glicose no meio	Parâmetro	Média	Erro Padrão
HepG2	LG	A_{\min} (%)	15,98	4,35
		$T_{1/2}$ (minutos)	21,98	10,18
	HG	A_{\min} (%)	13,88	2,19
		$T_{1/2}$ (minutos)	2,62	1,72
HuH7	LG	A_{\min} (%)	20,09	14,97
		$T_{1/2}$ (minutos)	40,71	19,06
	HG	A_{\min} (%)	11,42	3,72
		$T_{1/2}$ (minutos)	19,78	4,96
Hep3B2.1-7	LG	A_{\min} (%)	33,13	5,09
		$T_{1/2}$ (minutos)	31,88	8,44
	HG	A_{\min} (%)	21,60	3,08
		$T_{1/2}$ (minutos)	5,54	1,73
TFK-1	LG	A_{\min} (%)	11,39	15,09
		$T_{1/2}$ (minutos)	52,35	14,73
	HG	A_{\min} (%)	11,30	1,58
		$T_{1/2}$ (minutos)	22,22	1,56

Relativamente ao parâmetro $T_{1/2}$, ao incubar as células com verapamil o valor determinado aumentou sempre, com excepção da linha celular HepG2 quando cultivada em meio HG, onde se observou uma diminuição deste parâmetro. Ocorreram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$) entre os valores de $T_{1/2}$ obtidos para a linha celular TFK-1 quando cultivada em meio de cultura HG entre as células controlo e as células incubadas com verapamil.

O teste de exclusão do azul de tripano demonstrou que, aquando da conclusão dos estudos de retenção, a viabilidade celular foi sempre igual ou superior a 95%.

Efeito da quimioterapia

Actividade metabólica

O ensaio do MTT permitiu obter valores de actividade metabólica, em percentagem relativamente às culturas celulares incubadas com o solvente do fármaco em questão, às quais foi atribuído um valor de actividade metabólica de 100%. Estes valores permitiram traçar as curvas dose-resposta, apresentadas de seguida.

Os gráficos da Figura 30 representam as curvas dose-resposta obtidas após o tratamento com cisplatina nas linhas celulares HepG2 (Figura 30A), HuH7 (Figura 30B), Hep3B2.1-7 (Figura 30C) e TFK-1 (Figura 30D) após 24, 48, 72 e 96 horas de incubação com o fármaco referido.

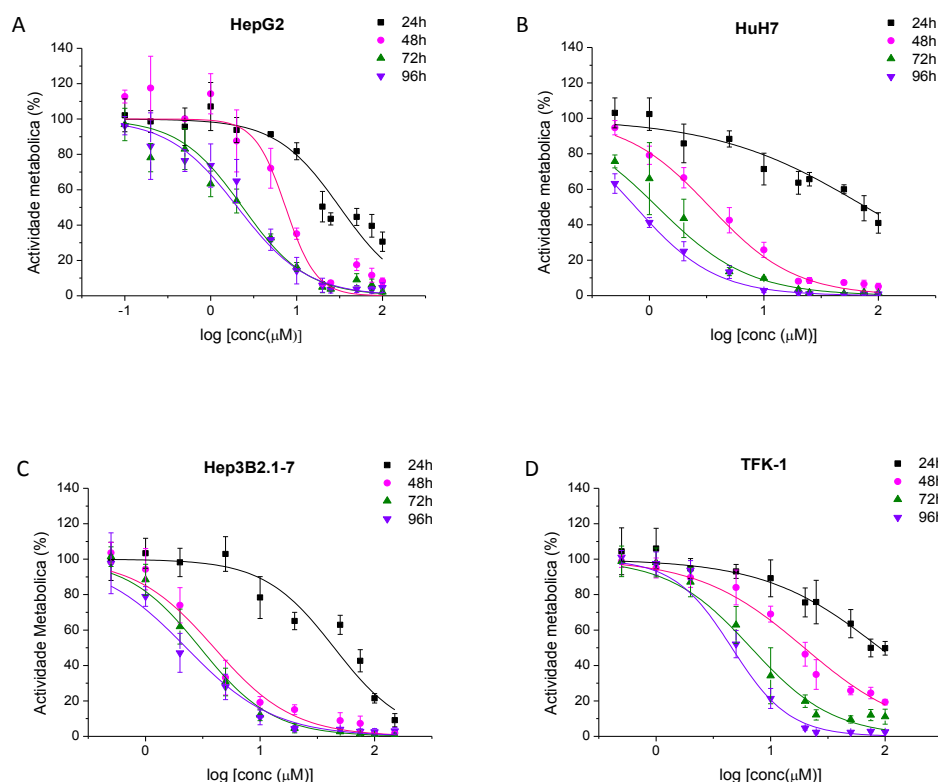


Figura 30: Curvas dose-resposta das quatro linhas celulares em estudo em resposta à incubação com cisplatina. Avaliação da actividade metabólica pelo ensaio do MTT 24, 48, 72 e 96 horas após incubação com concentrações crescentes de cisplatina nas linhas celulares HepG2 (A), HuH7 (B), Hep3B2.1-7 (C) e TFK-1 (D). Os resultados expressam a média e o desvio padrão de seis experiências independentes. O r^2 obtido foi sempre igual ou superior a 0,9.

A partir das curvas dose-resposta apresentadas foi possível calcular o IC₅₀, ou seja, a concentração de cisplatina necessária para inibir 50% da actividade metabólica, nas diversas linhas celulares em estudo. Estes valores, assim como os correspondentes intervalos de confiança, estão descritos na Tabela 13.

Tabela 13: Valores de IC₅₀, e intervalos de confiança obtidos para as linhas celulares HepG2, HuH7, Hep3B2.1-7 e TFK-1, quando incubadas com cisplatina para os diferentes tempos de incubação.

Cisplatina								
Linha celular	HepG2		HuH7		Hep3B2.1-7		TFK-1	
	IC ₅₀ (µM)	Intervalo de confiança	IC ₅₀ (µM)	Intervalo de confiança	IC ₅₀ (µM)	Intervalo de confiança	IC ₅₀ (µM)	Intervalo de confiança
24h	26,71	[23,41; 28,93]	58,77	[54,81; 63,72]	47,17	[44,58; 51,47]	89,82	[83,74; 96,33]
48h	7,28	[6,59; 7,51]	3,09	[2,85; 3,34]	3,85	[3,44; 4,15]	19,65	[17,97; 21,49]
72h	2,04	[1,73; 2,31]	1,51	[1,13; 1,78]	2,97	[2,51; 3,32]	6,74	[5,51; 8,26]
96h	1,24	[0,78; 1,27]	0,72	[0,64; 0,92]	2,27	[2,06; 2,61]	4,58	[3,39; 6,19]

Através da observação da Figura 30, verifica-se que a cisplatina possui um efeito inibitório da actividade metabólica em todas as linhas celulares em estudo, e que este efeito é dependente da concentração do composto e do tempo de incubação. Assim, constatou-se que o valor de IC₅₀ diminuiu à medida que se aumentou o tempo de incubação com a cisplatina, tanto para as linhas celulares de carcinoma hepatocelular, como para a linha celular de colangiocarcinoma.

Observando os valores de IC₅₀ presentes na Tabela 13 constata-se que, para tempos de incubação mais curtos, a linha celular HepG2 é a mais sensível ao fármaco em estudo, apresentando o valor de IC₅₀ mais baixo para as 24 horas de incubação. Porém, para tempos mais longos, ou seja, para as 48, 72 e 96 horas de incubação, os valores mais baixos de IC₅₀ foram obtidos com a linha celular HuH7. Por sua vez, a linha celular mais resistente à cisplatina é a TFK-1, para todos os tempos de incubação.

Comparando entre si os valores de IC₅₀ obtidos para todas as linhas celulares após 48 horas de incubação com cisplatina, verificam-se diferenças estatisticamente significativas entre as linhas celulares HepG2 e HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7, HepG2 e TFK-1, HuH7 e TFK-1 e Hep3B2.1-7 e TFK-1 ($p < 0,001$), com excepção dos valores determinados para as linhas celulares HuH7 e Hep3B2.1-7.

Para todas as linhas celulares em estudo, exceptuando a Hep3B2.1-7 verificou-se que existem diferenças com significado estatístico ($p < 0,001$) entre os valores de IC₅₀ obtidos para todos os tempos de incubação excepto entre os valores obtidos após 72 horas e 96 horas de incubação. No caso da linha celular Hep3B2.1-7, existem diferenças com significado estatístico entre os valores de IC₅₀

determinados após 24 horas de incubação com cisplatina e 48 horas de incubação com este fármaco ($p < 0,001$), entre os valores obtidos às 24 e às 96 horas ($p < 0,001$), e 48 e 96 horas ($p < 0,01$).

De modo semelhante ao que ocorreu com a cisplatina, os gráficos da Figura 31 representam as curvas dose-resposta obtidas a partir do tratamento com doxorrubicina nas linhas celulares HepG2 (Figura 31A), HuH7 (Figura 31B), Hep3B2.1-7 (Figura 31C) e TFK-1 (Figura 31D) após 24, 48, 72 e 96 horas de incubação com o referido fármaco.

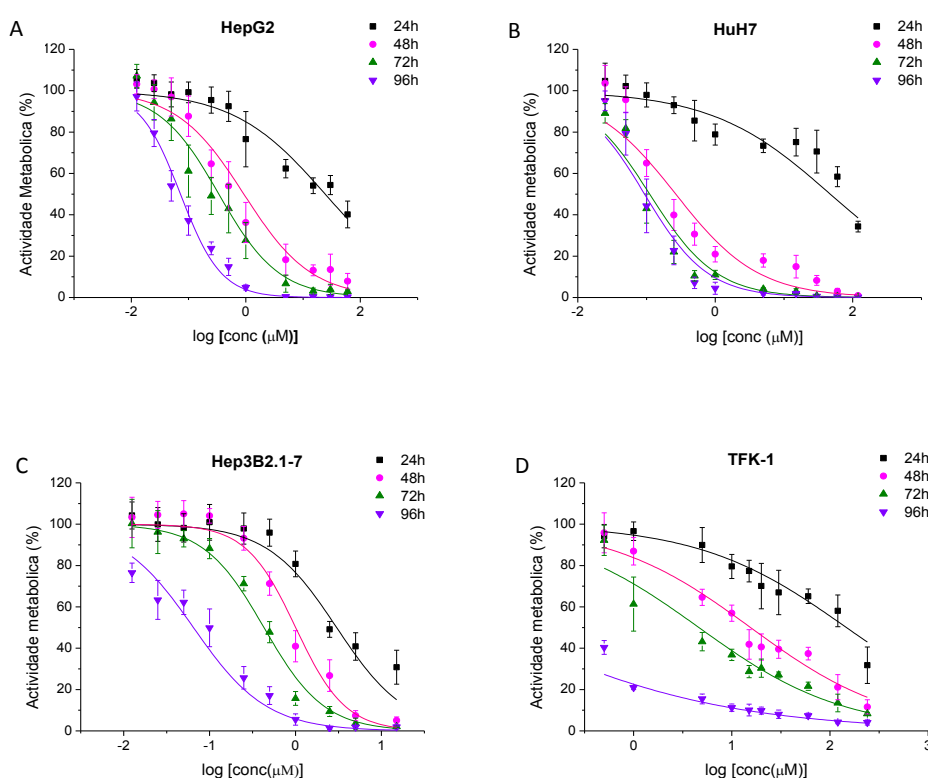


Figura 31: Curvas dose-resposta das quatro linhas celulares em estudo em resposta à incubação com doxorrubicina. Avaliação da actividade metabólica pelo ensaio do MTT 24, 48, 72 e 96 horas após incubação com concentrações crescentes de doxorrubicina nas linhas celulares HepG2 (A), HuH7 (B), Hep3B2.1-7 (C) e TFK-1 (D). Os resultados expressam a média e o desvio padrão de seis experiências independentes. O r^2 obtido foi sempre igual ou superior a 0,9.

Através das curvas-dose resposta obtidas em resposta ao tratamento com doxorrubicina para os diversos tempos de incubação, foi possível calcular os valores de IC_{50} e respectivos intervalos de confiança que se apresentam de seguida na Tabela 14.

Tabela 14: Valores de IC₅₀, e intervalos de confiança obtidos para as linhas celulares HepG2, HuH7, Hep3B2.1-7 e TFK-1, quando incubadas com doxorrubicina para os diferentes tempos de incubação.

Doxorrubicina								
Linha celular	HepG2		HuH7		Hep3B2.1-7		TFK-1	
	IC ₅₀ (μM)	Intervalo de confiança	IC ₅₀ (μM)	Intervalo de confiança	IC ₅₀ (μM)	Intervalo de confiança	IC ₅₀ (μM)	Intervalo de confiança
24h	22,02	[19,85; 25,48]	58,40	[55,15; 61,23]	5,22	[4,98; 5,52]	147,20	[120,73; 179,46]
48h	0,68	[0,54; 0,79]	0,24	[0,21; 0,26]	0,83	[0,76; 0,86]	15,52	[13,48; 17,86]
72h	0,29	[0,27; 0,32]	0,10	[0,089; 0,12]	0,43	[0,39; 0,46]	4,62	[3,81; 5,60]
96h	0,072	[0,069; 0,076]	0,10	[0,088; 0,13]	0,071	[0,067; 0,074]	0,035	[0,020; 0,059]

Ao observar a Figura 31, verifica-se que, de um modo geral, a doxorrubicina possui um efeito mais evidente do que a cisplatina na inibição da actividade metabólica para todas as linhas celulares em estudo, e que este efeito é dependente da concentração de composto utilizada e do tempo de incubação. Assim, constata-se que à medida que se aumenta o tempo de incubação com o fármaco o valor de IC₅₀ diminui.

Através da análise dos valores de IC₅₀ representados na Tabela 14 verifica-se que, com a excepção do valor obtido após 96 horas de incubação, a linha celular TFK-1 é aquela que mostrou ser mais resistente à doxorrubicina. Por outro lado, a linha celular que se mostrou mais sensível ao tratamento com este fármaco após 24 horas de incubação foi a Hep3B2.1-7.

Comparando entre si os valores de IC₅₀ obtidos após 48 horas de incubação com este fármaco, para todas as linhas celulares em estudo, constata-se que existem diferenças com significado estatístico entre os valores de IC₅₀ determinados para todas as linhas celulares estudadas ($p < 0,001$), excepto entre as linhas celulares HepG2 e Hep3B2.1-7.

Verificou-se ainda que no caso das linhas celulares HepG2, Hep3B2.1-7 e TFK-1 ocorrem sempre diferenças com significância estatística ($p < 0,001$) entre os valores de IC₅₀ obtidos para todos os tempos de incubação estudados. Já em relação à linha celular HuH7, os valores de IC₅₀ determinados às 24 horas e 48 horas, 24 horas e 72 horas, 24 horas e 96 horas ($p < 0,001$) e 48 e 96 horas ($p < 0,01$) são estatisticamente diferentes entre si.

Nos gráficos da Figura 32 estão representadas as curvas dose-resposta obtidas a partir do tratamento com 5-fluorouracilo para as linhas celulares HepG2 (Figura 32A), HuH7 (Figura 32B), Hep3B2.1-7 (Figura 32C) e TFK-1 (Figura 32D) após 48, 72 e 96 horas de incubação.

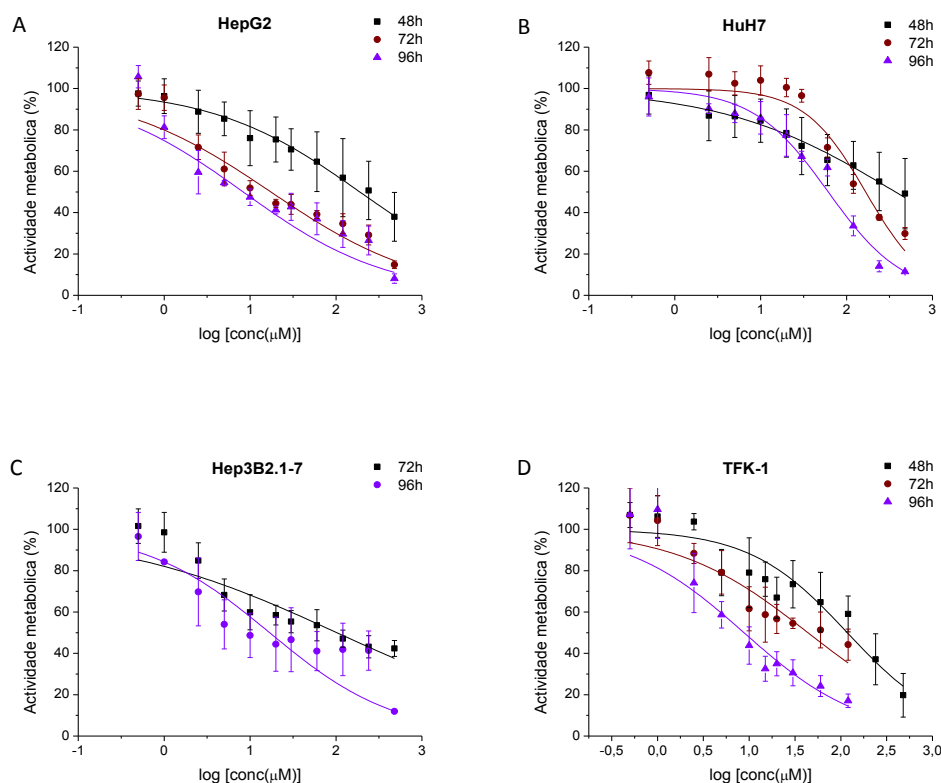


Figura 32: Curvas dose-resposta das quatro linhas celulares em estudo em resposta à incubação com 5-fluorouracilo. Avaliação da actividade metabólica pelo ensaio do MTT 48, 72 e 96 horas após incubação com concentrações crescentes de 5-fluorouracilo nas linhas celulares HepG2 (A), HuH7 (B), Hep3B2.1-7 (C) e TFK-1 (D). Os resultados expressam a média e o desvio padrão de seis experiências independentes. O r^2 obtido foi sempre igual ou superior a 0,9.

Através das curvas dose-resposta obtidas em resposta ao tratamento com 5-fluorouracilo, e representadas na Figura 32, foi possível determinar o valor de IC_{50} para cada uma das linhas celulares em estudo. Os valores de IC_{50} calculados, assim como os respectivos intervalos de confiança estão sumariados na Tabela 15.

Tabela 15: Valores de IC_{50} , e intervalos de confiança obtidos para as linhas celulares HepG2, HuH7, Hep3B2.1-7 e TFK-1, quando incubadas com 5-fluorouracilo para os diferentes tempos de incubação.

5-fluorouracilo								
Linha celular	HepG2		HuH7		Hep3B2.1-7		TFK-1	
	IC_{50} (μM)	Intervalo de confiança	IC_{50} (μM)	Intervalo de confiança	IC_{50} (μM)	Intervalo de confiança	IC_{50} (μM)	Intervalo de confiança
24h	>500		>500		>500		>500	
48h	205,19	[186,71; 222,48]	390,00	[374,21; 415,17]	>500		117,74	[87,09; 159,19]
72h	18,98	[16,54; 21,54]	166,62	[152,38; 184,51]	88,25	[85,68; 92,43]	43,74	[34,52; 55,43]
96h	12,50	[10,98; 15,12]	64,83	[58,93; 68,28]	21,43	[18,43; 23,58]	8,78	[7,12; 10,82]

De um modo geral, verifica-se que todas as linhas celulares estudadas são resistentes a este fármaco, sendo essa resistência mais notória para os tempos de incubação mais curtos. Assim, foi impossível calcular o valor de IC₅₀ após 24 horas de incubação com 5-fluorouracilo, para todas as linhas celulares, e após 48 horas de incubação para a linha celular Hep3B2.1-7. Verificou-se que, mesmo com a concentração mais elevada deste composto (500 µM), a actividade metabólica permanecia superior a 50%.

Para todas as linhas celulares em estudo e para todos os valores de IC₅₀ que foi possível calcular, verifica-se que existem diferenças com significado estatístico ($p < 0,001$) entre os valores de IC₅₀ obtidos após os referidos tempos de incubação, para cada linha celular.

Comparando os valores de IC₅₀ adquiridos após 48 horas de incubação com 5-fluorouracilo verifica-se que existem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,001$) entre os valores obtidos para as diversas linhas celulares (exceptuando a linha celular Hep3B2.1-7 onde não foi possível a realização desse cálculo), excepto entre a linha celular HepG2 e a linha celular TFK-1.

Através dos resultados obtidos pelo ensaio do MTT foi também possível traçar as curvas dose-resposta em resposta à incubação com o sorafenib para todas as linhas celulares em estudo e para todos os tempos de incubação referidos. As curvas dose-resposta estão representadas na Figura 33.

Posteriormente, através das curvas dose-resposta representadas na Figura 33 foi possível determinar os valores de IC₅₀ em resposta ao sorafenib, para todas as linhas celulares em estudo, e para todos os tempos de incubação avaliados. Esses valores estão representados na Tabela 16.

Analisando a Figura 33 e a Tabela 16 verifica-se que o sorafenib é capaz de inibir a actividade metabólica de todas as linhas celulares em estudo de uma forma dependente do tempo e da concentração. De um modo geral, a linha celular TFK-1 é aquela que se apresenta mais sensível ao sorafenib e, por sua vez, a mais resistente é a linha celular HuH7. De entre as linhas celulares de carcinoma hepatocelular, a mais sensível é a HepG2.

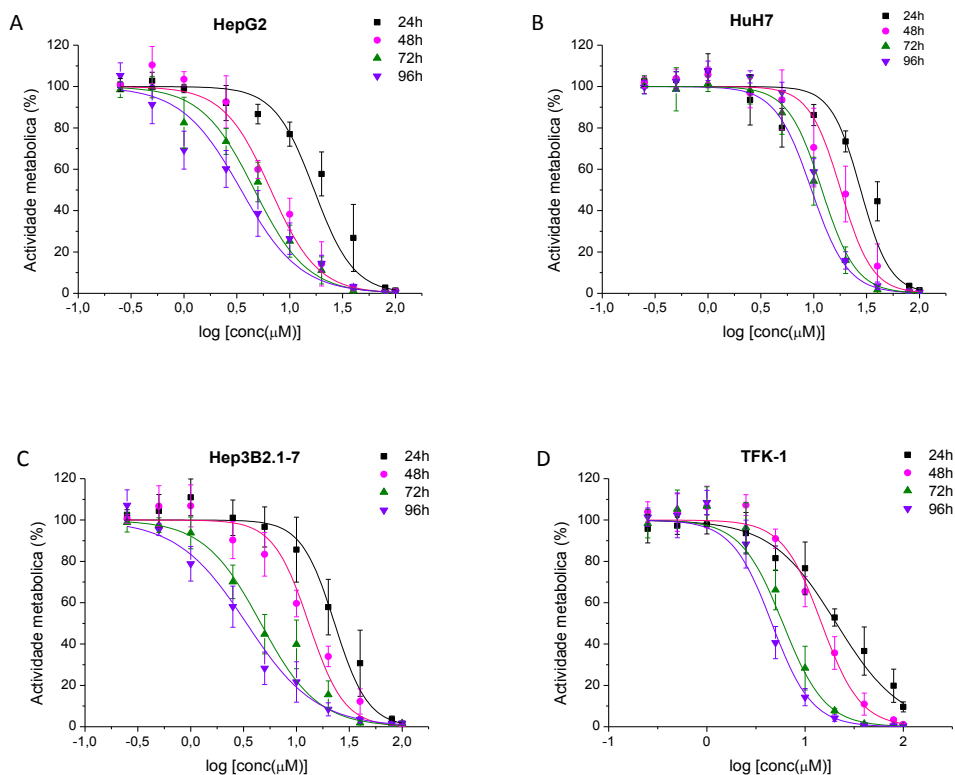


Figura 33: Curvas dose-resposta das quatro linhas celulares em estudo em resposta à incubação com sorafenib. Avaliação da actividade metabólica pelo ensaio do MTT 24, 48, 72 e 96 horas após incubação com concentrações crescentes de sorafenib nas linhas celulares HepG2 (A), HuH7 (B), Hep3B2.1-7 (C) e TFK-1 (D). Os resultados expressam a média e o desvio padrão de seis experiências independentes. O r^2 obtido foi sempre igual ou superior a 0,9.

No que diz respeito à análise estatística, verificou-se que, para os valores de IC₅₀ obtidos para a linha celular HepG2 existem diferenças com significado estatístico entre os valores determinados para todos os tempos de incubação testados, sendo o valor de p inferior a 0,01 entre os valores de IC₅₀ obtidos após 72 horas de incubação e 96 horas de incubação, e inferior a 0,001 para as outras combinações possíveis. Em relação à linha celular HuH7 entre valores de IC₅₀ determinados existem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,001$), excepto entre os valores obtidos após 72 horas e 96 horas de incubação. No caso das linhas celulares Hep3B2.1-7 e TFK-1, os valores de IC₅₀ obtidos possuem entre si diferenças com significado estatístico, sendo o p inferior a 0,05 entre os valores de IC₅₀ obtidos após 72 horas e 96 horas de incubação, e inferior a 0,001 entre os valores de IC₅₀ determinados para os outros tempos de incubação.

Tabela 16: Valores de IC₅₀, e intervalos de confiança obtidos para as linhas celulares HepG2, HuH7, Hep3B2.1-7 e TFK-1, quando incubadas com sorafenib para os diferentes tempos de incubação.

Sorafenib								
Linha celular	HepG2		HuH7		Hep3B2.1-7		TFK-1	
	IC ₅₀ (µM)	Intervalo de confiança	IC ₅₀ (µM)	Intervalo de confiança	IC ₅₀ (µM)	Intervalo de confiança	IC ₅₀ (µM)	Intervalo de confiança
24h	17,01	[15,48; 18,69]	22,79	[25,36; 30,45]	22,95	[20,42; 25,80]	8,82	[8,10; 9,60]
48h	6,62	[5,46; 7,10]	17,98	[13,32; 20,05]	13,08	[10,78; 14,03]	4,63	[4,07; 4,85]
72h	4,63	[4,13; 5,20]	9,53	[8,23; 11,03]	4,60	[4,02; 5,27]	3,24	[2,71; 3,46]
96h	3,46	[2,80; 4,28]	11,94	[11,00; 12,96]	3,37	[3,02; 3,76]	2,24	[1,76; 2,44]

Comparando entre si os valores de IC₅₀ obtidos após 48 horas de incubação com sorafenib, para as diversas linhas celulares em estudo, verificou-se que entre os valores obtidos para as linhas celulares TFK-1 e HuH7 e TFK-1 e Hep3B2.1-7 não existem diferenças com significado estatístico. Em relação às outras combinações, existem diferenças estatisticamente significativas, sendo o p inferior a 0,01 entre os valores obtidos para as linhas celulares HuH7 e Hep3B2.1-7 e inferior a 0,001 para as restantes combinações.

Viabilidade e morte celular

O efeito da cisplatina na viabilidade celular das linhas celulares de carcinoma hepatocelular e colangiocarcinoma utilizadas foi analisado com recurso à dupla marcação com AV-FITC e IP por citometria de fluxo. Os gráficos da Figura 34 representam as diferentes populações identificadas (células viáveis, células em apoptose inicial, células em apoptose tardia/necrose e células em necrose) em cada uma das condições testadas para as linhas celulares HepG2 (Figura 34A), HuH7 (Figura 34B), Hep3B2.1-7 (Figura 34C) e TFK-1 (Figura 34D).

Ao analisar os gráficos da Figura 34 verifica-se que em resposta ao tratamento com cisplatina, as células HepG2 (Figura 34A) tendem a morrer por necrose, ocorrendo diferenças com significado estatístico ($p < 0,05$) entre as populações em necrose entre a condição controlo e todas as outras condições testadas. À medida que se aumentou a concentração de fármaco a viabilidade celular diminuiu, e quando se compara a percentagem das células viáveis da condição controlo com qualquer uma das outras condições testadas, os resultados apresentam sempre diferenças com significado estatístico ($p < 0,05$). A percentagem de células em apoptose também aumentou ligeiramente à medida

que aumentou a concentração de cisplatina testada, havendo diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre as células em apoptose na condição controlo e nas células tratadas com 30 μM deste fármaco. Também a população das células em apoptose tardia/necrose aumentou com o aumento da concentração de cisplatina, sendo que comparando as populações de células nesta condição no controlo e nos tratamentos ocorrem sempre diferenças com significado estatístico ($p < 0,05$).

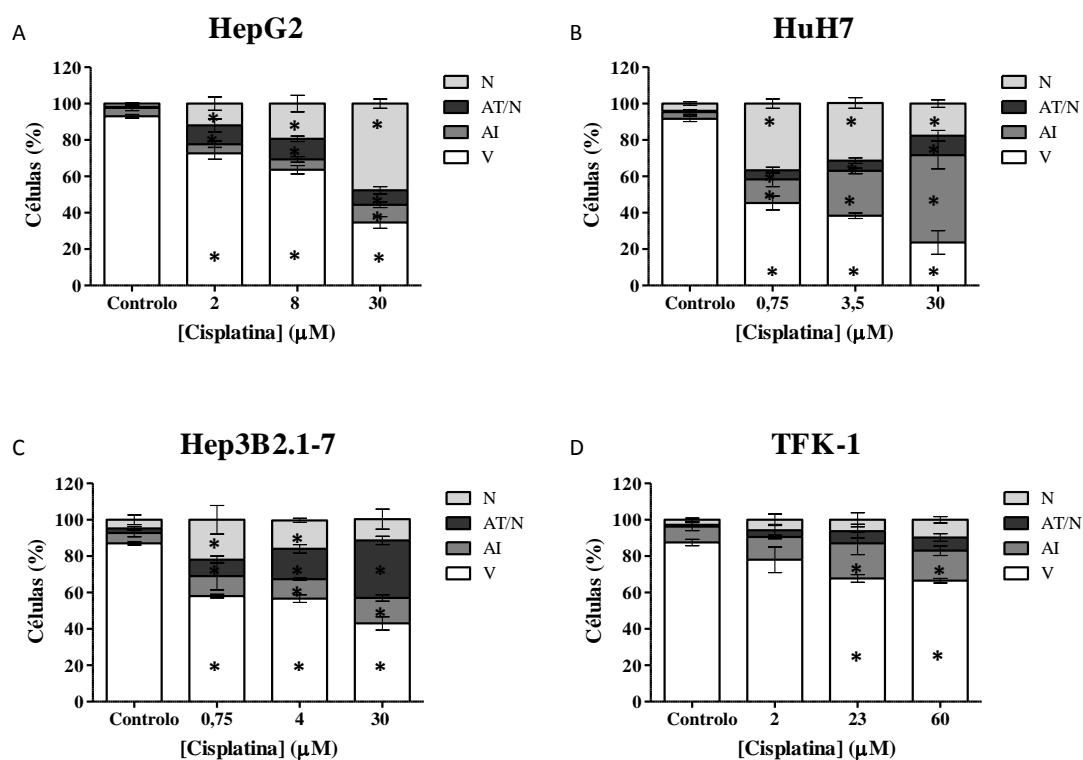


Figura 34: Análise da viabilidade celular e tipos de morte celular induzidos, por citometria de fluxo recorrendo à dupla marcação AV-FITC e IP, após incubação com diferentes concentrações de cisplatina, durante 48 horas, nas linhas celulares HepG2 (A), HuH7 (B), Hep3B2.1-7 (C) e TFK-1 (D). Os resultados estão representados na forma de percentagem de células viáveis (V), em apoptose inicial (AI), apoptose tardia/necrose (AT/N) e necrose (N). Os resultados expressam a média e o desvio padrão de quatro experiências independentes. As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo estão assinaladas com * que representa $p < 0,05$.

No que diz respeito à linha celular HuH7 (Figura 34B), a viabilidade celular diminuiu à medida que se aumentou a concentração de cisplatina, sendo que existem sempre diferenças estatisticamente significativas entre as células viáveis no controlo e nas outras condições ($p < 0,05$). Quando as células HuH7 foram incubadas com 0,75 μM e 3,5 μM de cisplatina, o tipo de morte celular

predominante foi a necrose, no entanto, ao aumentar a concentração de fármaco para 30 μM , as células morreram essencialmente por apoptose. Entre o controlo e as células tratadas, para todas as populações celulares, isto é, células em apoptose inicial, células em apoptose tardia/necrose e células em necrose ocorreram sempre diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

A viabilidade das células Hep3B2.1-3 (Figura 34C) decresceu à medida que se aumentou a concentração de cisplatina com que as mesmas foram tratadas. Para a menor concentração de cisplatina testada, o tipo de morte celular predominante foi a necrose. Posteriormente, quando se aumentou a concentração deste composto para 4 μM ocorreu um balanço entre a apoptose e a necrose, e por fim, ao incubar as células com 30 μM de cisplatina verificou-se que o tipo de morte celular predominante foi a apoptose tardia / necrose. Para todas as condições testadas ocorreram sempre diferenças com significado estatístico entre as diferentes populações das células tratadas e das células controlo ($p < 0,05$), excepto entre as células em apoptose no controlo e na condição 0,75 μM , e as células em necrose nas condições controlo e de 30 μM .

Relativamente à linha celular TFK-1 (Figura 34D) constata-se que em resposta ao tratamento com cisplatina a viabilidade celular decresceu, para cerca de 60% nas duas maiores concentrações de fármaco testadas, ocorrendo diferenças estatisticamente significativas entre as células viáveis no controlo e nestas duas condições ($p < 0,05$). A morte celular ocorreu essencialmente por apoptose, havendo significado estatístico entre as células em apoptose na condição controlo e tratadas com 23 μM de cisplatina, assim como entre o controlo e os 60 μM ($p < 0,05$).

Através do mesmo ensaio avaliou-se a viabilidade celular e os tipos de morte celular induzida em resposta ao tratamento com doxorrubicina para todas as linhas celulares em estudo. Os resultados obtidos estão representados na Figura 35.

Analisando a Figura 35A constata-se que em resposta ao tratamento com doxorrubicina a viabilidade celular das células HepG2 diminuiu à medida que aumentou a concentração de fármaco. Para as concentrações de 0,1 e 5 μM ocorreu um balanço entre a morte celular por apoptose e por necrose. Por outro lado, aquando da incubação com concentração de 0,7 μM o tipo de morte celular que predominou foi a apoptose. Comparando as populações celulares da condição controlo e dos tratamentos com doxorrubicina, verifica-se que existem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre todos os tratamentos e o controlo, para todas as populações celulares, excepto para a população em apoptose entre o

controle e as células tratadas com 0,1 μM de doxorrubicina.

Por sua vez, também a viabilidade celular das células HuH7 (Figura 35B) diminuiu à medida que se aumentou a concentração de doxorrubicina. Verificou-se a ocorrência de um balanço entre a morte celular por apoptose e por necrose para as duas menores concentrações de doxorrubicina utilizadas, observando-se um ligeiro aumento da apoptose quando as células foram incubadas com 30 μM deste fármaco. Ao comparar a percentagem de células em cada uma das populações na condição controle e nos tratamentos com doxorrubicina constatou-se que existem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre todas as populações das células tratadas e do controle.

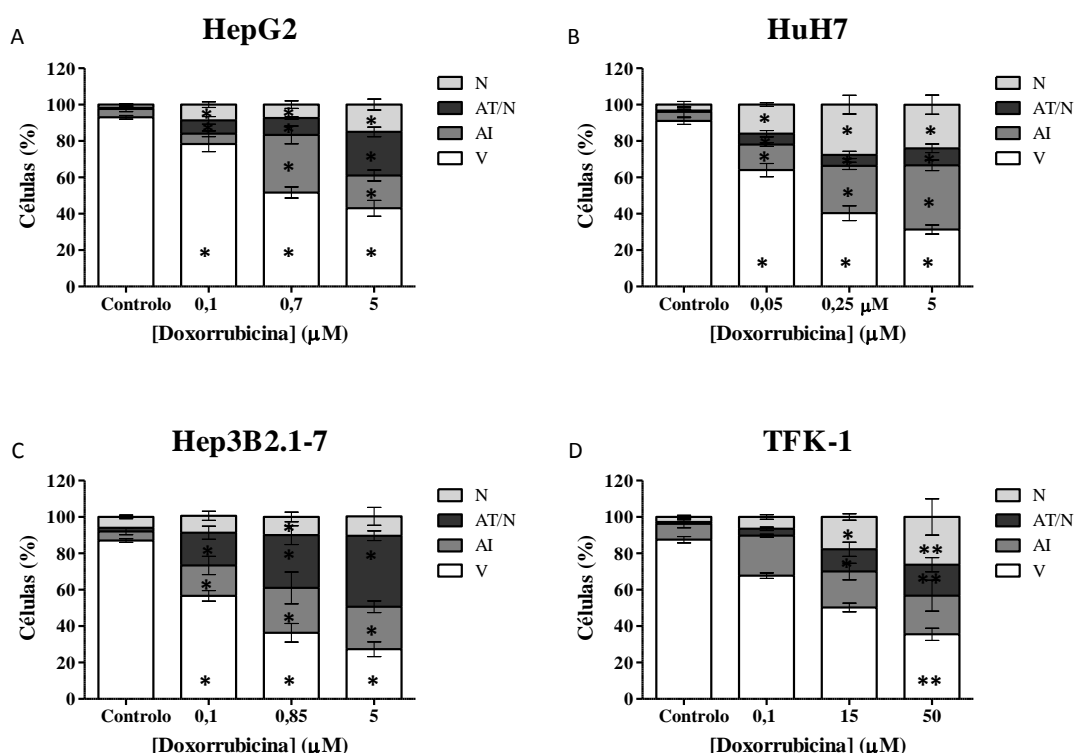


Figura 35: Análise da viabilidade celular e tipos de morte celular induzidos, por citometria de fluxo recorrendo à dupla marcação AV-FITC e IP, após incubação com diferentes concentrações de doxorrubicina, durante 48 horas, nas linhas celulares HepG2 (A), HuH7 (B), Hep3B2.1-7 (C) e TFK-1 (D). Os resultados estão representados na forma de percentagem de células viáveis (V), em apoptose inicial (AI), apoptose tardia/necrose (AT/N) e necrose (N). Os resultados expressam a média e o desvio padrão de quatro experiências independentes. As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle estão assinaladas com * que representa $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

Também a viabilidade celular das células Hep3B2.1-7 (Figura 35C) diminuiu à medida que se aumentou a concentração de fármaco, ocorrendo sempre diferenças com significado estatístico ($p < 0,05$) entre a percentagem de células viáveis da condição controle e das outras condições. As células tendem a morrer por apoptose tardia/necrose, ocorrendo sempre diferenças

estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre o controlo e as condições testadas, para esta população celular. Também no que diz respeito às populações de células em apoptose ocorrem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos e o controlo. Em relação às células em necrose, a sua percentagem é diminuta e apenas existe significância estatística entre a população do controlo e as células incubadas com $0,85 \mu\text{M}$ de doxorrubicina.

Quanto à viabilidade da linha celular TFK-1 (Figura 35D) decresceu gradualmente à medida que se aumentou a concentração de doxorrubicina, ocorrendo significância estatística entre as células viáveis da condição controlo e as incubadas com $50 \mu\text{M}$ de doxorrubicina ($p < 0,05$). No que diz respeito à morte celular induzida, observou-se um balanço entre a apoptose e a necrose, existindo diferenças com significado estatístico entre as células em apoptose tardia/necrose no controlo e nas condições $15 \mu\text{M}$ ($p < 0,05$) e controlo e $50 \mu\text{M}$ ($p < 0,01$), e também nas populações em necrose no controlo e $15 \mu\text{M}$ ($p < 0,05$) e controlo e $50 \mu\text{M}$ ($p < 0,01$).

A Figura 36 representa a viabilidade celular e os tipos de morte celular induzida em resposta ao tratamento com 5-fluorouracilo nas diferentes linhas celulares em estudo.

A analisar a Figura 36A verifica-se que a viabilidade celular da linha HepG2 diminuiu à medida que se aumentou a concentração de 5-fluorouracilo, embora a percentagem de células viáveis nunca seja inferior a 65%. Contudo, existem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre as populações de células viáveis presentes na condição controlo e nas células tratadas com $200 \mu\text{M}$ e $500 \mu\text{M}$ de 5-fluorouracilo. O tipo de morte celular predominante foi a apoptose, existindo diferenças estatisticamente significativas entre as células em apoptose nas culturas controlo e nas culturas em tratamento com $200 \mu\text{M}$ e $500 \mu\text{M}$ do referido fármaco. Embora de uma maneira mais diminuta, a percentagem de células em apoptose tardia/necrose e necrose também aumentou de um modo estatisticamente significativo ($p < 0,05$) na condição de $200 \mu\text{M}$ de 5-fluorouracilo em relação ao controlo.

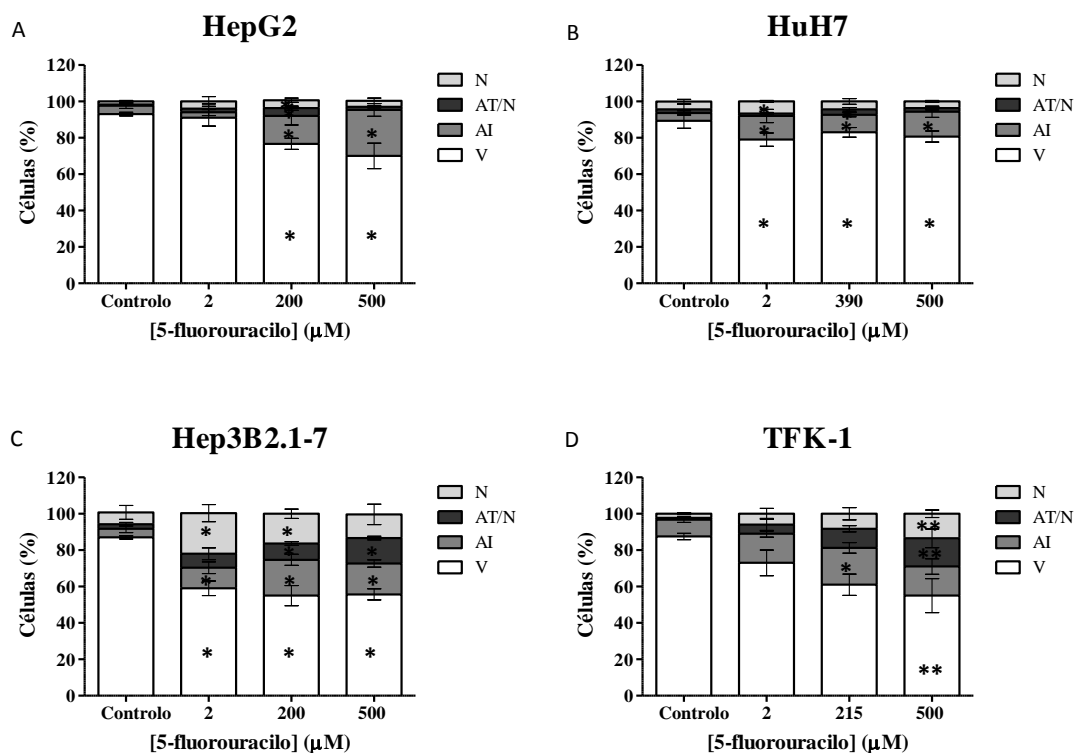


Figura 36: Análise da viabilidade celular e tipos de morte celular induzidos, por citometria de fluxo recorrendo à dupla marcação AV-FITC e IP, após incubação com diferentes concentrações de 5-fluorouracilo, durante 48 horas, nas linhas celulares HepG2 (A), HuH7 (B), Hep3B2.1-7 (C) e TFK-1 (D). Os resultados estão representados na forma de percentagem de células viáveis (V), em apoptose inicial (AI), apoptose tardia/necrose (AT/N) e necrose (N). Os resultados expressam a média e o desvio padrão de quatro experiências independentes. As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo estão assinaladas com * que representa $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

A viabilidade celular das células HuH7 (Figura 36B) decresceu quando se incubou esta linha celular com 2 μM de 5-fluorouracilo, permanecendo constante com o aumento da concentração deste composto. Contudo, existem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre as populações das células viáveis na condição controlo e nos tratamentos. De entre as células mortas, a forma de morte celular predominante foi a apoptose, ocorrendo diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre as populações de células em apoptose no controlo e nos tratamentos. Observaram-se também diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre as células em apoptose tardia/necrose no controlo e na condição 390 μM, e entre as células em necrose no grupo controlo e nas células incubadas com 2 μM de 5-fluorouracilo.

No que diz respeito aos resultados obtidos para a linha celular Hep3B2.1-7 (Figura 36C), constatou-se que a viabilidade celular diminuiu com o tratamento com 5-fluorouracilo, ocorrendo sempre diferenças com significância estatística ($p < 0,05$) entre as células viáveis do controlo e as células viáveis dos diversos tratamentos. Em resposta aos tratamentos com 5-fluorouracilo verificou-se a

existência de um balanço entre os diversos tipos de morte celular, com diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre as populações em apoptose no controlo e nos diversos tratamentos, as populações em apoptose tardia/necrose no grupo controlo e nos grupos tratados com 200 μM e 500 μM , e as populações em necrose no grupo controlo e nos grupos incubados com 2 μM e 200 μM de 5-fluorouracilo.

À medida que se aumentou a concentração de 5-fluorouracilo, a viabilidade celular da linha celular TFK-1 (Figura 36D) diminuiu, existindo diferenças estatisticamente significativas entre as células viáveis no controlo e na condição 500 μM ($p < 0,01$). O tratamento com 5-fluorouracilo induziu morte celular tanto por necrose como por apoptose, com significância estatística, no caso da necrose entre o controlo e o tratamento com 500 μM ($p < 0,01$). No que diz respeito às células em apoptose inicial, existe significância estatística entre a condição controlo e o tratamento com 215 μM ($p < 0,05$), e no caso da apoptose tardia/necrose, entre o controlo e o tratamento com 500 μM de 5-fluorouracilo ($p < 0,01$).

A Figura 37 representa os resultados obtidos através da análise da viabilidade celular e tipos de morte celular induzida em resposta ao tratamento com sorafenib, através da citometria de fluxo com recurso à dupla marcação com AV-FITC e IP, nas linhas celulares de carcinoma hepatocelular e colangiocarcinoma em estudo.

De acordo com a Figura 37, constata-se que ao incubar a linha celular HepG2 (Figura 37A) com concentrações crescentes de sorafenib a viabilidade celular diminuiu de forma progressiva, havendo diferenças com significado estatístico entre as células viáveis nas condições controlo e de tratamento com 100 μM ($p < 0,01$). Em relação à morte celular, para as duas menores concentrações de fármaco testadas, o tipo de morte celular predominante foi a apoptose, ocorrendo diferenças estatisticamente significativas entre as células em apoptose inicial no controlo e nas condições de tratamento com 2,5 μM ($p < 0,05$) e com 7,5 μM ($p < 0,05$). Ao aumentar a concentração de sorafenib para 100 μM , as células tendem a morrer por apoptose tardia/necrose ou por necrose, havendo diferenças estatisticamente significativas entre as células em apoptose tardia/necrose na condição controlo e na condição de tratamento com 100 μM ($p < 0,01$) e entre o tratamento com 2,5 μM e com 100 μM ($p < 0,05$).

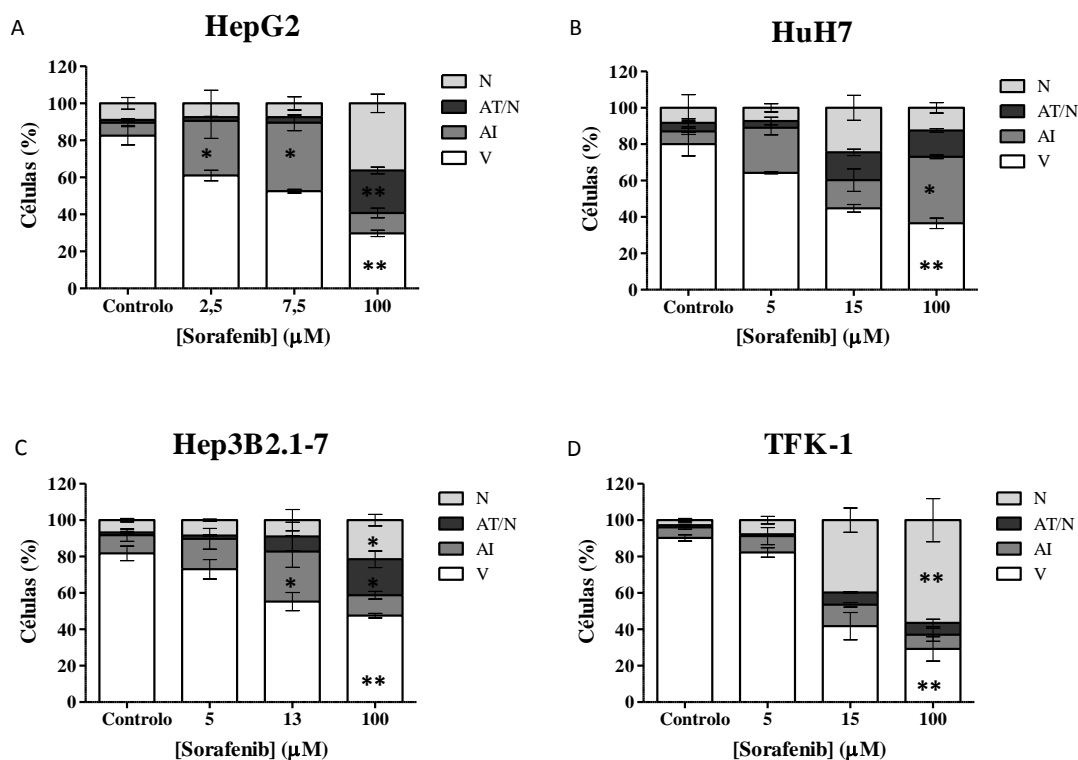


Figura 37: Análise da viabilidade celular e tipos de morte celular induzidos, por citometria de fluxo recorrendo à dupla marcação AV-FITC e IP, após incubação com diferentes concentrações de sorafenib, durante 48 horas, nas linhas celulares HepG2 (A), HuH7 (B), Hep3B2.1-7 (C) e TFK-1 (D). Os resultados estão representados na forma de percentagem de células viáveis (V), em apoptose inicial (AI), apoptose tardia/necrose (AT/N) e necrose (N). Os resultados expressam a média e o desvio padrão de quatro experiências independentes. As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo estão assinaladas com * que representa $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

De modo semelhante, a viabilidade da linha celular HuH7 (Figura 37B) diminuiu à medida que se aumentou a concentração de sorafenib. Existem diferenças com significado estatístico entre as populações de células viáveis do controlo e as células incubadas com 100 μM de fármaco ($p < 0,01$). Ao incubar as células HuH7 com 5 μM de sorafenib, o tipo de morte celular predominante foi a apoptose inicial, havendo um decréscimo desta e aumento da apoptose tardia/necrose e da necrose quando se aumentou a concentração de composto para 15 μM. Já em resposta à maior concentração de sorafenib utilizada, as células tenderam a morrer maioritariamente por apoptose inicial, havendo diferenças com significado estatístico relativamente ao controlo ($p < 0,05$). Também se verificaram diferenças com significado estatístico entre as células em apoptose tardia/necrose entre a condição de 5 μM e a condição de 100 μM ($p < 0,05$).

Já em relação às células Hep3B2.1-7 (Figura 37C), também se verificou um decréscimo da viabilidade celular à medida que a concentração de sorafenib testada aumentou, com diferenças estatisticamente significativas entre as células

viáveis da condição controlo e da condição de tratamento com 100 μM ($p < 0,01$). Para as duas menores concentrações de sorafenib utilizadas, o tipo de morte celular predominante foi a apoptose, ocorrendo diferenças estatisticamente significativas entre as células em apoptose inicial nas condições controlo e de tratamento com 13 μM ($p < 0,05$). Ao aumentar a concentração de sorafenib para 100 μM , decresceu a percentagem das células em apoptose inicial, aumentando a apoptose tardia/necrose e a necrose. Existem diferenças estatisticamente significativas entre as células em apoptose tardia/necrose e também em necrose na condição de tratamento com 100 μM relativamente à condição controlo ($p < 0,05$).

No que diz respeito às células TFK-1 (Figura 37D), de modo semelhante ao observado para as linhas celulares de carcinoma hepatocelular, também aqui a viabilidade celular decresceu à medida que se aumentou a concentração de sorafenib, observando-se diferenças estatisticamente significativas entre as populações de células viáveis no controlo e na condição de tratamento com 100 μM ($p < 0,01$). Para as duas maiores concentrações de fármaco utilizadas, o tipo de morte celular predominante foi a necrose, havendo significância estatística entre as células necróticas no controlo e na condição de tratamento com 100 μM ($p < 0,01$). Também entre as células em apoptose tardia/necrose entre a condição de 5 μM e a condição de 15 μM existem diferenças com significado estatístico ($p < 0,05$).

Expressão de BAX e de BCL-2

O cálculo da razão entre a expressão proteica de BAX e de BCL-2 em resposta ao tratamento com doxorrubicina, com cisplatina, com 5-fluorouracilo e com sorafenib estão representados na Figura 38.

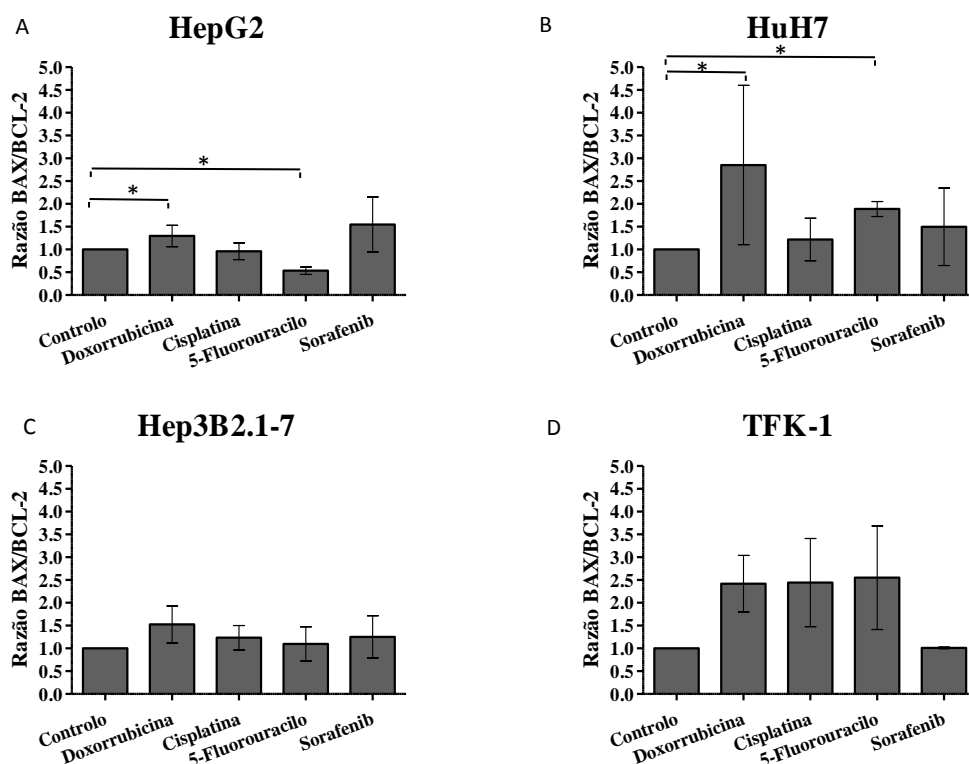


Figura 38: Razão entre a expressão proteica de BAX e de BCL-2 em resposta ao tratamento com cisplatina, doxorrubicina, 5-fluorouracilo e sorafenib. Na figura estão representados os resultados obtidos para a linha celular HepG2 (A), HuH7 (B), Hep3B2.1-7 (C) e TFK-1 (D). A expressão proteica de BAX e BCL-2 foi determinada por citometria de fluxo após uma incubação de 48 horas com o valor correspondente ao IC_{50} previamente calculado para cada fármaco e para cada linha celular em estudo. Os gráficos representam o resultado de 4 experiências independentes. As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo estão assinaladas com * que representa $p < 0,05$.

Observando a Figura 38 verifica-se que, no caso da linha celular HepG2 (Figura 38A), quando as células foram incubadas com doxorrubicina ocorreu um aumento da razão BAX/BCL-2 em relação às células controlo. Este resultado apresenta diferenças com significância estatística relativamente ao controlo ($p < 0,05$). Por sua vez, quando as células foram incubadas com 5-fluorouracilo, observou-se um decréscimo da referida razão em relação ao controlo, de um modo estatisticamente significativo ($p < 0,05$). No que diz respeito ao tratamento com cisplatina e com sorafenib, no primeiro caso não se verificaram diferenças entre o controlo e o tratamento, e em relação ao sorafenib, observou-se uma tendência para um aumento da razão BAX/BCL-2.

Relativamente à linha celular HuH7 (Figura 38B), o tratamento com doxorrubicina induziu um aumento da razão BAX/BCL-2 de um modo estatisticamente significativo ($p < 0,05$), comparativamente ao controlo. O tratamento com os outros fármacos mencionados também conduziu a um aumento desta razão relativamente ao controlo, verificando-se diferenças com significado

estatístico entre as células controlo e aquelas que foram incubadas com 5-fluorouracilo ($p < 0,05$).

No caso da linha celular Hep3B2.1-7 (Figura 38C), todos os tratamentos conduziram a uma tendência para um aumento na razão BAX/BCL-2 comparativamente ao controlo, embora não se observem diferenças com significância estatística para nenhum dos tratamentos.

Por fim, em relação à linha celular TFK-1, com excepção do sorafenib todos os outros fármacos testados induziram uma clara tendência para um aumento da razão BAX/BCL-2 (Figura 38D).

Inibidores competitivos do GLUT-1: quercetina e gossipol

Actividade metabólica

Os gráficos da Figura 39 representam as curvas dose-resposta obtidas através do tratamento com quercetina nas linhas celulares HepG2 (Figura 39A), HuH7 (Figura 39B), Hep3B2.1-7 (Figura 39C) e TFK-1 (Figura 39D) após 24, 48, 72 e 96 horas de incubação com o referido composto.

A partir das curvas dose-resposta apresentadas foi possível calcular a concentração inibitória média (IC_{50}) nas diversas linhas celulares em estudo, para todos os tempos de incubação testados. Estes valores, assim como os intervalos de confiança respectivos estão apresentados na Tabela 17.

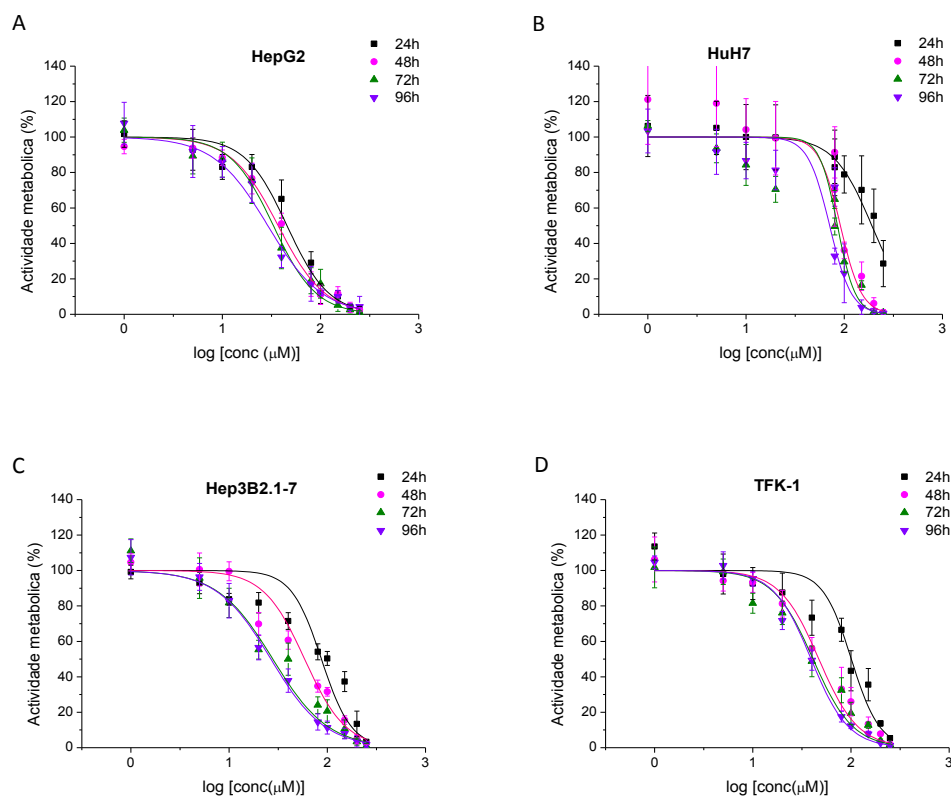


Figura 39: Curvas dose-resposta das quatro linhas celulares em estudo em resposta à incubação com quercetina. Avaliação da actividade metabólica pelo ensaio do MTT, 24, 48, 72 e 96 horas após incubação com concentrações crescentes de quercetina nas linhas celulares HepG2 (A), HuH7 (B), Hep3B2.1-7 (C) e TFK-1 (D). Os resultados expressam a média e o desvio padrão de seis experiências independentes. O r^2 obtido foi sempre igual ou superior a 0,9.

Tabela 17: Valores de IC_{50} , e intervalos de confiança obtidos para as linhas celulares HepG2, HuH7, Hep3B2.1-7 e TFK-1, quando incubadas com quercetina para os diferentes tempos de incubação.

Quercetina								
Linha celular	HepG2		HuH7		Hep3B2.1-7		TFK-1	
	IC_{50} (μM)	Intervalo de confiança	IC_{50} (μM)	Intervalo de confiança	IC_{50} (μM)	Intervalo de confiança	IC_{50} (μM)	Intervalo de confiança
24h	45,53	[36,62; 56,61]	174,26	[156,85; 193,61]	87,07	[65,67; 115,44]	100,77	[82,39; 123,24]
48h	37,67	[31,24; 39,34]	90,60	[79,35; 93,81]	50,35	[46,23; 64,06]	48,65	[33,56; 53,22]
72h	33,06	[26,32; 35,91]	72,21	[52,08; 81,29]	27,88	[20,06; 31,42]	41,11	[26,97; 47,89]
96h	29,02	[24,38; 30,91]	61,61	[53,36; 65,20]	26,63	[23,21; 27,99]	39,26	[32,09; 42,24]

Através da análise da Figura 39 e da Tabela 17 é possível verificar que a quercetina possui um efeito inibitório da actividade metabólica em todas as linhas celulares em estudo, dependente do tempo de incubação e da concentração de composto. Deste modo, tanto para as linhas celulares de carcinoma hepatocelular como para a linha celular de colangiocarcinoma, à medida que se aumentou o tempo de incubação com quercetina, o valor de IC_{50} diminuiu.

Observando os valores de IC₅₀ descritos na Tabela 17 constata-se que para os tempos de incubação mais curtos a linha celular mais sensível à quercetina foi a HepG2. Porém, ao aumentar o tempo de incubação, os menores valores de IC₅₀ foram obtidos com a linha celular Hep3B2.1-7.

Para a linha celular HepG2 verificou-se que ocorreram diferenças com significado estatístico entre os valores de IC₅₀ obtidos após 24 e 48 horas de incubação ($p < 0,05$), 24 e 72 horas de incubação ($p < 0,01$), 48 e 96 horas de incubação ($p < 0,01$) e, finalmente, entre as 24 e as 96 horas ($p < 0,001$).

Em relação aos valores de concentração inibitória média obtidos para a linha celular HuH7, existe significância estatística entre todos os valores obtidos ($p < 0,05$), excepto entre as 48 e 72 horas de incubação.

Através da análise estatística verificou-se que entre os valores de IC₅₀ obtidos para a linha celular Hep3B2.1-7 ocorrem sempre diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$), exceptuando entre os valores obtidos após 72 e 96 horas de incubação.

Por fim, entre os valores de IC₅₀ calculados para a linha celular TFK-1 observam-se diferenças com significância estatística ($p < 0,001$) entre o valor obtido após 24 horas e os outros tempos de incubação.

Por sua vez, comparando os valores de IC₅₀ obtidos após 48 horas de incubação com quercetina para as diversas linhas celulares em estudo, verifica-se que ocorrem diferenças com significado estatístico ($p < 0,001$) entre os valores obtidos para as linhas celulares HepG2 e HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7, HuH7 e Hep3B2.1-7 e HuH7 e TFK-1.

Através do ensaio do MTT obtiveram-se também as curvas dose-resposta relativas à incubação com gossipol, para os vários tempos testados e para todas as linhas celulares estudadas. As referidas curvas dose-resposta estão representadas na Figura 40.

A partir das curvas dose-resposta representadas na Figura 40 foi possível estabelecer os valores de IC₅₀ e intervalos de confiança correspondentes, em resposta ao tratamento com gossipol para todas as linhas celulares em estudo. Esses valores estão representados na Tabela 18.

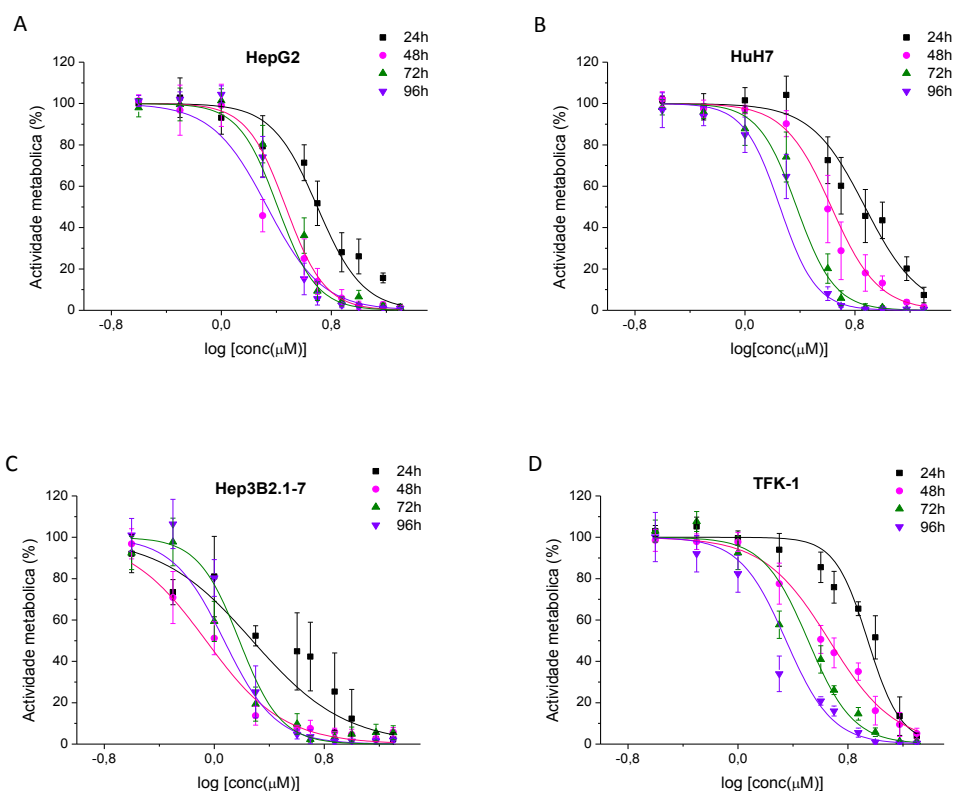


Figura 40: Curvas dose-resposta das quatro linhas celulares em estudo em resposta à incubação com gossipol. Avaliação da actividade metabólica pelo ensaio do MTT, 24, 48, 72 e 96 horas após incubação com concentrações crescentes de gossipol nas linhas celulares HepG2 (A), HuH7 (B), Hep3B2.1-7 (C) e TFK-1 (D). Os resultados expressam a média e o desvio padrão de seis experiências independentes. O r^2 obtido foi sempre igual ou superior a 0,9.

Tabela 18: Valores de IC_{50} , e intervalos de confiança obtidos para as linhas celulares HepG2, HuH7, Hep3B2.1-7 e TFK-1, quando incubadas com gossipol para os diferentes tempos de incubação.

Gossipol								
Linha celular	HepG2		HuH7		Hep3B2.1-7		TFK-1	
	IC_{50} (μM)	Intervalo de confiança	IC_{50} (μM)	Intervalo de confiança	IC_{50} (μM)	Intervalo de confiança	IC_{50} (μM)	Intervalo de confiança
24h	5,66	[4,94; 6,47]	7,47	[6,84; 8,15]	1,89	[1,64; 2,18]	8,95	[7,72; 10,39]
48h	2,16	[1,96; 2,37]	4,24	[4,03; 4,46]	0,87	[0,72; 1,05]	4,36	[3,87; 4,92]
72h	2,94	[2,64; 3,28]	2,37	[2,18; 2,58]	1,18	[1,03; 1,35]	2,89	[2,31; 3,61]
96h	2,57	[2,23; 2,96]	1,79	[1,44; 2,23]	1,52	[1,36; 1,70]	1,46	[1,50; 2,06]

Observando a Figura 40 e a Tabela 18 constata-se que tal como ocorre com a quercetina, com gossipol a actividade metabólica das linhas celulares estudadas também diminuiu em resposta ao tratamento, de forma dependente do tempo e da concentração de composto. Para todas as linhas celulares em estudo, à medida que se aumentou o tempo de incubação, o valor de IC_{50} diminuiu, com excepção da linha celular Hep3B2.1-7 onde se verificou um aumento do valor de IC_{50} obtido a partir das 48 horas de tratamento com gossipol.

A linha celular mais sensível ao tratamento com este composto foi a Hep3B2.1-7, sendo que para todos os tempos de incubação estudados (excepto 96 horas) foi com esta linha celular que se obtiveram os menores valores de IC₅₀. Por outro lado, a linha celular que demonstrou ser mais resistente ao gossipol para tempos de incubação mais curtos foi a linha celular de colangiocarcinoma, a TFK-1.

No que diz respeito aos dados obtidos com a linha celular HepG2, verifica-se que ocorreram diferenças estatisticamente significativas entre os valores de IC₅₀ calculados após 24 e 48 horas de incubação com gossipol ($p < 0,001$), 24 e 72 horas ($p < 0,001$), 24 e 96 horas ($p < 0,001$) e 48 e 72 horas ($p < 0,01$).

Entre os valores de concentração inibitória média calculados para a linha celular HuH7 observaram-se diferenças com significância estatística entre todos os valores calculados ($p < 0,001$) excepto entre os valores de IC₅₀ obtidos após 72 horas e 96 horas de incubação com gossipol.

Em relação à linha celular Hep3B2.1-7, os valores de IC₅₀ determinados possuem diferenças estatisticamente significativas com p inferior a 0,001 entre as 24 horas e as 48 horas de incubação com o composto referido, e p inferior a 0,01 entre as 48 horas e as 96 horas. À medida que se aumentou o tempo de incubação com gossipol, os valores de IC₅₀ obtidos para a linha celular TFK-1 diminuíram, ocorrendo sempre diferenças estatisticamente significativas entre eles ($p < 0,001$).

Comparando entre si os valores de IC₅₀ obtidos após 48 horas de incubação com gossipol para as diversas linhas celulares em estudo, verifica-se que existem diferenças com significado estatístico ($p < 0,001$) entre os valores obtidos para todas as linhas celulares, exceptuando entre as células HuH7 e TFK-1.

Sobrevivência celular

Através do ensaio clonogénico avaliou-se a sobrevivência celular em resposta ao tratamento com quercetina nas linhas celulares de carcinoma hepatocelular e colangiocarcinoma em estudo. Os gráficos da Figura 41 revelam os factores de sobrevivência obtidos para as condições estudadas. Os referidos factores de sobrevivência foram calculados em relação às culturas controlo. A Figura 41 mostra os resultados obtidos para a linha celular HepG2 (Figura 41A), HuH7 (Figura 41B), Hep3B2.1-7 (Figura 41C) e TFK-1 (Figura 41D).

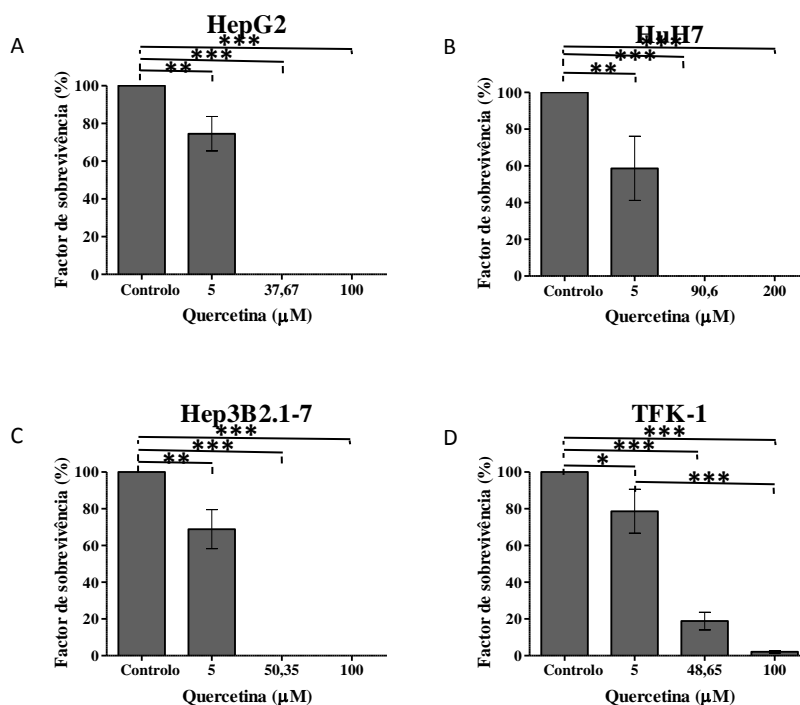


Figura 41: Análise da sobrevivência celular, em resposta à quercetina, pelas linhas celulares HepG2 (A), HuH7 (B), Hep3B2.1-7 (C) e TFK-1 (D) através do ensaio clonogénico. As culturas celulares foram submetidas aos tratamentos apresentados na Tabela 3, e a formação de colónias foi quantificada ao 12º dia após o tratamento com quercetina. O gráfico expressa a percentagem de colónias formadas em relação ao controlo, assim como as respectivas médias e os desvios padrão de seis experiências independentes. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas com *. A utilização de * representa $p < 0,05$, ** representa $p < 0,01$ e *** representa $p < 0,001$.

Observando a Figura 41 constata-se que o tratamento com diferentes concentrações de quercetina induziu alterações significativas a nível da capacidade de formação de colónias em todas as linhas celulares estudadas.

No caso das linhas celulares de carcinoma hepatocelular (Figuras 41A, 41B e 41C), após a incubação com apenas 5 µM de quercetina observou-se uma redução entre 20 a 25% da capacidade de formação de colónias em relação ao controlo, sempre com diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$). Ao aumentar a concentração de quercetina para valores correspondentes ou superiores ao IC_{50} , ocorreu uma total ausência de formação de colónias ($p < 0,001$).

Para a linha celular TFK-1 (Figura 41D), o tratamento com a menor concentração deste composto utilizada (5 µM) induziu uma diminuição significativa ($p < 0,05$), de cerca de 20% na capacidade de formação de colónias. Em relação aos restantes tratamentos verificou-se que com a concentração correspondente ao IC_{50} , assim como para concentração superior a esta, ocorreu uma perda na capacidade de formação de colónias superior a 80%, apresentando estes resultados diferenças com significância estatística relativamente ao controlo ($p < 0,001$). Quando comparadas as condições de tratamento entre si, apenas se

verificaram diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações de 5 μM e de 100 μM ($p < 0,001$).

A Figura 42 representa os resultados obtidos através do ensaio clonogénico em resposta ao tratamento com gossipol. Na figura estão representados os factores de sobrevivência em resposta ao tratamento com este composto para a linha celular HepG2 (Figura 42A), HuH7 (Figura 42B), Hep3B2.1-7 (Figura 42C) e TFK-1 (Figura 42D).

De acordo com a Figura 42 observa-se que de modo semelhante ao que ocorreu com a quercetina, também em resposta ao gossipol a sobrevivência celular diminuiu à medida que se aumentou a concentração de composto, anulando-se por completo para as maiores concentrações.

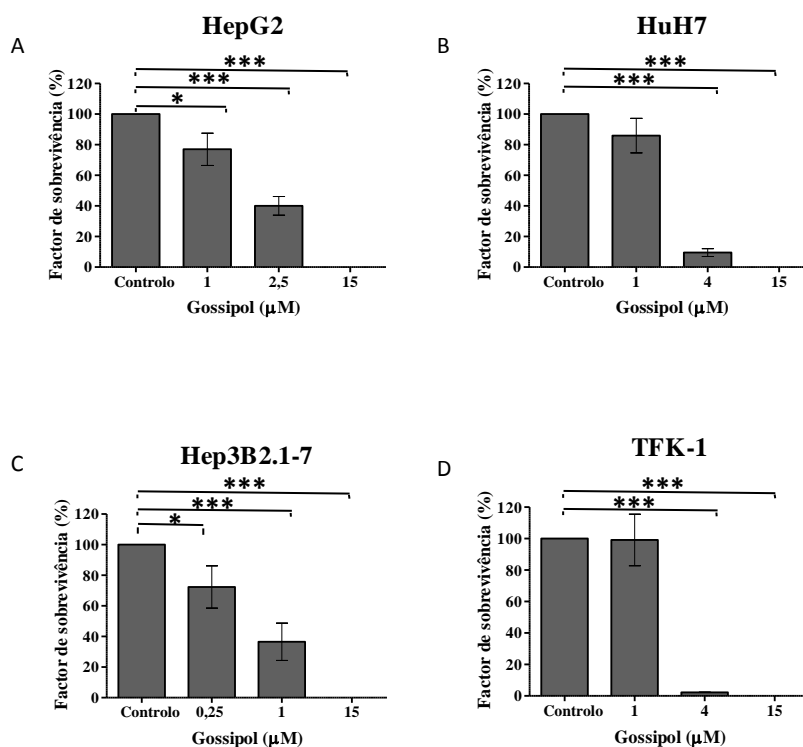


Figura 42: Análise da viabilidade celular, em resposta ao gossipol, pelas linhas celulares HepG2 (A), HuH7 (B), Hep3B2.1-7 (C) e TFK-1 (D) através do ensaio clonogénico. As culturas celulares foram submetidas aos tratamentos apresentados na Tabela 3, e a formação de colónias foi quantificada ao 12º dia após o tratamento. O gráfico expressa a percentagem de colónias formadas em relação ao controlo, assim como as respectivas médias e os desvios padrão de seis experiências independentes. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas com *. A utilização de * representa $p < 0,05$, ** representa $p < 0,01$ e *** representa $p < 0,001$.

Para as linhas celulares HepG2 e Hep3B2.1-7 (Figuras 42A e 42C) verificou-se que à medida que se aumentou a concentração de gossipol a sobrevivência

celular diminuiu sempre, ocorrendo sempre diferenças com significado estatístico entre os factores de sobrevivência das condições controlo e dos tratamentos, sendo $p < 0,05$ entre os valores obtidos entre o controlo e a concentração inferior ao IC_{50} , e $p < 0,001$ entre o controlo e as duas outras concentrações testadas.

Já para as linhas celulares HuH7 e TFK-1 (Figuras 42B e 42D) não se observaram diferenças com significado estatístico entre os factores de sobrevivência dos controlos e das células tratadas com $1 \mu\text{M}$ de gossipol. Por sua vez, ao aumentar a concentração de gossipol para $4 \mu\text{M}$ observou-se uma diminuição bastante significativa ($p < 0,001$) na capacidade de formação de colónias, sendo o factor de sobrevivência nesta condição de cerca de 10% para a linha celular HuH7 e de 2,5% para a linha celular TFK-1. Ao incubar as células com $15 \mu\text{M}$ de gossipol não se observou formação de colónias.

Viabilidade e morte celular

A viabilidade celular e os tipos de morte celular induzidos através do tratamento com quercetina foram analisados com recurso à dupla marcação com AV-FITC e IP por citometria de fluxo. Os resultados obtidos a partir dessa análise estão representados na Figura 43.

A análise da Figura 43A permite-nos verificar que, em resposta à incubação com quercetina, a viabilidade das células HepG2 decresce, ocorrendo simultaneamente uma tendência para activar a morte celular por apoptose. A percentagem de células viáveis decresce para cerca de 60% para a menor concentração de quercetina utilizada, à semelhança do que acontece para as outras duas concentrações testadas. Apenas se verificaram diferenças com significado estatístico ($p < 0,001$) entre a condição controlo e a maior concentração de quercetina utilizada, no que diz respeito à percentagem de células viáveis.

Relativamente à linha celular HuH7 (Figura 43B), quando as células foram incubadas com as duas concentrações menores de quercetina a viabilidade celular manteve-se semelhante à verificada no controlo, porém ao aumentar a concentração para $200 \mu\text{M}$ a viabilidade celular decresceu de forma estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para cerca de 40%. Os tipos de morte celular predominantes foram a apoptose para a concentração de quercetina correspondente ao valor de IC_{50} , ocorrendo um balanço entre a apoptose e a necrose para as outras duas concentrações testadas. Em relação aos resultados obtidos com esta linha celular ocorrem ainda diferenças com significado estatístico

entre as populações das células em apoptose inicial entre o controle e a concentração de 200 μM ($p < 0,005$) e nas células em necrose entre a concentração correspondente ao IC_{50} e os 200 μM ($p < 0,05$).

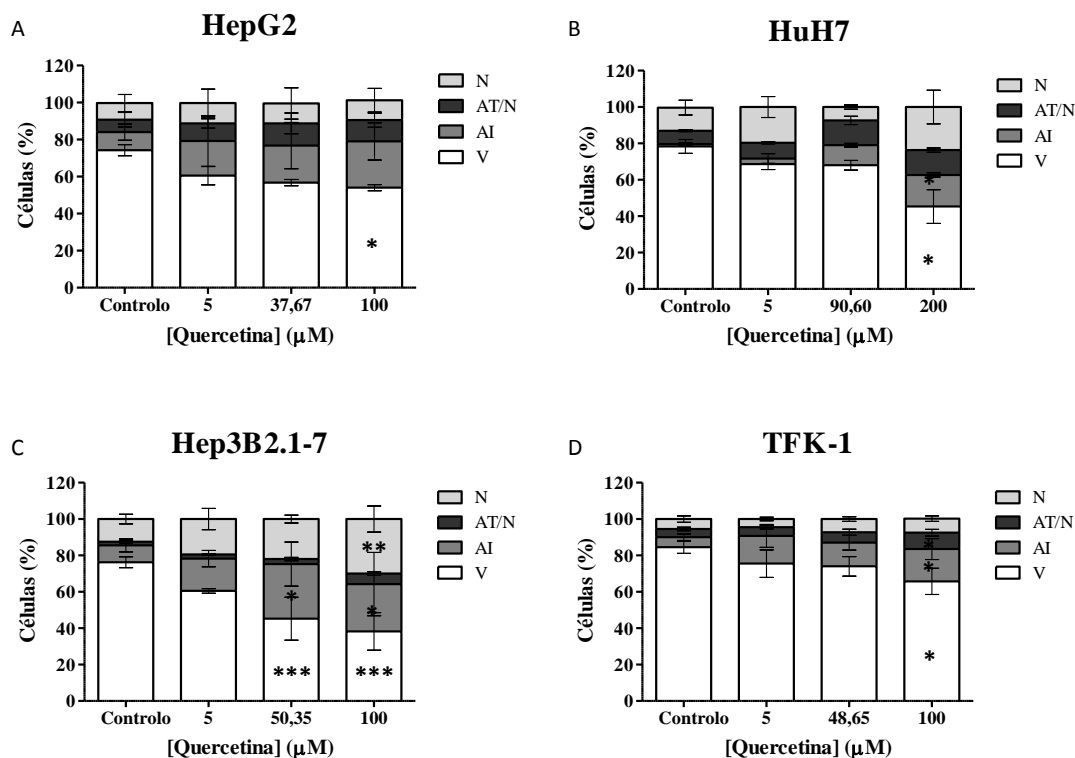


Figura 43: Análise da viabilidade celular e tipos de morte celular induzidos, por citometria de fluxo recorrendo à dupla marcação com AV-FITC e IP, após incubação com diferentes concentrações de quercetina, durante 48 horas, nas linhas celulares HepG2 (A), HuH7 (B), Hep3B2.1-7 (C) e TFK-1 (D). Os resultados estão representados na forma de percentagem de células viáveis (V), em apoptose inicial (AI), apoptose tardia/necrose (AT/N) e necrose (N). Os resultados expressam a média e o desvio padrão de quatro experiências independentes. As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle estão assinaladas com * que representa $p < 0,05$, ** que representa $p < 0,01$ e *** que representa $p < 0,001$.

Por sua vez, para a linha celular Hep3B2.1-7 (Figura 43C) verifica-se que quando as células foram incubadas com quercetina na concentração correspondente ao IC_{50} , apenas cerca de 45% das células permaneceram viáveis, ocorrendo diferenças com significância estatística em relação ao controle ($p < 0,001$). Das restantes, cerca de 20% morreram por necrose e cerca de 35% por apoptose, sendo este último valor significativamente diferente do controle ($p < 0,05$). Com o aumento da concentração de quercetina para 100 μM , a percentagem de células viáveis mantém-se sensivelmente constante em relação à condição anterior e a percentagem das células em apoptose inicial tende a igualar-se com a percentagem de células em necrose. Verificaram-se diferenças

estatisticamente significativas entre as populações de células viáveis das condições controlo e com concentração de 100 μM ($p < 0,05$) e das condições 5 μM e 100 μM , assim como entre as populações em apoptose inicial ($p < 0,05$) e a de necrose ($p < 0,01$) das condições controlo e 100 μM .

Para a linha celular TFK-1 (Figura 43D) é possível observar que a quercetina não induziu um aumento muito evidente da morte celular pois, mesmo quando as células foram tratadas com 100 μM deste composto, a viabilidade celular rondou os 65%. Verifica-se, porém, que ocorreram diferenças com significado estatístico ($p < 0,05$) entre as populações das células viáveis da condição controlo e das células incubadas com 100 μM de quercetina. Ainda assim, verificou-se que quando ocorreu morte celular foi essencialmente por apoptose, observando-se diferenças estatisticamente significativas nas células em apoptose inicial entre as condições controlo e 100 μM ($p < 0,05$) e nas células em apoptose tardia/necrose também entre o controlo e as células incubadas com 100 μM de quercetina ($p < 0,05$).

Também através da citometria de fluxo com recurso à dupla marcação com AV-FITC e IP foi possível avaliar a viabilidade celular remanescente, assim como os tipos de morte celular induzidos em resposta ao tratamento com gossipol. Esses resultados estão representados na Figura 44.

Analisando a Figura 44A constata-se que à medida que a concentração de gossipol aumentou, a viabilidade celular das células HepG2 decresceu, ocorrendo diferenças com significância estatística ($p < 0,01$) entre as populações de células viáveis da condição controlo e das células incubadas com 15 μM de gossipol. O tipo de morte celular predominante foi a apoptose, sendo que, entre as células em apoptose da condição controlo e na condição de 15 μM ocorrem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$).

De modo semelhante, verificou-se que com o aumento da concentração de gossipol a viabilidade celular da linha HuH7 (Figura 44B) decresceu, ocorrendo diferenças com significância estatística ($p < 0,01$) entre as populações de células viáveis no controlo e na incubação com 15 μM de gossipol. A diminuição na viabilidade foi acompanhada por um aumento da morte celular, sendo o tipo de morte celular predominante a apoptose tardia/necrose, ocorrendo diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$) entre as células em apoptose tardia/necrose das condições de controlo e com a concentração de 15 μM .

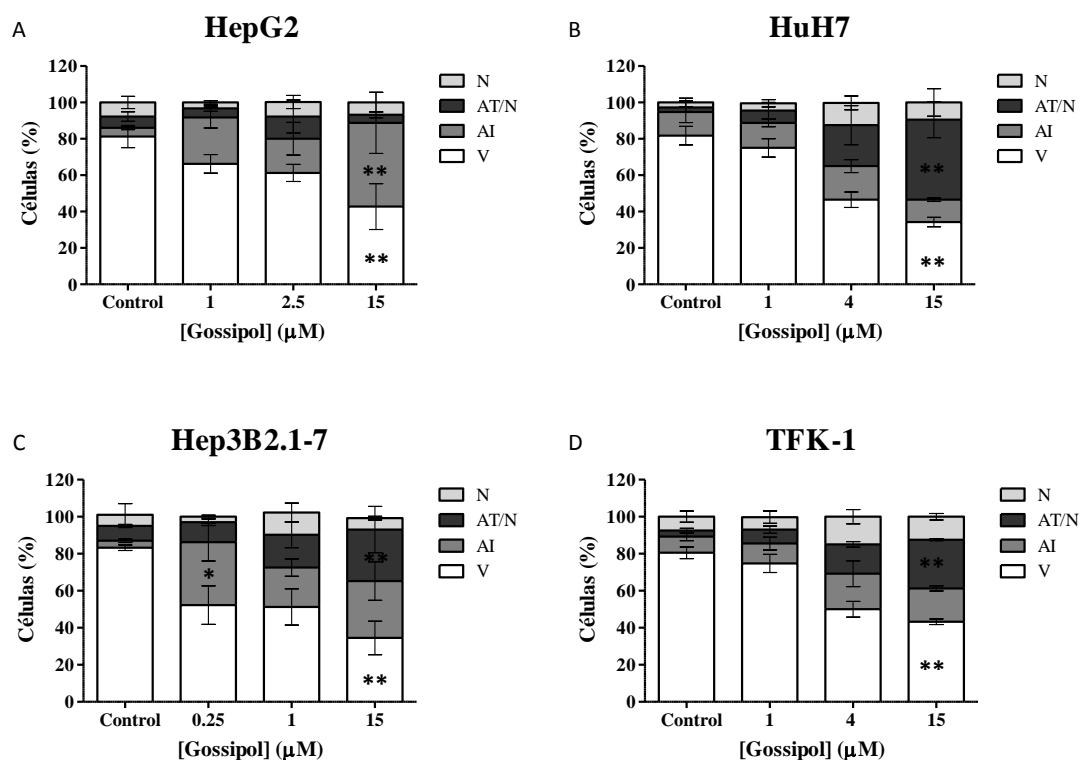


Figura 44: Análise da viabilidade celular e tipos de morte celular induzida, por citometria de fluxo recorrendo à dupla marcação com AV-FITC e IP, após incubação com diferentes concentrações de gossipol, durante 48 horas, nas linhas celulares HepG2 (A), HuH7 (B), Hep3B2.1-7 (C) e TFK-1 (D). Os resultados estão representados na forma de percentagem de células viáveis (V), em apoptose inicial (AI), apoptose tardia/necrose (AT/N) e necrose (N). Os resultados expressam a média e o desvio padrão de quatro experiências independentes. As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo estão assinaladas com * que representa $p < 0,05$ e ** que representa $p < 0,01$.

No que diz respeito aos resultados obtidos com a linha celular Hep3B2.1-7 (Figura 44C), observou-se que de modo semelhante ao que ocorreu para as linhas celulares HepG2 e HuH7, também aqui a viabilidade celular decresceu à medida que se aumentou a concentração de gossipol. Ocorreram diferenças com significado estatístico ($p < 0,01$) entre as populações de células viáveis das condições controlo e na concentração de 15 μM . Quando as células foram incubadas com apenas 0,25 μM de gossipol, o tipo de morte preferencial foi a apoptose, existindo diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre as células em apoptose nesta condição e as do controlo. Por sua vez, ao aumentar a concentração de gossipol, verificou-se um balanço entre a morte celular por apoptose, e apoptose tardia/necrose, com diferenças significativamente diferentes entre as populações em apoptose tardia/necrose das condições controlo e 15 μM ($p < 0,05$). Ainda no âmbito dos resultados obtidos para a linha celular Hep3B2.1-7, verificaram-se diferenças estatisticamente significativas entre as condições com

concentração de 0,25 μM e de 1 μM ($p < 0,05$) no que diz respeito às células em necrose.

Observando a Figura 44D, verifica-se que também no caso da linha celular TFK-1, a viabilidade decresceu com o aumento da concentração de gossipol, observando-se diferenças com significância estatística ($p < 0,01$) entre as células viáveis das condições controlo e com a concentração de 15 μM . No que diz respeito aos tipos de morte celular induzida observou-se um balanço entre os diversos tipos de morte, havendo uma ligeira tendência para a apoptose tardia/necrose quando as células foram incubadas com 15 μM de gossipol. Para esta linha celular ocorreram ainda diferenças estatisticamente significativas entre as populações de células em necrose das condições de 0,25 μM e de 1 μM , e as populações de células em apoptose tardia/necrose do controlo e das células incubadas com 15 μM .

Expressão de BAX e de BCL-2

A fim de determinar a relação entre a expressão proteica de BAX e de BCL-2 em resposta aos tratamentos com quercetina e com gossipol recorreu-se à citometria de fluxo. Os gráficos das Figuras 45 e 46 representam, respectivamente, os valores da razão BAX/BCL-2 obtidos em cada uma das condições testadas para as linhas celulares HepG2, HuH7, Hep3B2.1-7 e TFK-1.

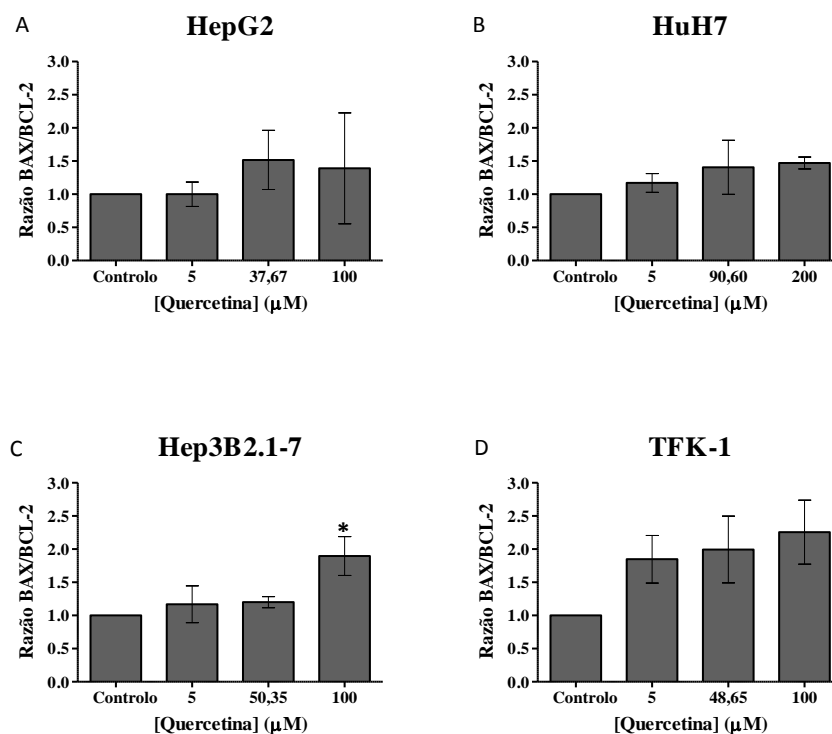


Figura 45: Análise da razão entre a expressão de BAX e a expressão de BCL-2 em resposta ao tratamento com quercetina nas linhas celulares HepG2 (A), HuH7 (B), Hep3B2.1-7 (C) e TFK-1 (D). Os resultados apresentados são expressos em razão BAX/BCL-2 para cada uma das condições em estudo, estando normalizados relativamente ao controlo. Os resultados exprimem a média e o desvio padrão de três experiências independentes. As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo estão assinaladas com *. A utilização de * representa $p < 0,05$.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 45 constata-se que o tratamento com quercetina conduziu a uma tendência para aumentar a razão BAX/BCL-2 relativamente ao controlo em todas as linhas celulares em estudo. Em relação à linha celular Hep3B2.1-7 observam-se diferenças com significado estatístico entre a razão BAX/BCL-2 das células controlo e das células tratadas com 100 μM de quercetina ($p < 0,05$).

Através da análise da Figura 46 constata-se que, na linha celular HepG2, o tratamento com gossipol não induziu alterações na razão BAX/BCL-2 (Figura 46A). Já em relação à linha celular HuH7 (Figura 46B), embora não existam diferenças com significado estatístico, comparativamente ao controlo, é notória a tendência para um aumento da razão BAX/BCL-2 quando as células foram incubadas com 15 μM de gossipol.

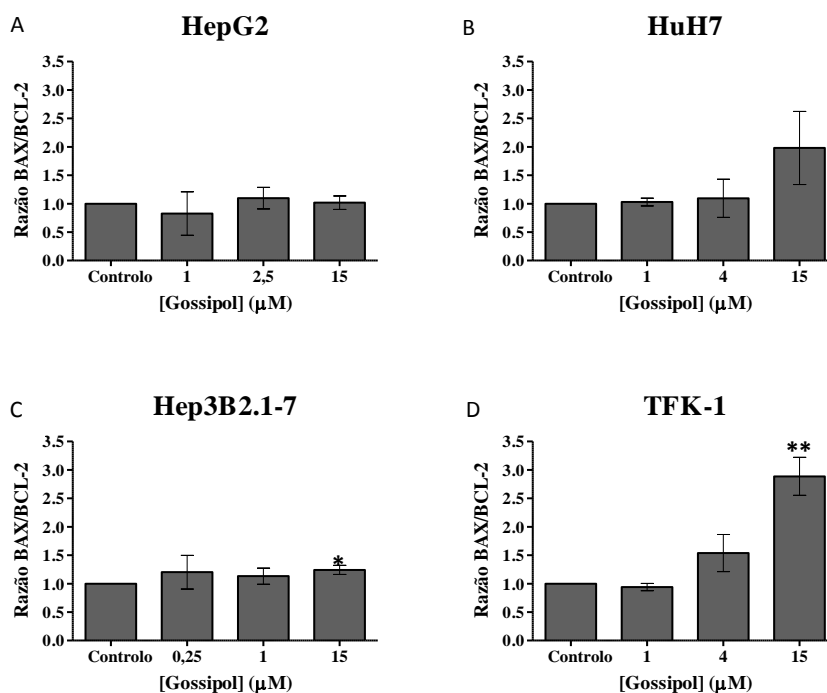


Figura 46: Análise da razão entre a expressão de BAX e a expressão de BCL-2 em resposta ao tratamento com gossipol nas linhas celulares HepG2 (A), HuH7 (B), Hep3B2.1-7 (C) e TFK-1 (D). Os resultados apresentados são expressos em razão BAX/BCL-2 para cada uma das condições em estudo. Os resultados exprimem a média e o desvio padrão de três experiências independentes. As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo estão assinaladas com *. A utilização de * representa $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

Observando a Figura 46C consegue-se verificar que, com o aumento da concentração de gossipol com que a linha celular Hep3B2.1-7 foi tratada, há uma tendência para o aumento da razão BAX/BCL-2, com diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os resultados obtidos no controlo e nas células incubadas com 15 μM de gossipol. De modo semelhante, ao incubar as células TFK-1 com gossipol verificou-se um aumento gradual na razão BAX/BCL-2 com significância estatística ($p < 0,01$) entre os resultados obtidos para o controlo e para a concentração de 15 μM (Figura 46D).

Avaliação do ciclo celular

A quantidade de fluorescência emitida pelas células marcadas com iodeto de propídeo permite conhecer a distribuição de uma população celular pelas diferentes fases do ciclo celular. Neste sentido, as Figuras 47 e 48 representam as populações em cada uma das fases do ciclo celular para todas as linhas celulares

em estudo quando incubadas com quercetina ou gossipol, respectivamente.

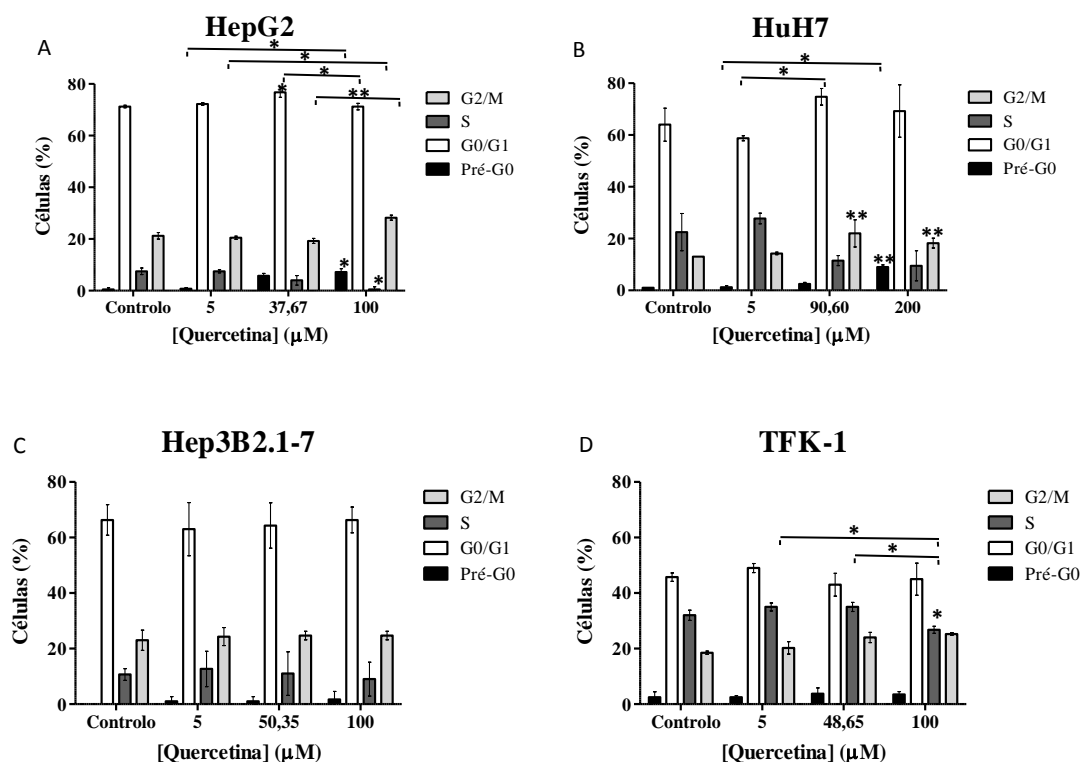


Figura 47: Avaliação das populações celulares em cada uma das fases do ciclo celular para as linhas celulares HepG2 (A), HuH7 (B), Hep3B2.1-7 (C) e TFK-1 (D) quando incubadas com as diferentes concentrações de quercetina testadas. Na figura estão representadas as populações em fase pré-G0, G0/G1, S e G2/M. Para cada condição, os resultados são expressos em percentagem de células. Os resultados exprimem a média e o desvio padrão de quatro experiências independentes. As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo estão assinaladas com *. A utilização de * representa $p < 0,05$ e ** representa $p < 0,01$.

A Figura 47A representa os resultados obtidos através da análise do ciclo celular das células HepG2, após incubação com as diferentes concentrações de quercetina. Observando estes resultados é importante referir o aparecimento do pico pré-G0, ou pico apoptótico para as maiores concentrações de quercetina testadas, apresentando diferenças com significado estatístico entre as células controlo e as células incubadas com 100 μM de quercetina ($p < 0,05$) e entre as células incubadas com 5 μM de quercetina e com 100 μM deste composto ($p < 0,05$). É de referir também que se observaram aumentos com diferenças estatisticamente significativas na população celular na fase G0/G1 entre a condição controlo e as células incubadas com a concentração de quercetina correspondente ao IC₅₀ ($p < 0,05$), bem como entre esta condição e a maior concentração de quercetina utilizada ($p < 0,05$), o que sugere um bloqueio nesta fase do ciclo celular. À medida

que se aumentou a concentração de quercetina observou-se também uma diminuição da população em fase S, verificando-se diferenças estatisticamente significativas entre a condição controlo e a concentração com 100 μM ($p < 0,05$) e entre os 5 μM e os 100 μM ($p < 0,05$). Ocorreu também um pequeno aumento da população na fase G2/M, apenas com diferenças estatisticamente significativas entre as células incubadas com 37,67 μM e com 100 μM de quercetina ($p < 0,01$).

Já para a linha celular HuH7 (Figura 47B) observou-se, de modo semelhante ao que ocorreu com as células HepG2, o aparecimento do pico apoptótico para as maiores concentrações de quercetina utilizadas, existindo diferenças com significância estatística entre as populações na fase pré-G0 da condição controlo e das células incubadas com 200 μM de quercetina ($p < 0,01$) assim como entre as células incubadas com 5 μM e 200 μM deste composto ($p < 0,05$). Verificou-se também um ligeiro aumento da população celular na fase G0/G1 quando as células foram incubadas com 90,60 μM e com 200 μM de quercetina, ocorrendo diferenças com significado estatístico entre os resultados obtidos para as concentrações de 5 μM e de 90,60 μM ($p < 0,05$). Observou-se também uma tendência para a diminuição da população em fase S. Paralelamente, ocorreu um aumento da população celular na fase G2/M, observando-se diferenças estatisticamente significativas entre as populações celulares nesta fase no controlo e na concentração correspondente ao IC_{50} ($p < 0,01$) e entre o controlo e a maior concentração de quercetina utilizada ($p < 0,05$).

No que diz respeito à linha celular Hep3B2.1-7 (Figura 47C), em resposta ao tratamento com quercetina apenas se observou uma tendência para a diminuição da população em fase S com o aumento da concentração do composto, acompanhado por uma tendência de aparecimento do pico pré-G0.

Em relação à linha celular TFK-1 (Figura 47D), com o aumento da concentração de composto, observou-se uma diminuição da população celular em fase S, ocorrendo diferenças com significado estatístico entre as populações celulares nesta fase com as células incubadas com 5 μM e com 100 μM ($p < 0,05$) de quercetina, e entre as condições com 48,65 μM e com 100 μM ($p < 0,05$). De referir também o aumento gradual da população na fase G2/M com o aumento da concentração de quercetina, ocorrendo diferenças estatisticamente significativas entre o controlo e a maior concentração de quercetina utilizada ($p < 0,05$).

Por sua vez, de acordo com a Figura 48A verifica-se que em resposta ao tratamento com gossipol, para a linha celular HepG2, existe a tendência para a diminuição da população celular na fase G0/G1, acompanhada por uma tendência de aumento da população celular na fase S. Observou-se também o aparecimento

do pico pré-G0, com diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre as células no pico pré-G0 no controlo e na condição de concentração de $15 \mu\text{M}$.

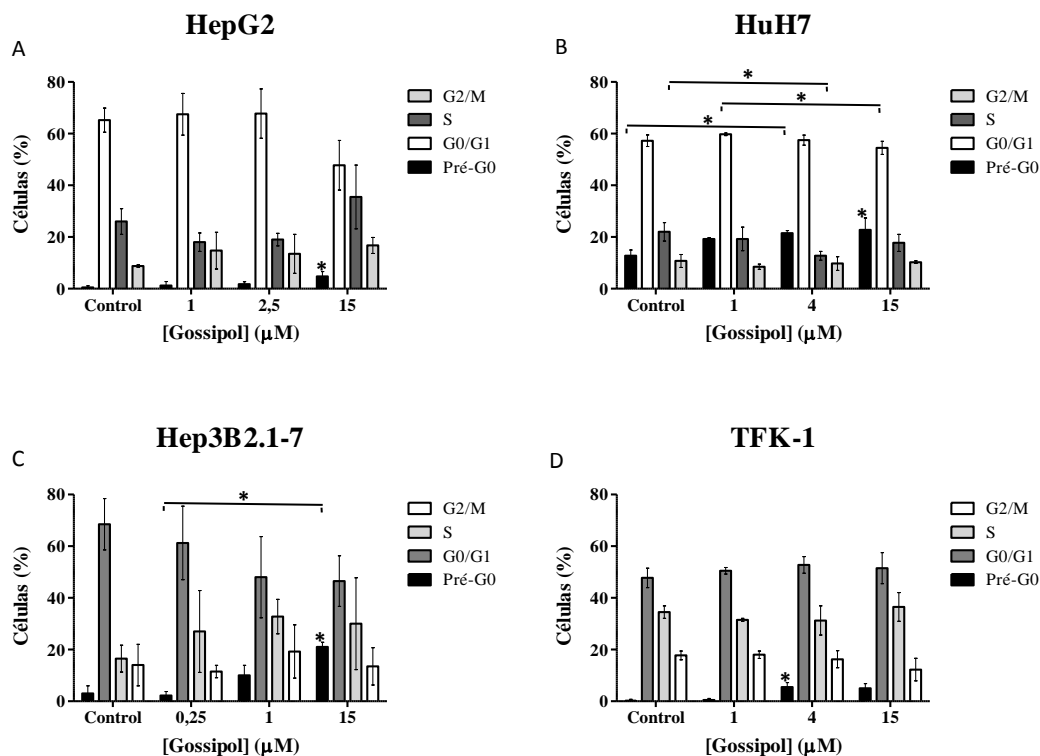


Figura 48: Avaliação das populações celulares em cada uma das fases do ciclo celular para as linhas celulares HepG2 (A), HuH7 (B), Hep3B2.1-7 (C) e TFK-1 (D) para as diferentes concentrações de gossipol testadas. Na figura estão representadas as populações em fase pré-G0, G0/G1, S e G2/M. Para cada condição, os resultados são expressos em percentagem de células. Os resultados exprimem a média e o desvio padrão de quatro experiências independentes. As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo estão assinaladas com *. A utilização de * representa $p < 0,05$ e ** representa $p < 0,01$.

Já no caso da linha celular HuH7 (Figura 48B), a incubação com gossipol também induziu o aparecimento do pico apoptótico com diferenças estatisticamente significativas entre o controlo e a concentração de $4 \mu\text{M}$ ($p < 0,05$), e entre a condição controlo e os $15 \mu\text{M}$ ($p < 0,05$). Ocorreu também uma diminuição das células em fase S, com significância estatística ($p < 0,05$) entre o controlo e as células incubadas com $4 \mu\text{M}$ de composto, assim como uma diminuição da população em G0/G1 entre as células tratadas com $1 \mu\text{M}$ e com $15 \mu\text{M}$ de gossipol ($p < 0,05$).

À semelhança do que ocorreu para as outras duas linhas celulares de carcinoma hepatocelular, também no caso da linha celular Hep3B2.1-7 (Figura 48C) se destacou o aparecimento do pico pré-G0 à medida que se aumentou a concentração de gossipol, ocorrendo significado estatístico entre as populações

celulares no pico pré-G0 das células controlo e das células incubadas com 15 μM deste composto ($p < 0,05$), e entre as células incubadas com 0,25 μM e com 15 μM de gossipol ($p < 0,05$). De destacar também a tendência para o aumento da população celular na fase S com o aumento da concentração de gossipol, acompanhada de uma tendência de diminuição da população celular na fase G0/G1.

Relativamente à linha celular de colangiocarcinoma (Figura 48D), à medida que se aumentou a concentração de gossipol observou-se o aparecimento do pico pré-G0, ocorrendo diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre as populações celulares em pré-G0 no controlo e com as células incubadas com 4 μM de gossipol. Verificou-se também uma tendência para a diminuição da população celular na fase G2/M à medida que se aumentou a concentração de gossipol.

Stresse oxidativo

A produção intracelular de ROS foi avaliada através da determinação dos níveis intracelulares de peróxidos e de anião superóxido, sendo avaliada também a produção de defesas antioxidantes pela análise da expressão intracelular de glutathiona livre (GSH).

A Figura 49 representa os níveis médios de produção intracelular de peróxidos em resposta ao tratamento com quercetina para as diversas linhas celulares em estudo. Os resultados apresentados foram normalizados em relação à condição controlo.

Através da observação dos gráficos da Figura 49 constata-se que o tratamento com quercetina induziu alterações a nível da produção intracelular de peróxidos.

Para as linhas celulares HepG2 (Figura 49A), HuH7 (Figura 49B) e Hep3B2.1-7 (Figura 49C) verificou-se que a produção intracelular de peróxidos aumentou gradualmente à medida que se aumentou a concentração de quercetina utilizada até ao valor correspondente ao IC_{50} . Observam-se diferenças com significado estatístico ($p < 0,05$), no caso da linha celular HepG2 entre o controlo e as células incubadas com 37,67 μM de quercetina. Porém, ao aumentar a concentração de composto ocorreu uma diminuição dos valores intracelulares de peróxidos entre o valor correspondente ao IC_{50} e a maior concentração de quercetina utilizada, observando-se diferenças com significado estatístico no caso

das células HuH7 ($p < 0,05$).

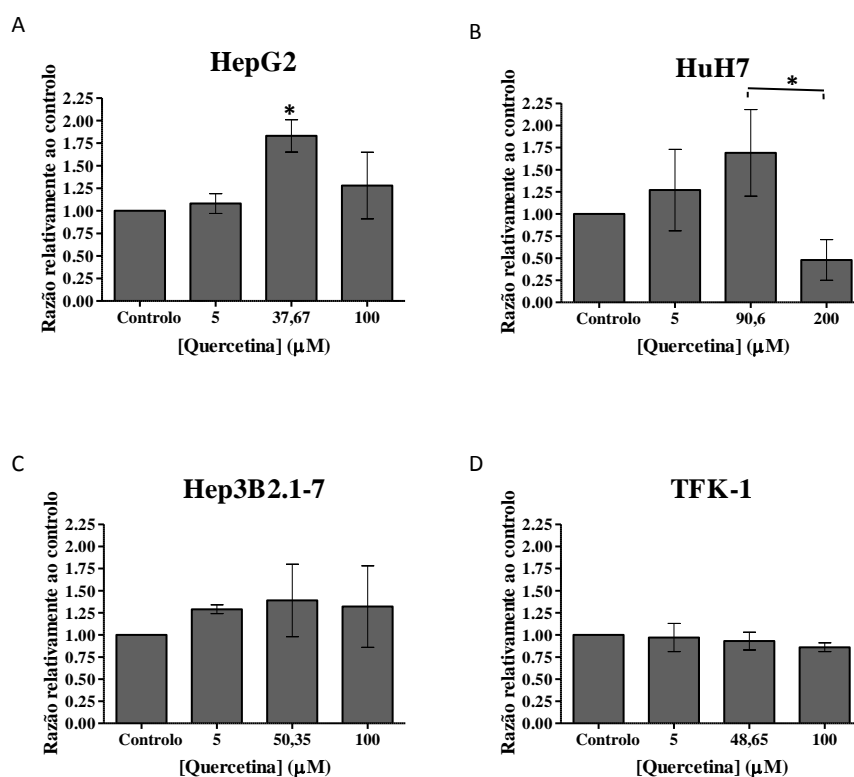


Figura 49: Avaliação da produção intracelular de peróxidos pelas linhas celulares HepG2 (A), HuH7 (B), Hep3B2.1-7 (C) e TFK-1 (D) em resposta às diferentes concentrações de quercetina testadas. Para cada condição, os resultados foram normalizados em relação ao controlo e exprimem a média e o desvio padrão de quatro experiências independentes. As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo estão assinaladas com * que representa $p < 0,05$.

Relativamente à linha celular de colangiocarcinoma (Figura 49D), embora não se verifiquem diferenças com significância estatística, constatou-se que à medida que se aumentou a concentração de quercetina se observou uma tendência para uma ligeira diminuição da produção intracelular de peróxidos relativamente ao controlo.

A Figura 50 representa as alterações induzidas pelo tratamento com gossipol a nível da produção intracelular de peróxidos para as várias linhas celulares em estudo.

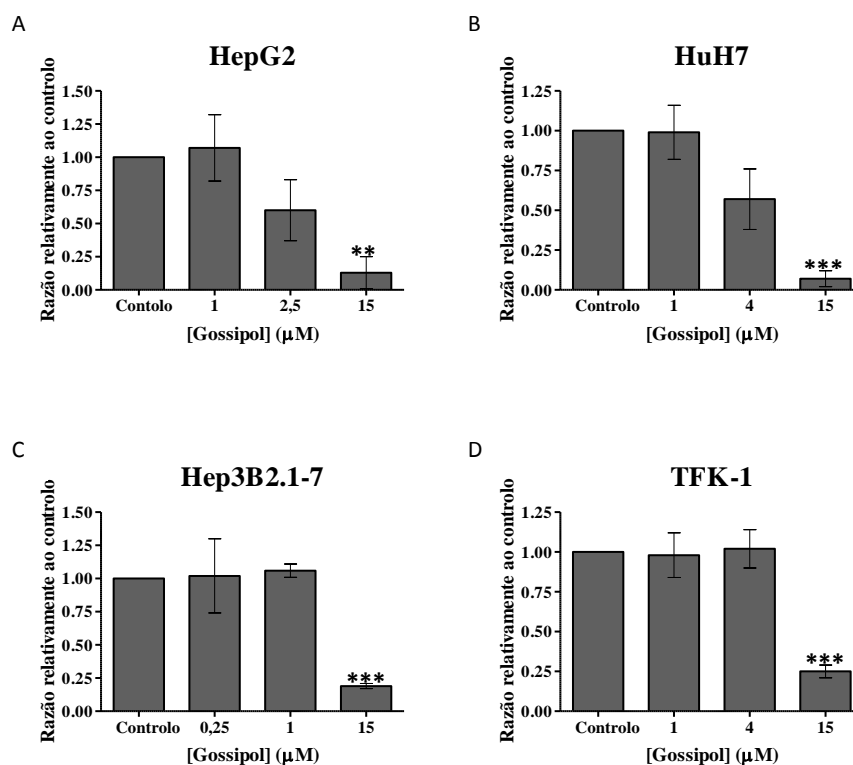


Figura 50: Avaliação da produção de peróxidos pelas linhas celulares HepG2 (A), HuH7 (B), Hep3B2.1-7 (C) e TFK-1 (D) em resposta às diferentes concentrações de gossipol testadas. Para cada condição, os resultados foram normalizados em relação ao controlo e exprimem a média e o desvio padrão de quatro experiências independentes. As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo estão assinaladas com *. A utilização de ** representa $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

No que diz respeito às linhas celulares HepG2 (Figura 50A) e HuH7 (Figura 50B) verifica-se que a menor concentração de gossipol utilizada não induziu alterações a nível da produção intracelular de peróxidos. No entanto, com o aumento gradual da concentração de composto a produção de peróxidos diminuiu, com diferenças estatisticamente significativas entre a condição controlo e as células incubadas com 15 µM de gossipol, tanto para a linha celular HepG2 ($p < 0,01$) como para a linha celular HuH7 ($p < 0,001$).

Relativamente às linhas celulares Hep3B2.1-7 (Figura 50C) e TFK-1 (Figura 50D) o tratamento com a concentração de gossipol equivalente ao IC_{50} e com a concentração inferior a esta não induziu alterações na produção de peróxidos intracelulares. Apesar disso, ao aumentar a concentração de gossipol para 15 µM ocorreu, para ambas as linhas celulares, uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,001$) da produção de peróxidos, comparativamente ao controlo.

Os resultados obtidos para a produção de anião superóxido em resposta aos tratamentos com quercetina e gossipol estão representados, respectivamente nas

Figuras 51 e 52. Os resultados obtidos foram normalizados em relação aos resultados obtidos para a condição controlo.

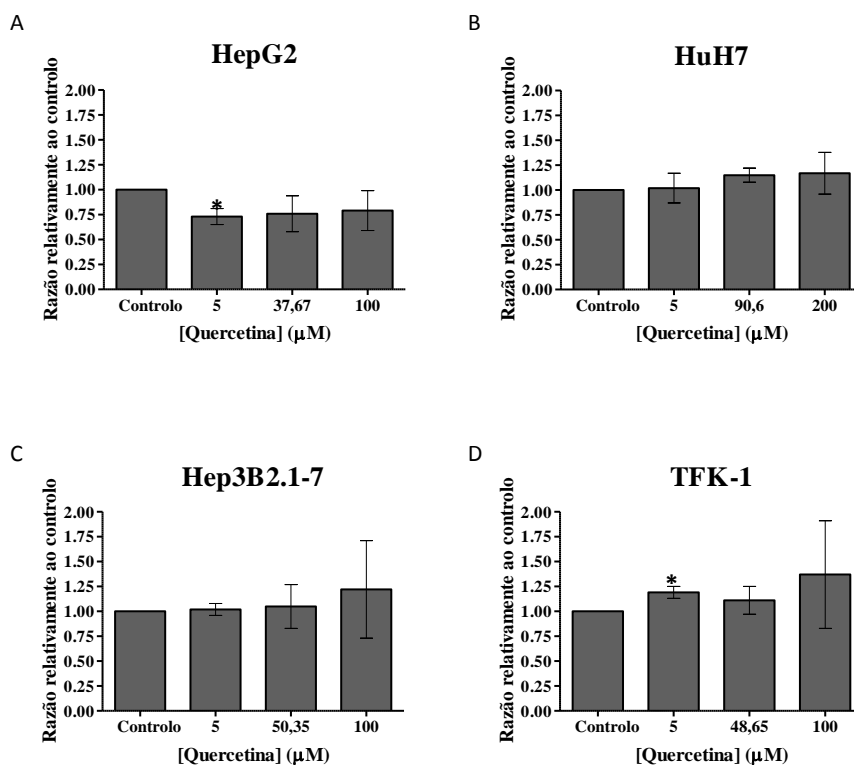


Figura 51: Avaliação da produção intracelular de anião superóxido pelas linhas celulares HepG2 (A), HuH7 (B), Hep3B2.1-7 (C) e TFK-1 (D) em resposta às diferentes concentrações de quercetina testadas. Para cada condição, os resultados foram normalizados em relação ao controlo e exprimem a média e o desvio padrão de quatro experiências independentes. As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo estão assinaladas com * que representa $p < 0,05$.

Os resultados obtidos através do tratamento com quercetina (Figura 51) permitem-nos observar uma tendência para o aumento da produção intracelular de anião superóxido em resposta ao tratamento com o referido composto, sendo a linha celular HepG2 a única excepção a estes resultados. Nesta linha celular observou-se uma diminuição da produção intracelular de anião superóxido relativamente ao controlo, diminuição que se manteve constante à medida que se aumentou a concentração de quercetina utilizada (Figura 51A).

De referir ainda que ocorrem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) nas linhas celulares HepG2 e TFK-1 entre o controlo e a menor concentração de quercetina testada, sendo que, curiosamente a produção desta espécie reactiva de oxigénio diminuiu quando a linha celular HepG2 foi incubada com 5 μM de quercetina e aumentou no caso da linha celular TFK-1 para a mesma condição (Figuras 51A e 51D).

Os resultados obtidos através da análise da produção intracelular de anião superóxido em resposta ao tratamento com gossipol estão representados na Figura 52.

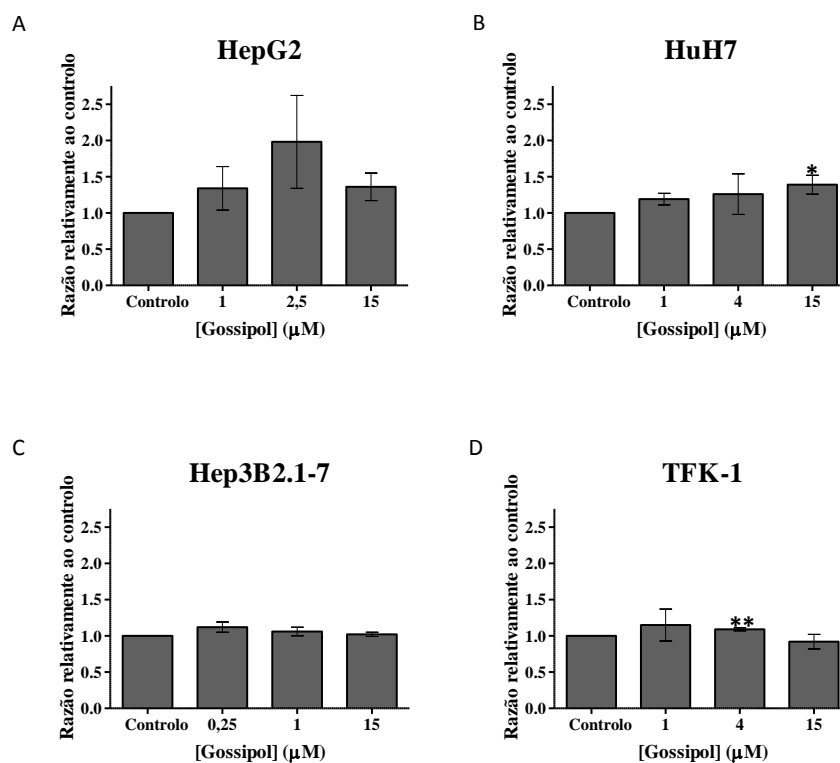


Figura 52: Avaliação da produção intracelular de anião superóxido pelas linhas celulares HepG2 (A), HuH7 (B), Hep3B2.1-7 (C) e TFK-1 (D) em resposta às diferentes concentrações de gossipol testadas. Para cada condição, os resultados foram normalizados em relação ao controlo e exprimem a média e o desvio padrão de quatro experiências independentes. As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo estão assinaladas com *. A utilização de * representa $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

Observando a Figura 52A verifica-se que quando as células HepG2 foram incubadas com as duas primeiras concentrações deste composto ocorreu uma tendência para o aumento gradual da produção de anião superóxido, com posterior diminuição com a maior concentração de gossipol utilizada.

Já para as células HuH7 (Figura 52B) constata-se que à medida que aumentou a concentração de gossipol aumentou a produção de anião superóxido, observando-se diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os resultados obtidos nas células na condição controlo e naquelas que foram incubadas com 15 µM de gossipol.

Relativamente à linha celular Hep3B2.1-7 (Figura 52C) o tratamento com gossipol não induziu diferenças a nível da produção intracelular de anião superóxido.

Por fim, para a linha celular TFK-1 (Figura 52D) é de destacar um aumento da produção desta espécie reactiva para as duas primeiras concentrações de gossipol utilizadas, com posterior redução para a concentração superior ao IC₅₀. Observaram-se diferenças com significado estatístico ($p < 0,01$) entre os valores obtidos para o controlo e para as células incubadas com 4 μM deste composto.

A Figura 53 representa os resultados relativos à expressão de glutathiona livre em resposta ao tratamento com quercetina nas diversas linhas celulares em estudo. Os resultados obtidos foram normalizados relativamente à condição controlo.

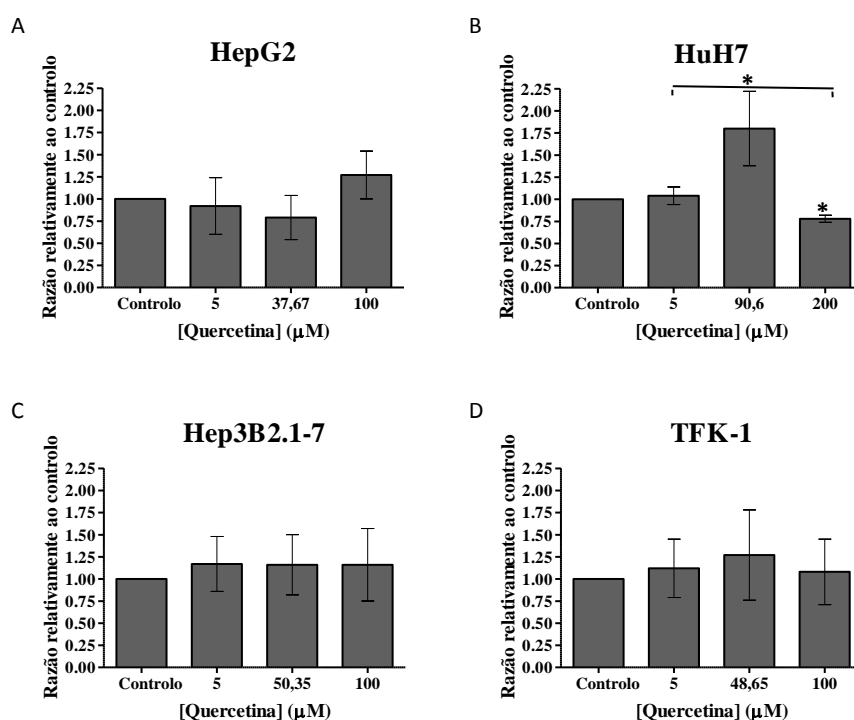


Figura 53: Avaliação da concentração intracelular de GSH livre recorrendo à marcação com o alaranjado de mercúrio nas linhas celulares HepG2 (A), HuH7 (B), Hep3B2.1-7 (C) e TFK-1 (D) em resposta às diferentes concentrações de quercetina testadas. Para cada condição, os resultados foram normalizados em relação ao controlo e exprimem a média e o desvio padrão de quatro experiências independentes. As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo estão assinaladas com * que representa $p < 0,05$.

De uma forma geral, a expressão de glutathiona teve tendência a aumentar em resposta ao tratamento com quercetina.

De acordo com a Figura 53A, para a linha celular HepG2 apenas se verificou um aumento da expressão de GSH para a maior concentração de quercetina utilizada, ocorrendo uma ligeira diminuição para as concentrações inferiores a este

valor.

Já relativamente às linhas celulares HuH7 (Figura 53B) e TFK-1 (Figura 53D) é possível observar um aumento da expressão de GSH para as duas menores concentrações de quercetina utilizadas, seguindo-se uma diminuição desta para a concentração superior ao IC₅₀. Estas alterações são mais evidentes no caso da linha celular HuH7, observando-se diferenças com significado estatístico entre o controlo e com a concentração de 200 µM ($p < 0,05$) e entre a concentração com 5 µM e com 200 µM ($p < 0,05$).

Para a linha celular Hep3B2.1-7 (Figura 53C) verifica-se uma tendência para um aumento na expressão de glutatona logo para a menor concentração de quercetina testada, aumento esse que se mantém sensivelmente constante para as outras concentrações utilizadas.

A Figura 54 esquematiza os resultados obtidos em relação à produção de GSH em resposta à incubação com gossipol para todas as linhas celulares em estudo e todas as condições testadas.

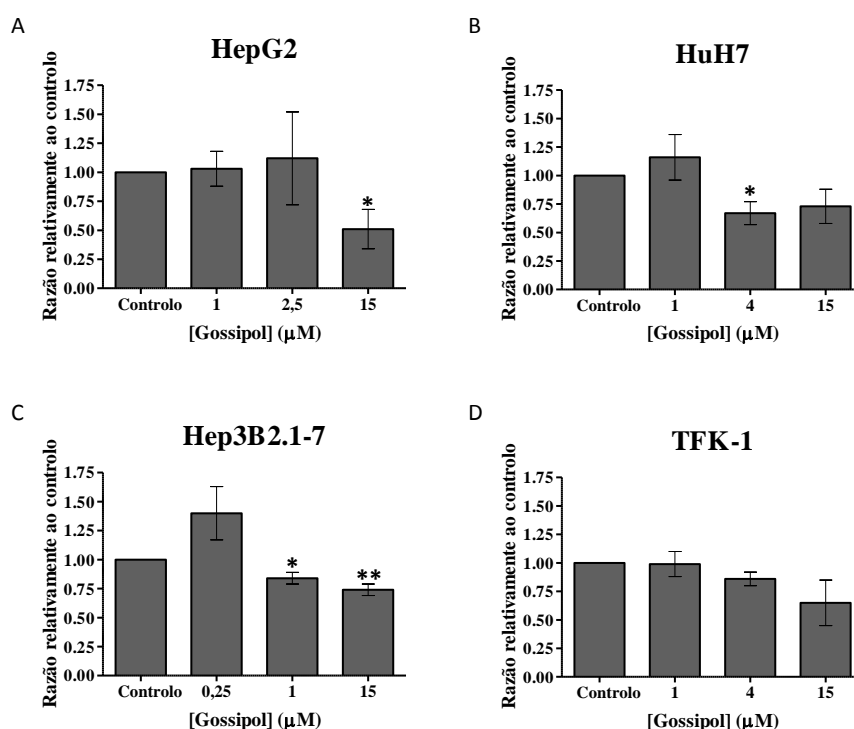


Figura 54: Avaliação da concentração intracelular de GSH livre recorrendo à marcação com o alaranjado de mercúrio nas linhas celulares HepG2 (A), HuH7 (B), Hep3B2.1-7 (C) e TFK-1 (D) em resposta às diferentes concentrações de gossipol testadas. Para cada condição, os resultados foram normalizados em relação ao controlo e exprimem a média e o desvio padrão de quatro experiências independentes. As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo estão assinaladas com *. A utilização de * representa $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

Observando a Figura 54A verifica-se que, para a linha celular HepG2, em resposta ao tratamento com as duas menores concentrações de gossipol não ocorreram diferenças a nível da expressão de GSH. No entanto, para a maior concentração testada observou-se, comparativamente ao controlo, uma diminuição na expressão de glutathiona, com significado estatístico ($p < 0,05$).

Os resultados obtidos com a linha celular HuH7 (figura 54B) demonstram uma tendência para um aumento da expressão de GSH em resposta ao tratamento com apenas 1 μM de gossipol, seguida de diminuição para as duas concentrações superiores a este valor. Existem diferenças com significância estatística ($p < 0,05$) entre os resultados obtidos para as condições controlo e para a concentração de 4 μM .

À semelhança do que ocorreu para a linha celular HuH7, também no caso da linha celular Hep3B2.1-7 (Figura 54C) se verifica uma tendência para o aumento da produção de glutathiona após incubação com a menor concentração de gossipol utilizada, com posterior diminuição para as concentrações correspondente e superior ao IC_{50} . Entre os resultados obtidos para o controlo e para a condição de 1 μM de gossipol, assim como entre o controlo e a concentração de 15 μM existem diferenças com significado estatístico com $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente.

Por fim, no que diz respeito aos resultados obtidos para a linha celular TFK-1 (Figura 54D), embora não se observem diferenças estatisticamente significativas, é possível verificar que ocorreu uma tendência para uma diminuição gradual na expressão de GSH à medida que se aumentou a concentração de gossipol.

Expressão de P53

Através da técnica de western blot avaliou-se a expressão de P53 em todas as linhas celulares em estudo em condições basais. A Figura 55 mostra os resultados obtidos a partir dessa análise.

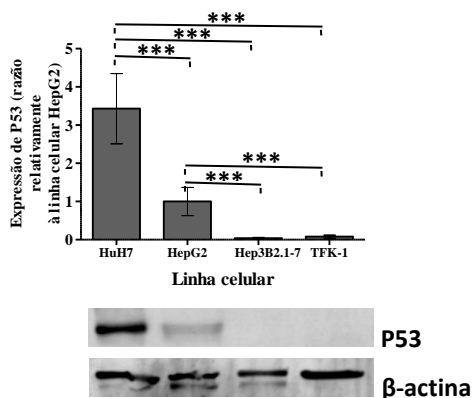


Figura 55: Expressão da proteína P53 em relação à actina nas linhas celulares HuH7, HepG2, Hep3B2.1-7 e TFK-1. Os resultados expressam a média e o desvio padrão de pelo menos quatro experiências independentes. As diferenças significativas em relação ao controlo estão assinaladas com *** que corresponde a $p < 0,001$.

Através da análise da Figura 55 constata-se que as linhas celulares Hep3B2.1-7 e TFK-1 não expressam P53. Por outro lado, comparativamente à linha celular HepG2, as células da linha HuH7 expressam sensivelmente 4 vezes mais P53. Estes resultados estão em concordância com aqueles que foram obtidos através da análise imunohistoquímica e que foram apresentados anteriormente.

As Figuras 56 e 57 mostram a análise da expressão de P53 em resposta aos tratamentos com quercetina e gossipol, respectivamente. Essa análise apenas foi efectuada para as linhas celulares HepG2 e HuH7 uma vez que as outras duas linhas celulares em estudo não expressam esta proteína.

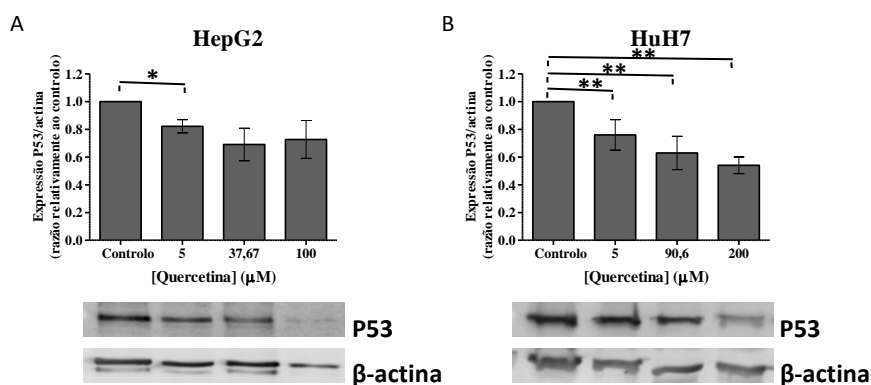


Figura 56: Expressão da proteína P53 nas linhas celulares HepG2 (A) e HuH7 (B) em resposta ao tratamento com quercetina. Os resultados expressam a alteração da expressão da P53 em relação à actina relativamente à condição controlo. O gráfico representa a média e o desvio padrão de pelo menos três experiências independentes. As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo estão representadas por * onde * representa $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

Através da análise da Figura 56 constata-se que a incubação com as diversas concentrações de quercetina testadas induziu um decréscimo na expressão de P53, tanto para a linha celular HepG2 (Figura 56A), como para a linha celular HuH7 (Figura 56B). Observam-se diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre a condição controlo e as células incubadas com $5 \mu\text{M}$ de quercetina, no caso da linha celular HepG2, e entre o controlo e todas as concentrações de quercetina testadas ($p < 0,01$) para a linha celular HuH7.

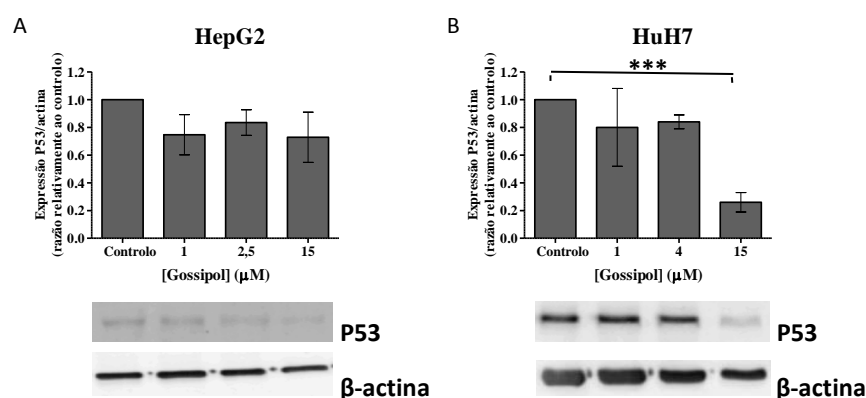


Figura 57: Expressão da proteína P53 nas linhas celulares HepG2 (A) e HuH7 (B) em resposta ao tratamento com gossipol. Os resultados expressam a alteração da expressão da P53 em relação à actina relativamente à condição controlo. O gráfico representa a média e o desvio padrão de pelo menos três experiências independentes. As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo estão representadas por *** que representa $p < 0,001$.

Pela Figura 57 podemos verificar que também a incubação com gossipol induz um decréscimo na expressão de P53 nas linhas celulares HepG2 e HuH7. De facto, ao incubar as células HepG2 (Figura 57A) com as diversas concentrações de gossipol, observou-se uma tendência para um decréscimo na expressão desta proteína. Por sua vez, para a linha celular HuH7, a incubação com $15 \mu\text{M}$ de gossipol conduziu a um decréscimo bastante acentuado na expressão desta proteína. Este resultado apresenta diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,001$) relativamente à condição controlo.

Danos no ADN

De modo a avaliar se o gossipol e a quercetina possuem efeitos nocivos a nível do ADN nas linhas celulares em estudo, efectuou-se o ensaio cometa. A

análise das imagens obtidas foi efectuada de forma qualitativa, pela análise visual das imagens, e de forma quantitativa através de três parâmetros: o momento da cauda do cometa (MC), a percentagem de ADN na cauda (% ADN) e o comprimento da cauda (CC) do cometa. Tendo em conta que o momento da cauda representa o produto entre a % ADN e o CC, dar-se-á maior ênfase àquele parâmetro, visto que permite analisar os resultados em termos da extensão de dano (pelo CC) e da quantidade de dano (pela % ADN) (Kent *et al.*, 1995).

As Figuras 58, 60, 61 e 62 representam as imagens dos cometas obtidas, respectivamente, para as linhas celulares HepG2, HuH7, Hep3B2.1-7 e TFK-1 para as duas concentrações de quercetina a que as células foram sujeitas, assim como os respectivos controlos, o controlo negativo e o controlo positivo.

Através da análise qualitativa da Figura 58 é possível verificar que a linha celular HepG2 é susceptível a danos a nível do ADN quando sujeita ao tratamento com quercetina. Observa-se um aumento do tamanho da cauda dos cometas com as maiores concentrações de quercetina, ou seja, o aumento da concentração deste composto favoreceu uma maior extensão de danos no ADN.

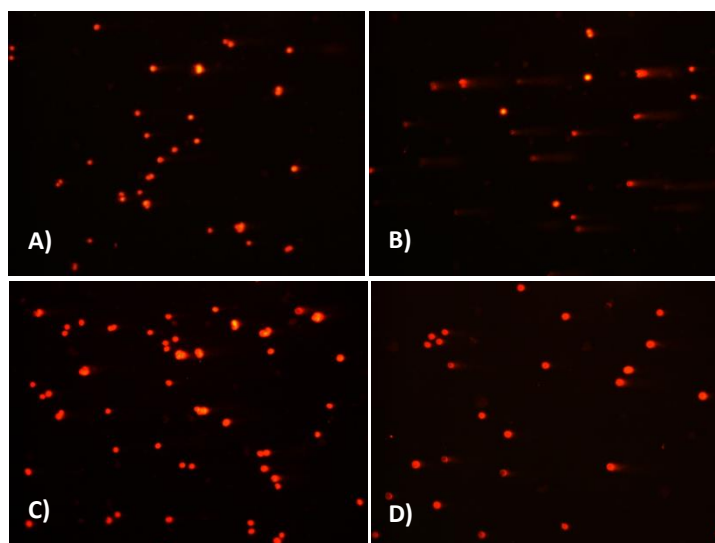


Figura 58: Imagens dos cometas da linha celular HepG2, obtidas para cada condição a que as células foram sujeitas: (A) controlo negativo, células não sujeitas a tratamento (B) controlo positivo, células sujeitas a 20 nM de peróxido de hidrogénio, (C) células incubadas com 38 µM de quercetina durante 48 horas, (D) células incubadas com 100 µM de quercetina durante 48 horas.

Os gráficos da Figura 59 representam as diferenças a nível da % de ADN na cauda, comprimento da cauda e momento da cauda dos cometas obtidas para cada uma das condições testadas. Pode-se verificar que, o aumento da concentração de

quercetina provoca o aumento de cada um dos parâmetros, ou seja, parece haver uma tendência para o aumento dos danos no ADN desta linha celular com a presença de concentrações crescentes de quercetina. Observam-se diferenças com significado estatístico ($p < 0,001$) para todos os parâmetros analisados entre a condição controlo negativo e as outras condições analisadas, exceptuando entre o controlo negativo e as células incubadas com $37,67 \mu\text{M}$ de quercetina no que diz respeito à % de ADN na cauda.

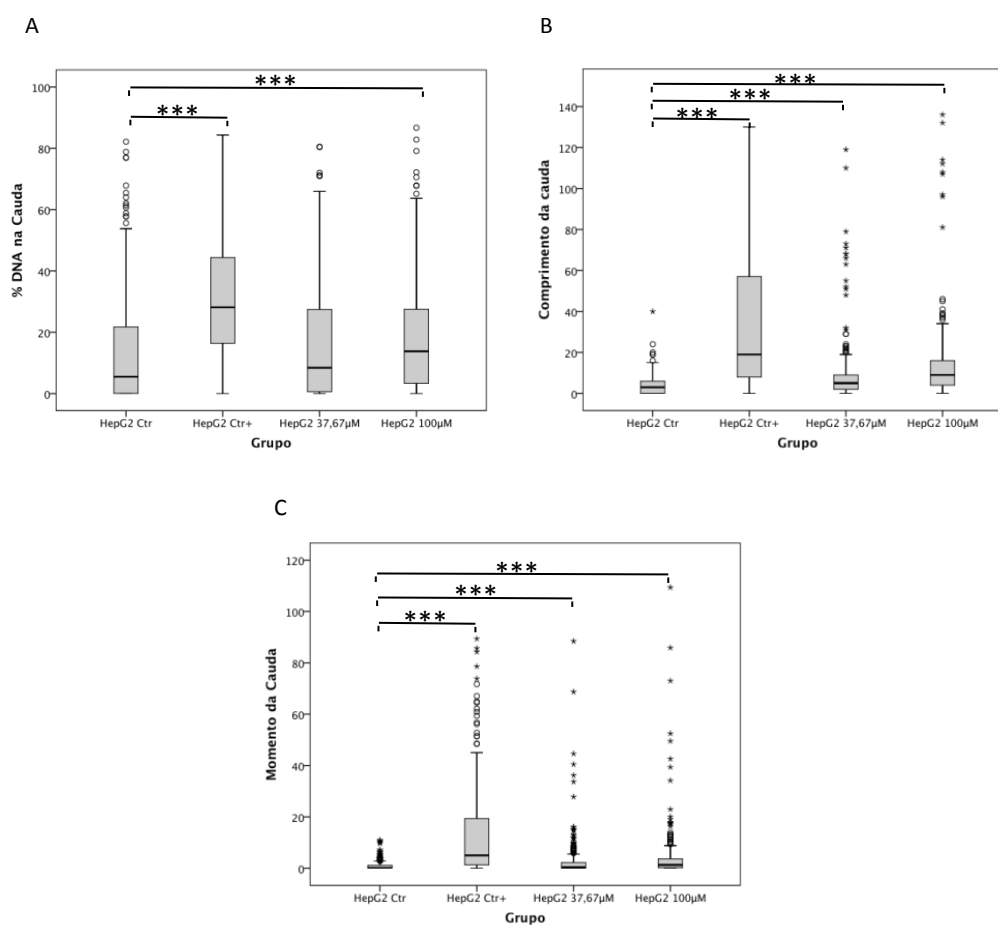


Figura 59: % de ADN na cauda (A), comprimento da cauda (B) e momento de cauda (C), obtido para a linha celular HepG2 para cada condição. Nos gráficos estão representados os valores obtidos para as condições controlo negativo, em que não houve qualquer tratamento das células e controlo positivo e as condições em que houve administração de $37,67 \mu\text{M}$ e de $100 \mu\text{M}$ de quercetina. Os valores discrepantes encontram-se assinalados com \circ e $*$. Os resultados representam a mediana e o desvio padrão de pelo menos 60 cometas adquiridos em três experiências independentes. As diferenças estatisticamente significativas estão representadas por $***$ que representa $p < 0,001$.

Observando a Figura 60 verifica-se, de modo qualitativo, que a quercetina não induz danos a nível do ADN na linha celular HuH7. Assim, após a incubação com as duas concentrações de quercetina testadas não se observou um aumento da cauda do cometa.

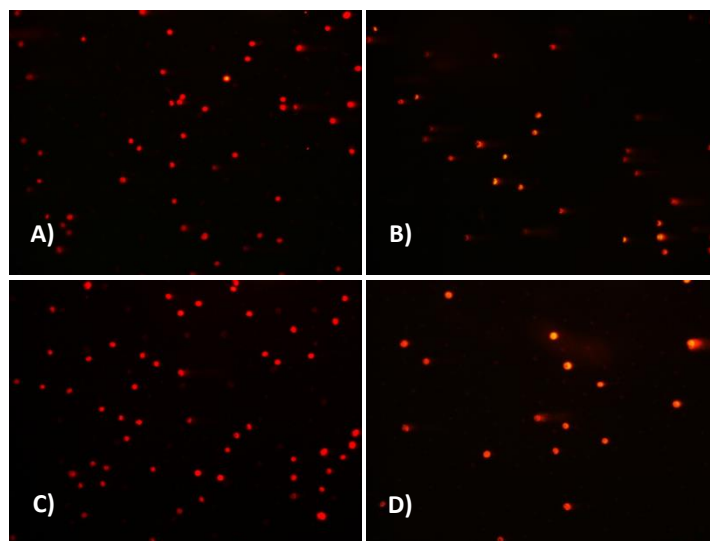


Figura 60: Imagens dos cometas da linha celular HuH7, obtidas para cada condição a que as células foram sujeitas: (A) controlo negativo, células não sujeitas a tratamento (B) controlo positivo, células sujeitas a 20 nM de peróxido de hidrogénio, (C) células incubadas com 91 μ M de quercetina durante 48 horas, (D) células incubadas com 200 μ M de quercetina durante 48 horas.

Em concordância, os gráficos da Figura 61 demonstram que, após o tratamento da linha celular HuH7 com quercetina, não se observaram diferenças a nível da % de ADN na cauda, do comprimento da cauda e do momento da cauda dos cometas obtidas para cada uma das condições testadas.

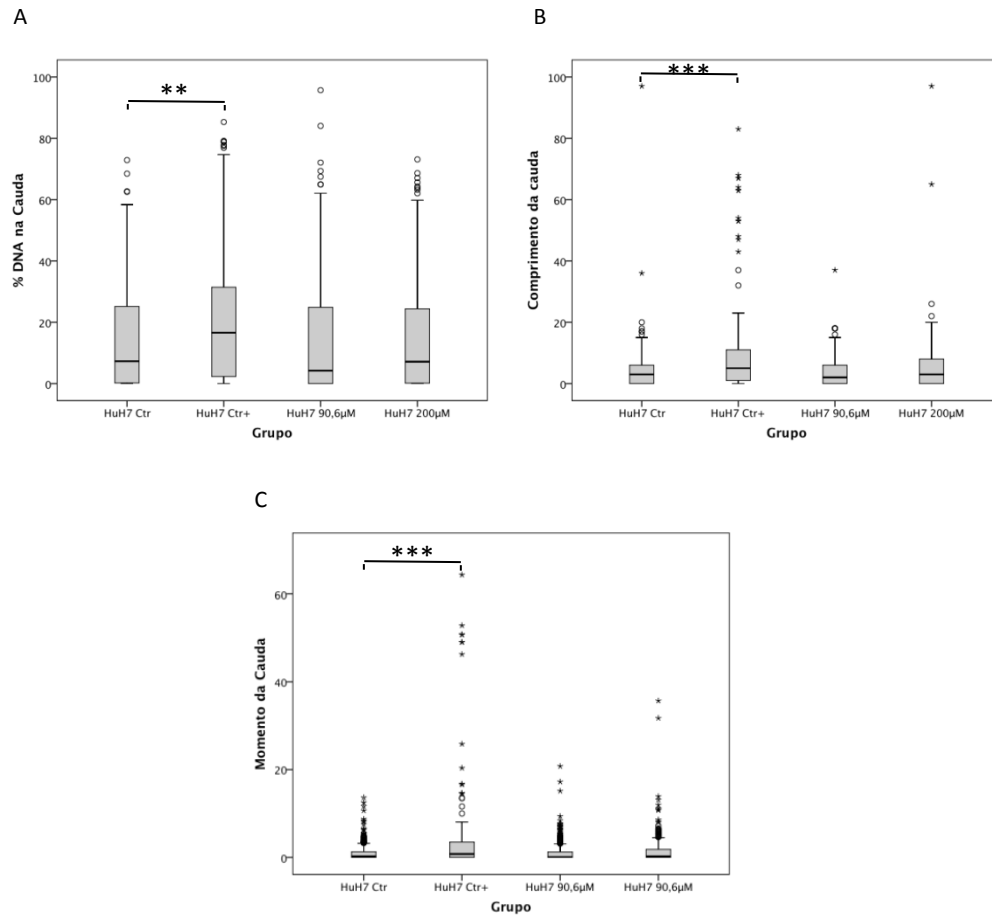


Figura 61: % de ADN na cauda (A), comprimento da cauda (B) e momento de cauda (C), obtido para a linha celular HuH7 para cada condição. Nos gráficos estão representados os valores obtidos para as condições controlo negativo, em que não houve qualquer tratamento das células e controlo positivo e as condições em que houve administração de 90,6μM e 200μM de quercetina. Os valores discrepantes encontram-se assinalados com ° e *. Os resultados representam a mediana e o desvio padrão de pelo menos 60 cometas adquiridos em três experiências independentes. As diferenças estatisticamente significativas estão representadas por ** que representa $p < 0,01$ e por *** que representa $p < 0,001$.

A análise da Figura 62 permite-nos aferir, qualitativamente que o tratamento com quercetina induz alguns danos, a nível do ADN, na linha celular Hep3B2.1-7.

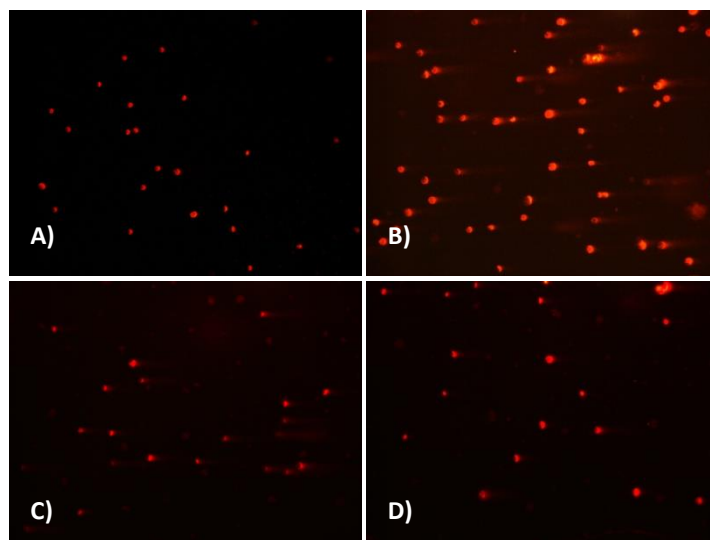


Figura 62: Imagens dos cometas da linha celular Hep3B2.1-7, obtidas para cada condição a que as células foram sujeitas: (A) controlo negativo, células não sujeitas a tratamento (B) controlo positivo, células sujeitas a 20 nM de peróxido de hidrogénio, (C) células incubadas com 50 µM de quercetina durante 48 horas, (D) células incubadas com 100 µM de quercetina durante 48 horas.

De facto, ao analisar os gráficos da Figura 63 constata-se que, embora a quercetina não introduza alterações a nível da % de ADN presente na cauda do cometa, as duas concentrações deste composto testadas induziram um aumento do comprimento da cauda do mesmo. Neste parâmetro observam-se assim diferenças estatisticamente significativas entre o controlo negativo e as células tratadas com 50,7 µM de quercetina ($p < 0,05$), e também entre o controlo negativo e as células incubadas com 100 µM deste composto ($p < 0,001$). Consequentemente, a maior concentração de quercetina testada induziu também diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,001$) no momento da cauda do cometa, comparativamente à condição controlo negativo.

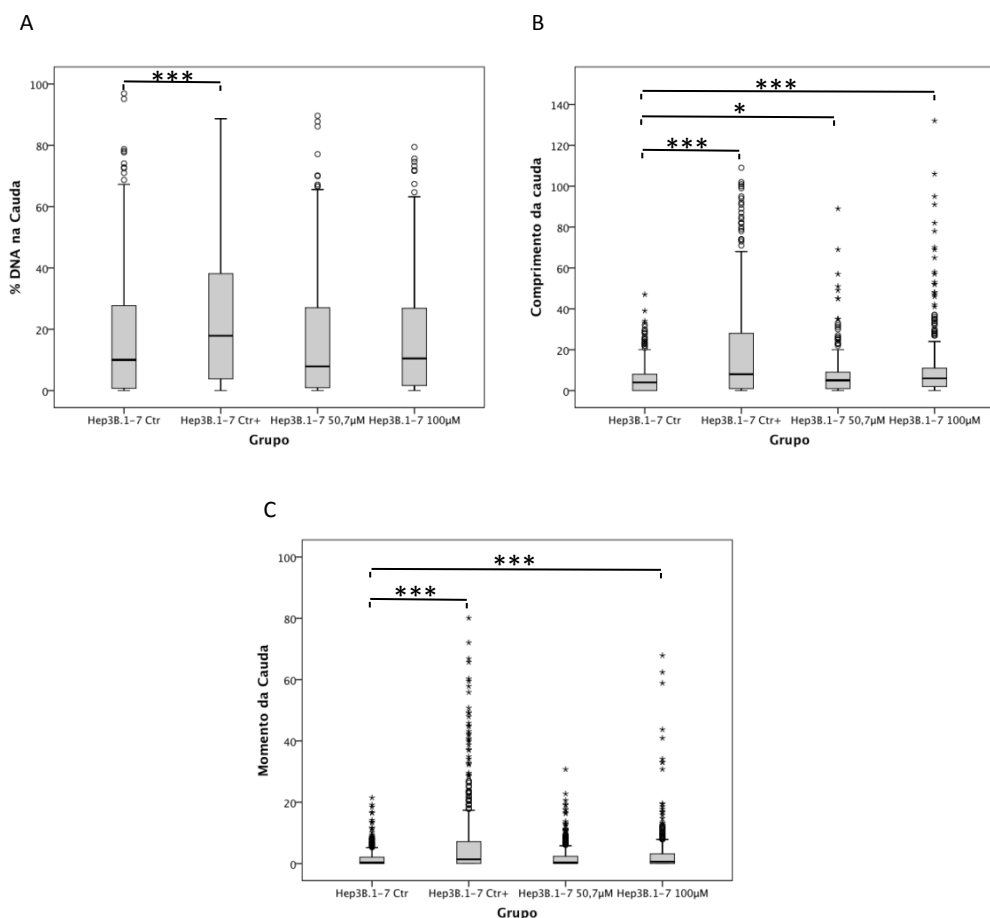


Figura 63: % de ADN na cauda (A), comprimento da cauda (B) e momento de cauda (C), obtido para a linha celular Hep3B2.1-7 para cada condição. Nos gráficos estão representados os valores obtidos para as condições controlo negativo, em que não houve qualquer tratamento das células e controlo positivo e as condições em que houve administração de 50,7 μM e 100 μM de quercetina. Os valores discrepantes encontram-se assinalados com \circ e $*$. Os resultados representam a mediana e o desvio padrão de pelo menos 60 cometas adquiridos em três experiências independentes. As diferenças estatisticamente significativas estão representadas por $*$ que representa $p < 0,05$ e por $***$ que representa $p < 0,001$.

Analisando a Figura 64, qualitativamente, constata-se que a incubação com quercetina induziu danos no ADN da linha celular TFK-1, uma vez que se observa o aparecimento da cauda do cometa.

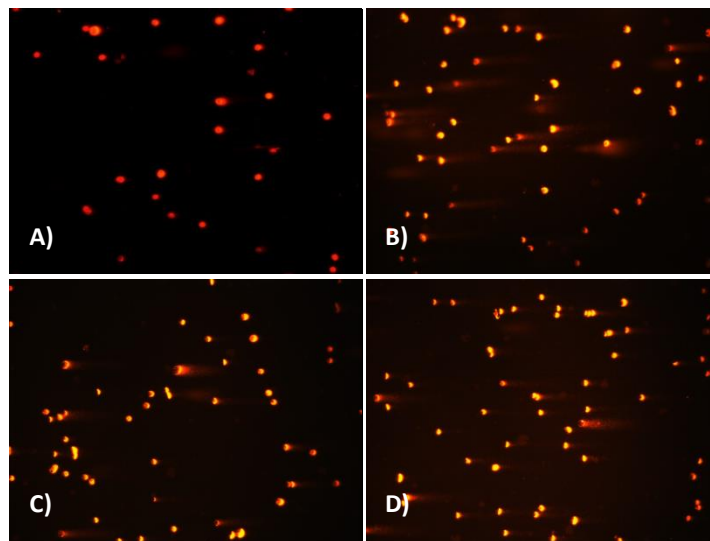


Figura 64: Imagens dos cometas da linha celular TFK-1, obtidas para cada condição a que as células foram sujeitas: (A) controlo negativo, células não sujeitas a tratamento (B) controlo positivo, células sujeitas a 20nM de peróxido de hidrogénio, (C) células incubadas com 49 μ M de quercetina durante 48 horas, (D) células incubadas com 100 μ M de quercetina durante 48 horas.

Em concordância com a análise qualitativa, a análise quantitativa (Figura 65) mostra que a maior concentração de quercetina testada introduziu alterações significativas ($p < 0,05$) a nível da percentagem de ADN na cauda do cometa, em comparação com o controlo negativo. As duas concentrações de quercetina testadas induziram também um aumento no tamanho da cauda do cometa. Neste parâmetro observaram-se diferenças com significado estatístico entre o controlo e as células incubadas com 48,65 μ M de quercetina ($p < 0,05$), assim como entre o controlo e a maior concentração de quercetina utilizada ($p < 0,001$). Por consequência, a incubação com 100 μ M de quercetina induziu diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,001$) no momento da cauda do cometa, em comparação com o controlo negativo.

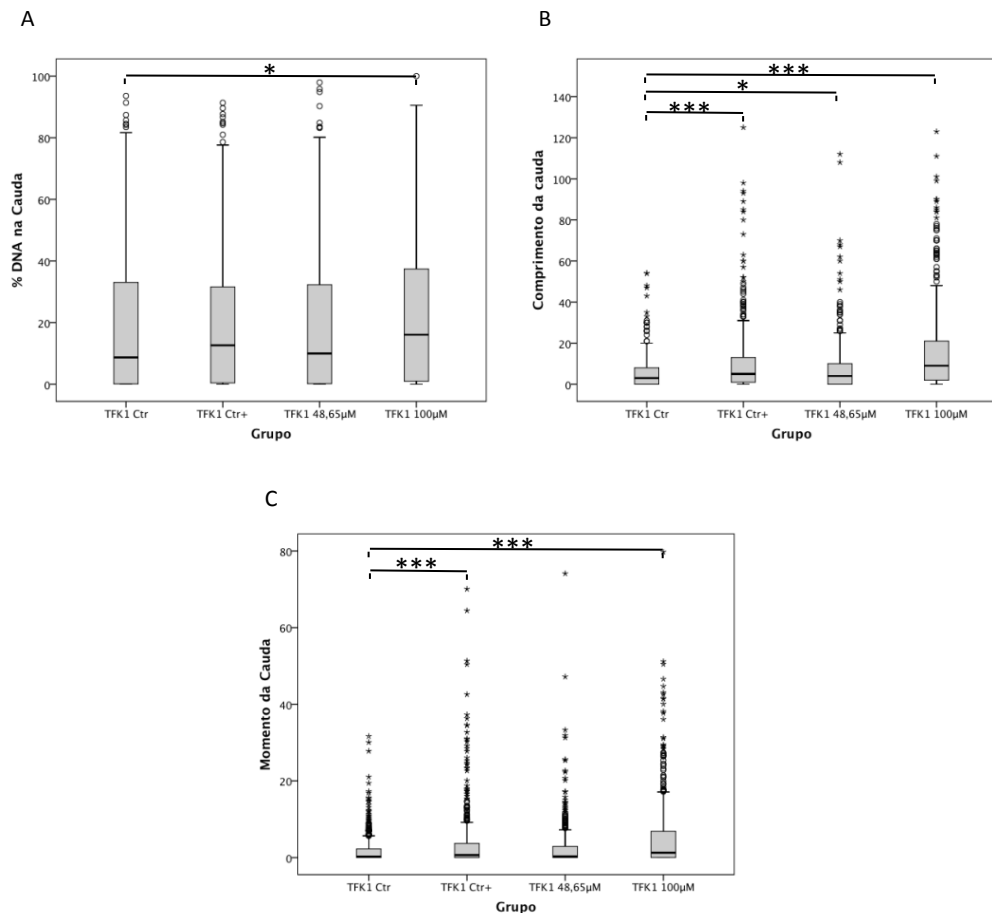


Figura 65: % de ADN na cauda (A), comprimento da cauda (B) e momento de cauda (C), obtido para a linha celular TFK-1 para cada condição. Nos gráficos estão representados os valores obtidos para as condições controlo negativo, em que não houve qualquer tratamento das células e controlo positivo e as condições em que houve administração de 48,65µM e 100µM de quercetina. Os valores discrepantes encontram-se assinalados com ° e *. Os resultados representam a mediana e o desvio padrão de pelo menos 60 cometas adquiridos em três experiências independentes. As diferenças estatisticamente significativas estão representadas por * que representa $p < 0,05$ e por *** que representa $p < 0,001$.

Comparando entre si, os resultados obtido para cada linha celular em estudo quando incubada com a maior concentração de quercetina utilizada, ou seja com a concentração superior ao valor de IC_{50} , a linha celular que possui a maior percentagem de ADN na cauda é a TFK-1, seguida da HepG2, da Hep3B2.1-7 e, por fim, as células HuH7. No que diz respeito a este parâmetro, existem diferenças estatisticamente significativas entre as linhas celulares HepG2 e HuH7 ($p < 0,01$), HuH7 e Hep3B2.1-7 ($p < 0,05$) e TFK-1 e HuH7 ($p < 0,001$). Relativamente aos outros dois parâmetros analisados (comprimento da cauda do cometa e momento da cauda), o maior valor foi determinado para a linha celular TFK-1, seguida da HepG2, da Hep3B2.1-7 e, finalmente, a linha celular HuH7. Em relação ao comprimento da cauda do cometa, observaram-se diferenças com significado

estatístico ($p < 0,001$) entre as células HepG2 e as HuH7, entre as HepG2 e as Hep3B2.1-7, entre as HuH7 e as Hep3B2.1-7, entre as HuH7 e as TFK-1 e entre as Hep3B2.1-7 e as TFK-1. Por sua vez, nos resultados obtidos para o momento da cauda, observaram-se diferenças estatisticamente significativas entre as células HepG2 e as HuH7 ($p < 0,001$), entre as HuH7 e as Hep3B2.1-7 ($p < 0,001$), entre as HuH7 e as TFK-1 ($p < 0,001$) e entre as Hep3B2.1-7 e as TFK-1 ($p < 0,01$).

As Figuras 66, 68, 70 e 72 representam as imagens dos cometas obtidas, respectivamente, para as linhas celulares HepG2, HuH7, Hep3B2.1-7 e TFK-1 para as duas condições de gossipol a que as células foram sujeitas, assim como os respectivos controlos, o controlo negativo e o controlo positivo.

Analisando qualitativamente a Figura 66 foi possível verificar que o tratamento com gossipol induz danos no ADN das células HepG2, uma vez que o tratamento com este composto conduziu um aumento na cauda do cometa.

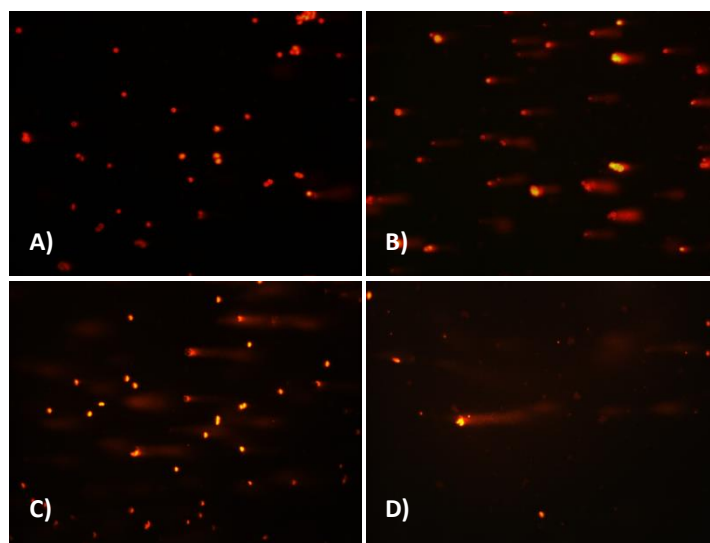


Figura 66: Imagens dos cometas da linha celular HepG2, obtidas para cada condição a que as células foram sujeitas: (A) controlo, células não sujeitas a tratamento (B) controlo positivo, células sujeitas a 20 nM de peróxido de hidrogénio, (C) células incubadas com 2,5 μM de gossipol durante 48 horas, (D) células incubadas com 15 μM de gossipol durante 48 horas.

A análise qualitativa é corroborada pelos dados quantitativos representados nos gráficos da Figura 67. De facto, embora não se denotem diferenças a nível da percentagem de ADN na cauda do cometa, constata-se que a incubação com 15 μM de gossipol, comparativamente ao controlo, induziu um aumento no comprimento da cauda do cometa e, conseqüentemente, no momento da cauda. Para ambos os parâmetros observam-se diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,001$) entre

o controlo negativo e as células incubadas com 15 μM do composto mencionado.

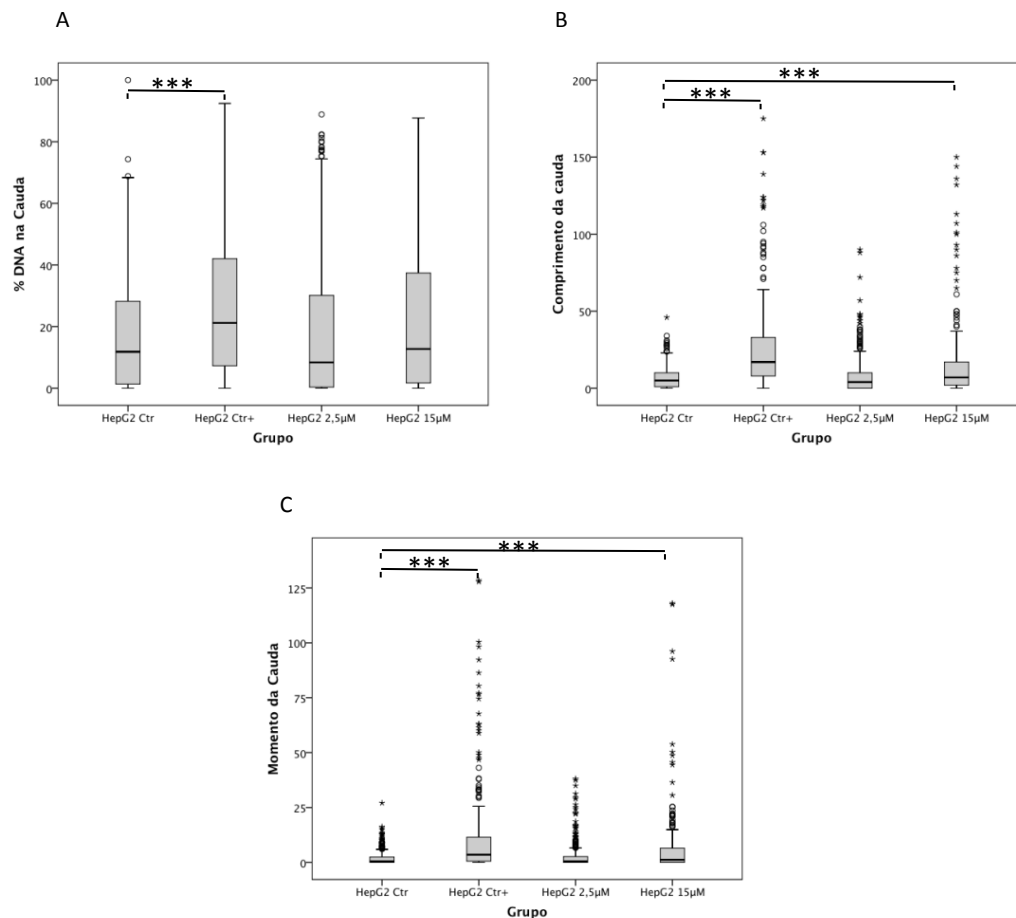


Figura 67: % de ADN na cauda (A), comprimento da cauda (B) e momento de cauda (C), obtido para a linha celular HepG2 para cada condição. Nos gráficos estão representados os valores obtidos para as condições controlo negativo, em que não houve qualquer tratamento das células e controlo positivo e as condições em que houve administração de 2,5 μM e 15 μM de gossipol. Os valores discrepantes encontram-se assinalados com \circ e $*$. Os resultados representam a mediana e o desvio padrão de pelo menos 60 cometas adquiridos em três experiências independentes. As diferenças estatisticamente significativas estão representadas por *** que representa $p < 0,001$.

A análise visual da Figura 68 permite-nos constatar que o tratamento com gossipol induz danos a nível do ADN na linha celular HuH7, uma vez que a incubação com este composto conduz a um aumento na cauda do cometa.

Curiosamente, através dos gráficos da Figura 69, constata-se que a incubação com 4 μM de gossipol conduziu a diferenças estatisticamente significativas no comprimento da cauda do cometa ($p < 0,001$) e também no momento da cauda ($p < 0,05$), em comparação com o controlo negativo, não se observando porém diferenças com significado estatístico quando se aumentou a concentração do composto para 15 μM .

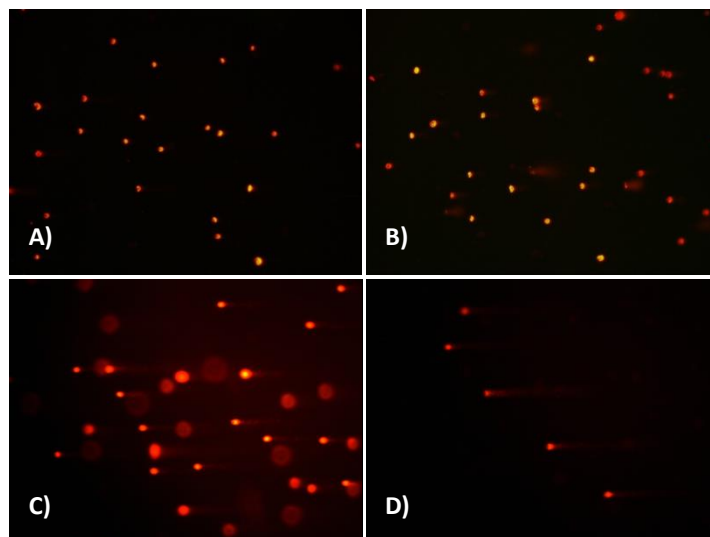


Figura 68: Imagens dos cometas da linha celular HuH7, obtidas para cada condição a que as células foram sujeitas: (A) controlo negativo, células não sujeitas a tratamento (B) controlo positivo, células sujeitas a 20 nM de peróxido de hidrogénio, (C) células incubadas com 4 μ M de gossipol durante 48 horas, (D) células incubadas com 15 μ M de gossipol durante 48 horas.

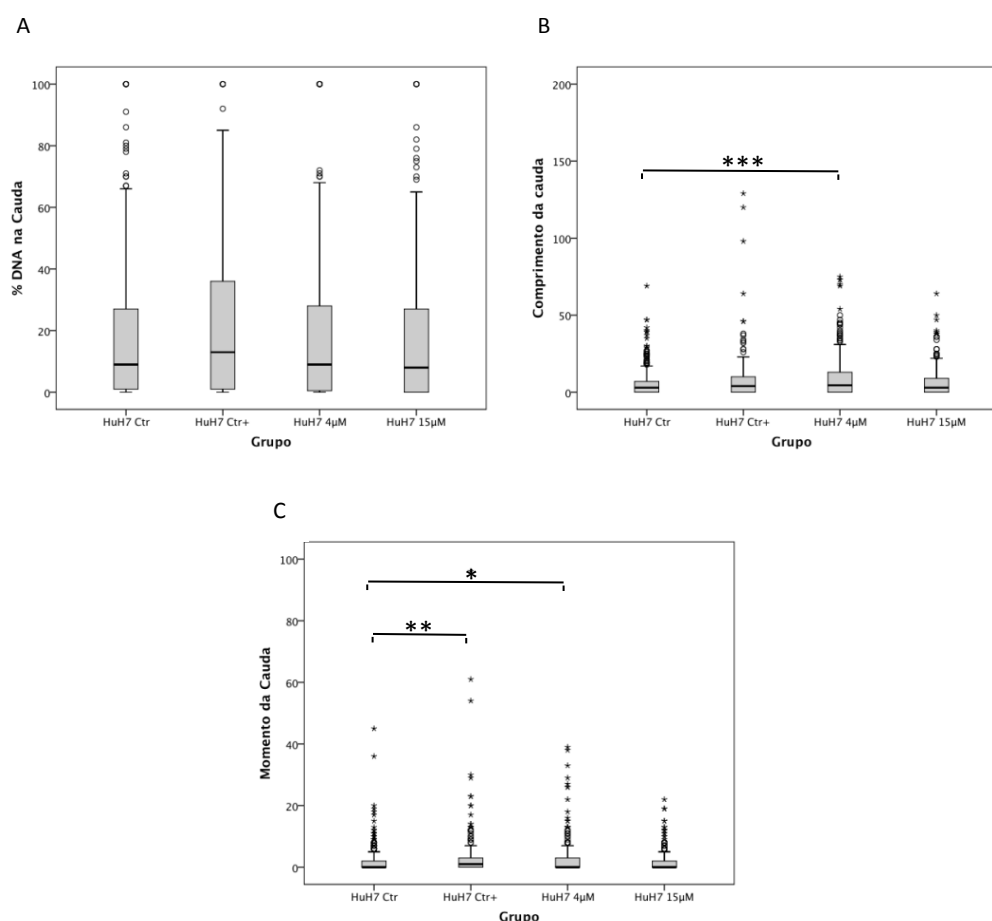


Figura 69: % de ADN na cauda (A), comprimento da cauda (B) e momento de cauda (C), obtido para a linha celular HuH7 para cada condição. Nos gráficos estão representados os valores obtidos para as condições controlo negativo, em que não houve qualquer tratamento das células e controlo positivo e as condições em que houve administração de 4 μ M e 15 μ M de gossipol. Os valores discrepantes encontram-se assinalados com \circ e $*$. Os resultados representam a mediana e o desvio padrão de pelo menos 60 cometas adquiridos em três experiências independentes.

Observando a Figura 70, qualitativamente consegue-se perceber que o tratamento com gossipol induziu danos a nível do ADN na linha celular Hep3B2.1-7, uma vez que o tratamento com as duas concentrações do composto referido conduziram à formação de uma cauda no cometa.

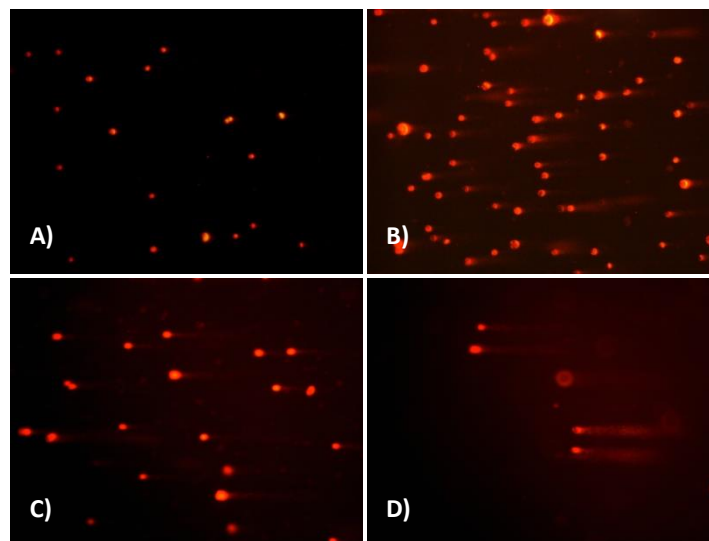


Figura 70: Imagens dos cometas da linha celular Hep3B2.1-7, obtidas para cada condição a que as células foram sujeitas: (A) controlo negativo, células não sujeitas a tratamento (B) controlo positivo, células sujeitas a 20 nM de peróxido de hidrogénio, (C) células incubadas com 1 µM de gossipol durante 48 horas, (D) células incubadas com 15 µM de gossipol durante 48 horas.

Corroborando a análise qualitativa, e de acordo com os gráficos da Figura 71, quantitativamente, verifica-se que o tratamento com as duas concentrações de gossipol testadas induziu alterações estatisticamente significativas ($p < 0,001$) em todos os parâmetros analisados, isto é, conduziu a um aumento da percentagem de ADN na cauda do cometa, um aumento no comprimento da cauda e, consequentemente, um aumento no momento da cauda do cometa.

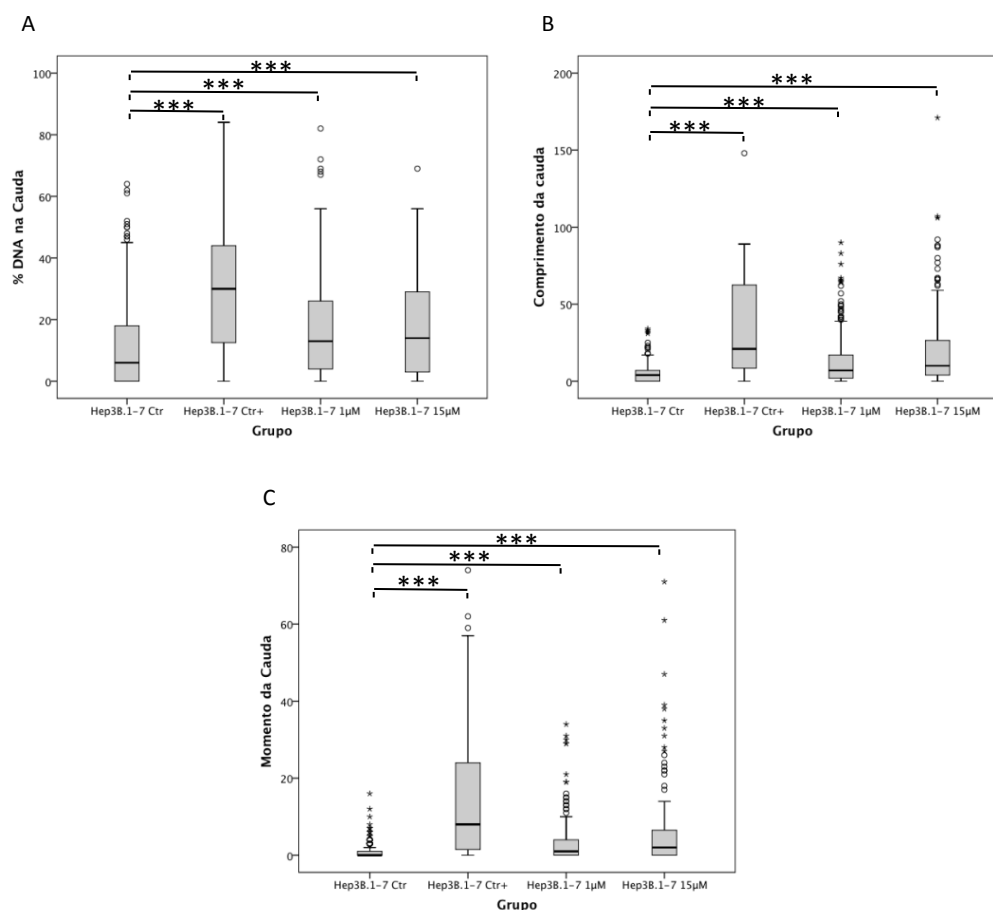


Figura 71: % de ADN na cauda (A), comprimento da cauda (B) e momento de cauda (C), obtido para a linha celular Hep3B2.1-7 para cada condição. Nos gráficos estão representados os valores obtidos para as condições controlo negativo, em que não houve qualquer tratamento das células e controlo positivo e as condições em que houve administração de 1 µM e 15 µM de gossipol. Os valores discrepantes encontram-se assinalados com ° e *. Os resultados representam a mediana e o desvio padrão de pelo menos 60 cometas adquiridos em três experiências independentes. As diferenças estatisticamente significativas estão representadas por *** que representa $p < 0,001$.

A análise qualitativa da Figura 72 permite-nos verificar que, também no caso da linha celular TFK-1, o tratamento com gossipol induziu danos a nível do ADN, uma vez que se constata que a incubação com este composto conduziu a um aumento na cauda do cometa.

Corroborando a análise qualitativa, através da análise dos gráficos da Figura 73, quantitativamente, constata-se que ao incubar as células TFK-1 com 15 µM de gossipol a percentagem de ADN na cauda do cometa aumenta de uma forma estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em comparação com o controlo negativo. Relativamente ao comprimento da cauda do cometa, e ao momento da cauda, em comparação com a condição controlo negativo, a incubação com 4 µM e com 15 µM de gossipol induziu um aumento nestes dois parâmetros com significado estatístico ($p < 0,001$).

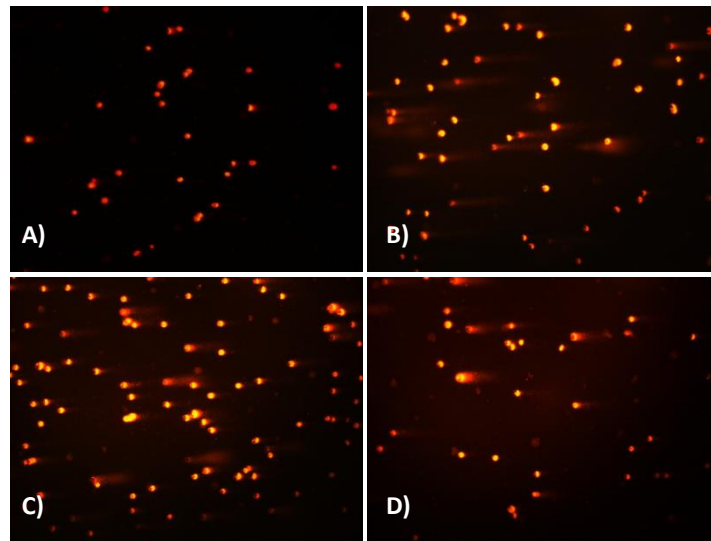


Figura 72: Imagens dos cometas da linha celular TFK-1, obtidas para cada condição a que as células foram sujeitas: (A) controlo negativo, células não sujeitas a tratamento (B) controlo positivo, células sujeitas a 20 nM de peróxido de hidrogénio, (C) células incubadas com 4 μ M de gossipol durante 48 horas, (D) células incubadas com 15 μ M de gossipol durante 48 horas.

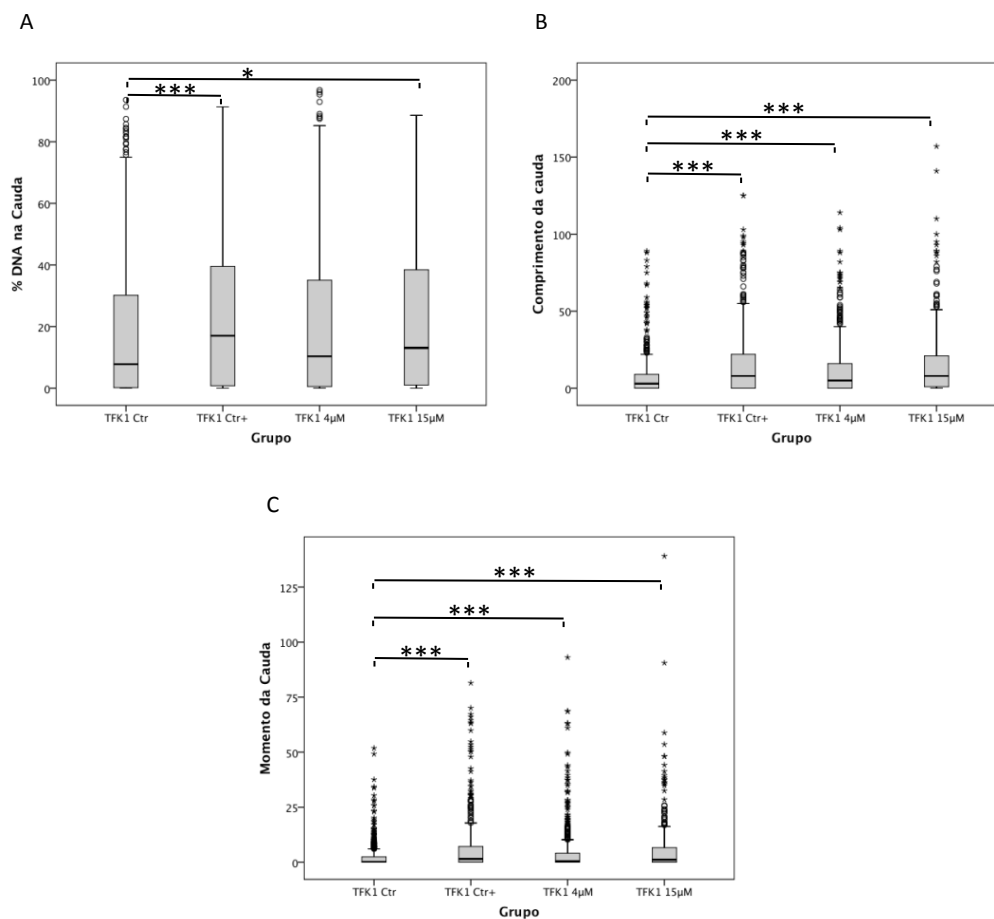


Figura 73: % de ADN na cauda (A), comprimento da cauda (B) e momento de cauda (C), obtido para a linha celular TFK-1 para cada condição. Nos gráficos estão representados os valores obtidos para as condições controlo negativo, em que não houve qualquer tratamento das células e controlo positivo e as condições em que houve administração de 4 μ M e com 15 μ M de gossipol. Os valores discrepantes encontram-se assinalados com $^{\circ}$ e $*$. Os resultados representam a mediana e o desvio padrão de pelo menos 60 cometas adquiridos em três experiências independentes.

Comparando entre si os resultados obtidos para todas as linhas celulares quando incubadas com 15 μM de gossipol observou-se que, em simultâneo com as células HepG2, a linha celular que possuía mais ADN na cauda foi a TFK-1, seguindo-se as células Hep3B2.1-7 e, finalmente, a linha celular HuH7. Observaram-se diferenças com significado estatístico entre as células HepG2 e as HuH7 ($p < 0,001$), entre as HuH7 e as TFK-1 ($p < 0,001$) e também entre as linhas celulares HuH7 e Hep3B2.1-7 ($p < 0,05$). Em relação ao comprimento da cauda, o maior valor foi observado para as células Hep3B2.1-7, seguindo-se as células HepG2 com valor similar às TFK-1 e, por fim, as HuH7, tendo-se observado diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,001$) entre as linhas celulares HepG2 e HuH7, entre as células HuH7 e as Hep3B2.1-7 e entre as HuH7 e as TFK-1. Já relativamente ao momento da cauda, o maior valor obtido foi para a linha celular HepG2, seguido da Hep3B2.1-7 com valor semelhante à TFK-1 e, por último, a linha celular HuH7. Neste parâmetro observaram-se diferenças com significado estatístico ($p < 0,001$) entre as linhas celulares HepG2 e HuH7, entre as células HuH7 e as Hep3B2.1-7 e entre as HuH7 e as TFK-1.

Avaliação da expressão de GLUT-1

Através da técnica de citometria de fluxo avaliou-se a expressão membranar e citoplasmática do GLUT-1 em resposta a tratamento com quercetina e com gossipol. Os resultados obtidos estão representados, respectivamente, nas Figuras 74 e 75 e foram normalizados relativamente à condição controlo.

Analisando a Figura 74A constata-se que para a linha celular HepG2, à medida que aumenta a concentração de quercetina, ocorreu um aumento da expressão membranar de GLUT-1 acompanhado por uma diminuição da expressão citoplasmática do mesmo. A diminuição da expressão citoplasmática deste transportador apresenta diferenças com significado estatístico entre o controlo e os 100 μM deste composto ($p < 0,05$).

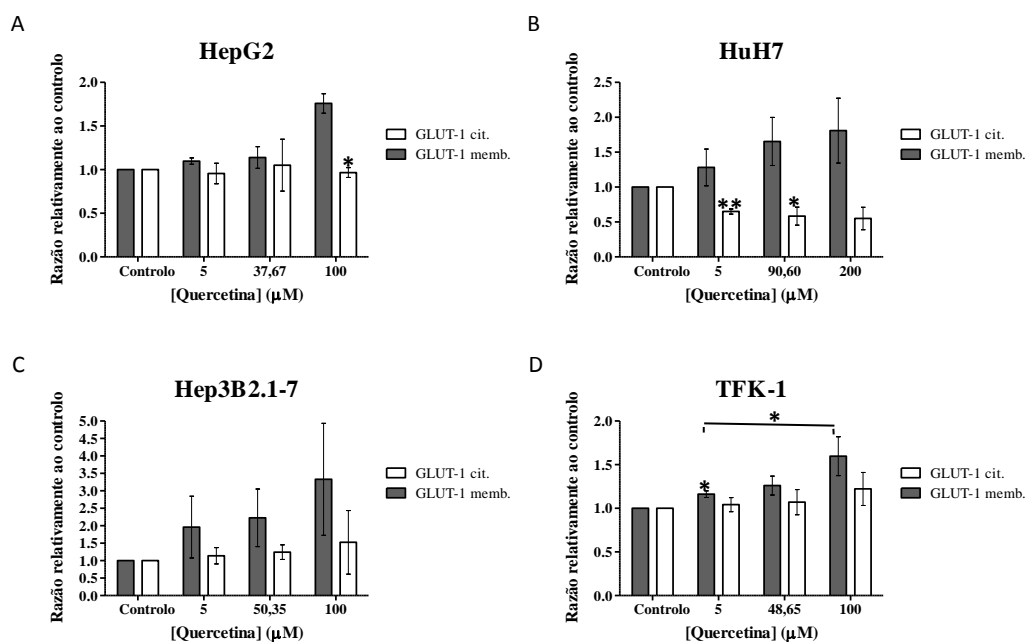


Figura 74: Análise da expressão membranar e citoplasmática de GLUT-1 para as linhas celulares HepG2 (A), HuH7 (B), Hep3B2.1-7 (C) e TFK-1 (D) para as várias concentrações de quercetina testadas. Para cada condição, os resultados foram normalizados relativamente ao controlo e exprimem a média e o desvio padrão de quatro experiências independentes. As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo estão assinaladas com *. A utilização de * representa $p < 0,05$ e ** representa $p < 0,01$.

De modo similar, também para a linha celular HuH7 (Figura 74B) ocorreu um aumento da expressão membranar de GLUT-1 à medida que se aumentou a concentração de quercetina, sendo este aumento acompanhado por uma diminuição da expressão citoplasmática deste transportador. Ocorreram diferenças estatisticamente significativas na expressão citoplasmática de GLUT-1 entre o controlo e a menor concentração de quercetina utilizada ($p < 0,001$) e entre o controlo e a concentração correspondente ao IC_{50} ($p < 0,05$).

Já para as linhas celulares Hep3B2.1-7 (Figura 74C) e TFK-1 (Figura 74D), à medida que se aumentou a concentração de quercetina observou-se um aumento da expressão membranar de GLUT-1. No caso das células TFK-1 ocorrem diferenças com significância estatística entre a expressão membranar deste transportador no controlo e nas células incubadas com 5 μM de quercetina ($p < 0,05$) e entre esta última concentração e os 100 μM ($p < 0,05$). Em relação à expressão citoplasmática deste transportador observa-se uma tendência para um aumento à medida que se aumentou a concentração de composto.

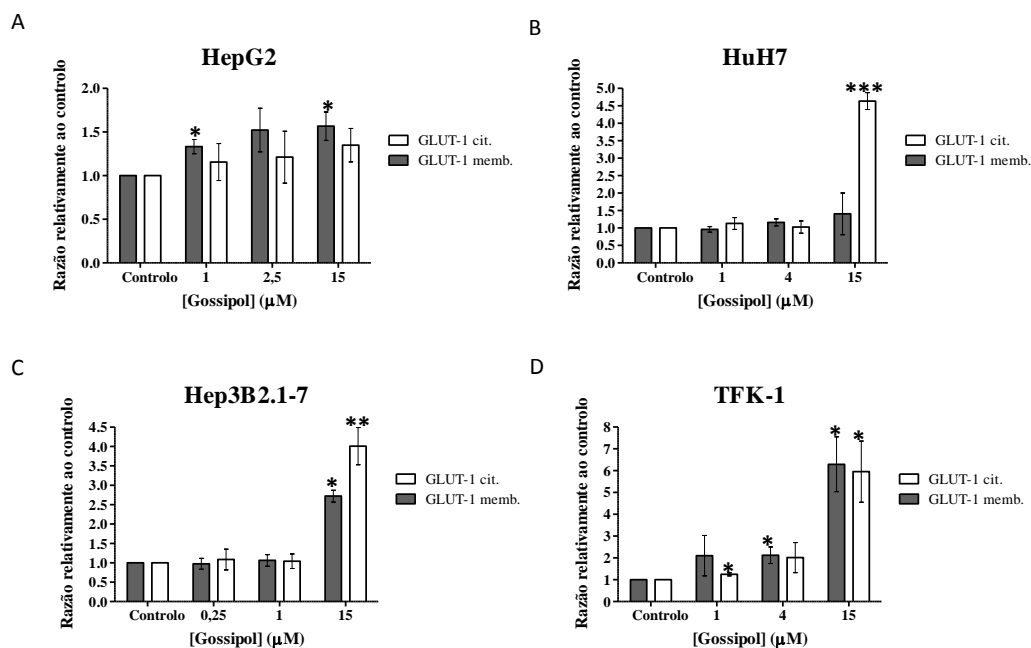


Figura 75: Análise da expressão membranar e citoplasmática do GLUT-1 para as linhas celulares HepG2 (A), HuH7 (B), Hep3B2.1-7 (C) e TFK-1 (D) para as várias concentrações de gossipol testadas. Para cada condição, os resultados foram normalizados relativamente ao controlo e exprimem a média e o desvio padrão de quatro experiências independentes. As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo estão assinaladas com *. A utilização de * representa $p < 0,05$ e ** representa $p < 0,01$ e *** representa $p < 0,001$.

Em relação a resposta ao tratamento com gossipol, para a linha celular HepG2 (Figura 75A), observou-se um aumento gradual tanto da expressão membranar como da expressão citoplasmática de GLUT-1. Observaram-se diferenças estatisticamente significativas para a expressão membranar deste transportador entre as células controlo e as células incubadas com $1 \mu\text{M}$ de gossipol ($p < 0,05$) assim como entre o controlo e a concentração de $15 \mu\text{M}$ ($p < 0,05$).

Já para a linha celular HuH7 (figura 75B) verificou-se que para as duas menores concentrações de gossipol testadas não ocorreram diferenças a nível da expressão deste transportador tanto a nível membranar como a nível citoplasmático, comparativamente ao controlo. Ao aumentar a concentração do composto para $15 \mu\text{M}$ observou-se uma tendência para o aumento da expressão membranar de GLUT-1 e, no caso da expressão citoplasmática, verificou-se um aumento bastante evidente com diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo ($p < 0,001$).

Observando a Figura 75C constata-se que, à semelhança do que ocorreu com a linha celular HuH7, também para a linha celular Hep3B2.1-7 a expressão quer membranar quer citoplasmática de GLUT-1 não sofreu alterações após a incubação com as duas menores concentrações de gossipol testadas, observando-

se que para a concentração de 15 μM , ocorreu um acréscimo significativo na expressão deste transportador tanto na sua componente membranar ($p < 0,05$) como na componente citoplasmática ($p < 0,01$).

Em relação à linha celular TFK-1 (Figura 75D) à medida que aumentou a concentração de gossipol verificou-se um aumento gradual quer da expressão membranar quer da expressão citoplasmática de GLUT-1. Observaram-se diferenças com significado estatística entre o controlo e os 4 μM de gossipol ($p < 0,05$) e entre a condição controlo e os 15 μM ($p < 0,05$) no que diz respeito à expressão membranar deste transportador, a significância estatística verificou-se entre o controlo e a concentração de 1 μM ($p < 0,05$) e entre o controlo e a concentração de 15 μM ($p < 0,05$) para a expressão citoplasmática.

Estudo funcional do GLUT-1

De acordo com o que está descrito na literatura, e como já foi referido anteriormente no capítulo estado da arte, os compostos naturais quercetina e gossipol são inibidores competitivos do GLUT-1. Nesse sentido, efectuaram-se estudos de captação de ^{18}F -FDG em células pré-incubadas com cada um desses compostos, de modo a avaliar o seu efeito na captação deste radiofármaco e, por analogia, de glicose. Os resultados obtidos para a quercetina assim como os respectivos controlos estão representados na Figura 76.

Considerando o modelo aplicado, foi possível descrever as curvas utilizando os parâmetros A_{max} (% de captação máxima) e T_{50} (tempo para atingir metade da captação máxima) que se apresentam, para cada condição, na Tabela 19.

Os resultados apresentados nos gráficos da Figura 76 mostram que para todas as linhas celulares em estudo ocorreu uma diminuição da percentagem de captação de ^{18}F -FDG quando as células foram previamente incubadas com quercetina, tal como se pode constatar através da comparação dos parâmetros apresentados nas Tabelas 7 e 19. O decréscimo na captação do radiofármaco em estudo ocorre para ambas as concentrações de glicose no meio de cultura. Ainda no que diz respeito ao parâmetro A_{max} (% de captação máxima), ocorreram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$) no caso da linha celular HepG2 entre as células controlo e as células pré-incubadas com quercetina quando as células cresceram em meio LG. Em relação à linha celular HuH7, aquando da pré-incubação com quercetina observou-se uma diminuição do valor do parâmetro

A_{max} determinado comparativamente ao controlo quando as células cresceram em meio HG ($p < 0,05$), assim como quando as células foram cultivadas em meio LG ($p < 0,01$). No caso da linha celular Hep3B2.1-7 não se observaram diferenças com significância estatística no parâmetro A_{max} entre as células tratadas e as células controlo, para ambas as formulações de meio de cultura. Por fim, para as células TFK-1, existem diferenças com significância estatística entre o parâmetro A_{max} obtido para as células controlo e para as células pré-incubadas com quercetina ($p < 0,001$) quando estas cresceram em meio com baixo teor de glicose.

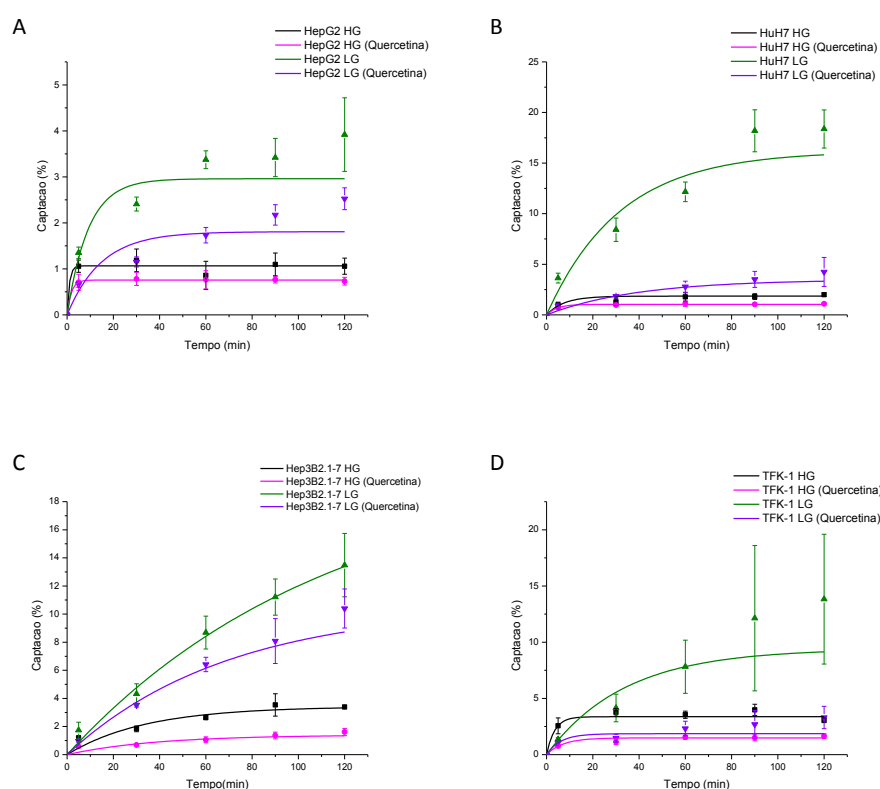


Figura 76: Perfis de captação de ^{18}F -FDG pelas linhas celulares HepG2 (A), HuH7 (B), Hep3B2.1-7 (C) e TFK-1 (D), em células controlo e em células pré-incubadas com quercetina. As células foram cultivadas em meio com elevado teor de glicose e em meio com baixo teor de glicose. Os resultados expressam a média e o desvio padrão de quatro experiências independentes realizadas em duplicado. O r^2 obtido foi sempre igual ou superior a 0,9.

Tabela 19: Valores dos parâmetros $A_{m\acute{a}x}$ (%) e T_{50} (minutos) e correspondentes erros padrão relativos à captação de ^{18}F -FDG e obtidos para todas as linhas celulares em estudo quando incubadas com quercetina. Os parâmetros foram determinados quando as células cresceram em meio com baixo teor de glicose e quando foram cultivadas em meio com elevado teor de glicose.

Linha celular	Concentração de glicose no meio	Parâmetro	Média	Erro Padrão
HepG2	LG	$A_{m\acute{a}x}$ (%)	1,81	0,36
		T_{50} (minutos)	10,26	5,57
	HG	$A_{m\acute{a}x}$ (%)	0,76	0,01
		T_{50} (minutos)	1,25	0,35
HuH7	LG	$A_{m\acute{a}x}$ (%)	3,49	1,51
		T_{50} (minutos)	27,19	17,95
	HG	$A_{m\acute{a}x}$ (%)	1,04	0,03
		T_{50} (minutos)	3,10	0,60
Hep3B2.1-7	LG	$A_{m\acute{a}x}$ (%)	10,59	4,31
		T_{50} (minutos)	47,83	25,06
	HG	$A_{m\acute{a}x}$ (%)	1,40	0,81
		T_{50} (minutos)	26,45	26,68
TFK-1	LG	$A_{m\acute{a}x}$ (%)	1,86	0,36
		T_{50} (minutos)	4,20	2,51
	HG	$A_{m\acute{a}x}$ (%)	1,49	0,11
		T_{50} (minutos)	4,98	1,60

No que diz respeito ao parâmetro T_{50} , nunca se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre os valores do controlo e os valores obtidos em células pré-incubadas com quercetina.

O teste de exclusão do azul de tripano demonstrou que aquando da conclusão dos estudos de captação a viabilidade celular foi sempre igual ou superior a 95%.

Na Figura 77 estão representados os resultados obtidos através dos estudos de captação nas células pré-incubadas com gossipol e também nas células da condição controlo.

A partir das curvas representadas na Figura 77, e considerando o modelo utilizado, foi possível descrever os perfis de captação das linhas celulares em estudo quando pré-incubadas com gossipol utilizando os parâmetros A_{max} e T_{50} que se apresentam para cada condição na Tabela 20.

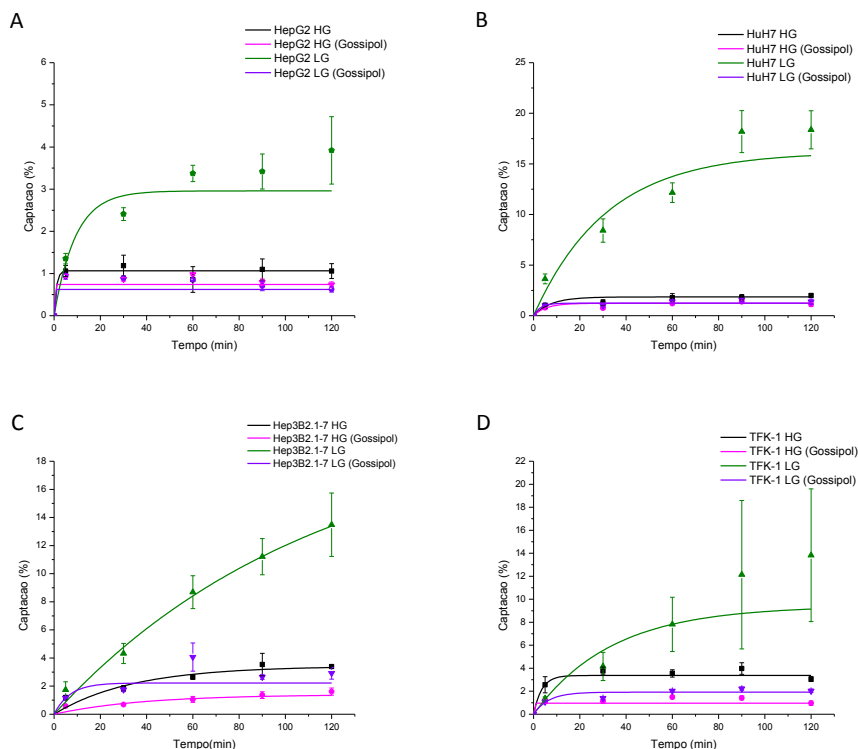


Figura 77: Perfis de captação de ^{18}F -FDG pelas linhas celulares HepG2 (A), HuH7 (B), Hep3B2.1-7 (C) e TFK-1 (D), em células na condição controlo e em células pré-incubadas com gossipol. As células foram cultivadas em meio com elevado teor de glicose e em meio com baixo teor de glicose. Os resultados expressam a média e o desvio padrão de quatro experiências independentes realizadas em duplicado. O r^2 obtido foi sempre igual ou superior a 0,9.

Observando os gráficos da Figura 77 consegue-se constatar que, para todas as linhas celulares em estudo, ocorreu uma diminuição da percentagem de captação de ^{18}F -FDG quando as células foram previamente incubadas com gossipol. Tal facto pode ser reforçado através da comparação dos parâmetros A_{max} apresentados nas Tabelas 7 e 20. O decréscimo na captação de ^{18}F -FDG ocorreu para as duas concentrações de glicose no meio de cultura.

Tabela 20: Valores dos parâmetros A_{max} (%) e T_{50} (minutos) e correspondentes erros padrão relativos à captação de ^{18}F -FDG e obtidos para todas as linhas celulares em estudo quando incubadas com gossipol. Os parâmetros foram determinados quando as células cresceram em meio com baixo teor de glicose e quando foram cultivadas em meio com elevado teor de glicose.

Linha celular	Concentração de glicose no meio	Parâmetro	Média	Erro Padrão
HepG2	LG	A_{max} (%)	0,622	0,13
		T_{50} (minutos)	0,01	0
	HG	A_{max} (%)	0,74	0,13
		T_{50} (minutos)	0,18	0,50
HuH7	LG	A_{max} (%)	1,24	0,14
		T_{50} (minutos)	2,05	0,86
	HG	A_{max} (%)	1,22	0,132
		T_{50} (minutos)	3,78	3,77
Hep3B2.1-7	LG	A_{max} (%)	2,22	0,30
		T_{50} (minutos)	4,74	1,12
	HG	A_{max} (%)	1,40	0,81
		T_{50} (minutos)	26,45	26,67
TFK-1	LG	A_{max} (%)	1,92	0,18
		T_{50} (minutos)	4,53	2,27
	HG	A_{max} (%)	0,96	0,80
		T_{50} (minutos)	0,02	0,01

Relativamente ao parâmetro A_{max} , no caso da linha celular HepG2 ocorrem diferenças estatisticamente significativas entre o valor obtido para as células controlo e para as células pré-incubadas com gossipol, quer quando as células cresceram em meio HG ($p < 0,01$), quer quando as células cresceram em meio LG ($p < 0,001$). No que diz respeito à linha celular HuH7, quando se efectuou a incubação com gossipol observou-se uma diminuição do valor do parâmetro A_{max} , em comparação com o controlo, quando as células cresceram em meio HG ($p < 0,05$), e também quando as células foram cultivadas em meio LG ($p < 0,01$). No caso da linha celular Hep3B2.1-7 não se observaram diferenças com significância estatística no parâmetro A_{max} . Por fim, para as células TFK-1, existem diferenças estatisticamente significativas entre o parâmetro A_{max} das células na condição controlo e das células pré-incubadas com gossipol ($p < 0,001$) quando estas cresceram em meio com baixo teor de glicose.

Por sua vez, no que diz respeito ao parâmetro T_{50} , nunca se verificaram diferenças com significado estatístico entre os valores obtidos nos controlos e os valores obtidos em células pré-incubadas com gossipol.

Também neste caso, o teste de exclusão do azul de tripano demonstrou que, no término dos estudos de captação, a viabilidade celular foi sempre igual ou superior a 95%.

Terapia combinada

Uma vez estudado o efeito citotóxico da quercetina, do gossipol, do sorafenib e da doxorrubicina isoladamente procedeu-se ao estudo do efeito combinado dos fármacos com os compostos naturais. A adição dos dois compostos foi efectuada em simultâneo, e o seu efeito na actividade metabólica foi avaliado passadas 48 horas.

Os gráficos da Figura 78 representam as curvas dose-resposta obtidas para o tratamento combinado de quercetina com sorafenib para todas as linhas celulares em estudo.

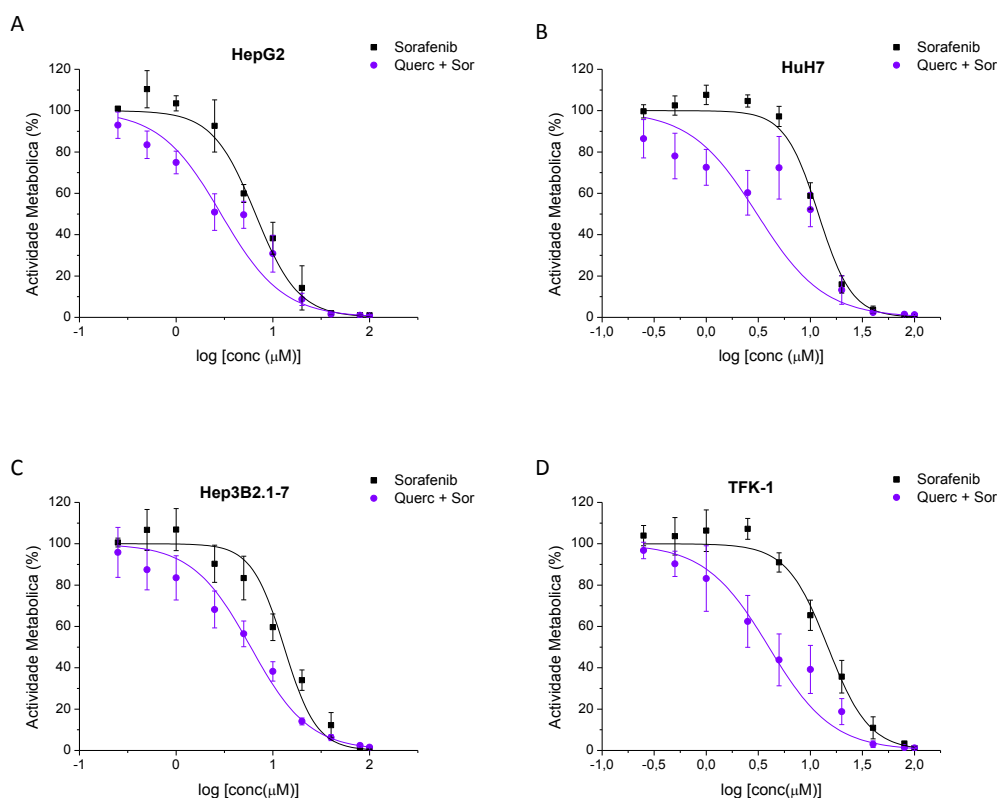


Figura 78: Curvas dose-resposta obtidas para o tratamento combinado de quercetina com sorafenib nas quatro linhas celulares em estudo. A adição dos dois compostos foi efectuada em simultâneo, e o seu efeito na actividade metabólica avaliado 48 horas depois. Os gráficos representam os resultados obtidos para as linhas celulares HepG2 (A), HuH7 (B), Hep3B2.1-7 (C) e TFK-1 (D). Os resultados expressam a média e o desvio padrão de seis experiências independentes. O r^2 obtido foi sempre igual ou superior a 0,9.

As curvas dose resposta traçadas e representadas na Figura 78 permitiram calcular os valores de IC_{50} para cada uma das condições estudadas. Os valores obtidos assim como os valores de IC_{50} determinadas com cada um dos compostos isoladamente estão representados na Tabela 21.

Tabela 21: Valores de IC₅₀ e intervalos de confiança obtidos para as linhas celulares HepG2, HuH7, Hep3B2.1-7 e TFK-1, quando incubadas durante 48 horas com a combinação de quercetina com sorafenib, ou isoladamente com cada um dos compostos.

Linha celular	Condição	IC ₅₀ (μ M)	Intervalo de confiança sorafenib(μ M)
HepG2	Quercetina	37,67	[31,24; 43,82]
	Sorafenib	6,62	[5,46; 7,10]
	Querc + Sor	9,42 Querc + 2,92 Sor	[1,95; 3,38]
HuH7	Quercetina	90,60	[79,35; 101,44]
	Sorafenib	17,99	[13,32; 20,05]
	Querc + Sor	22,65 Querc + 3,08 Sor	[1,28; 4,23]
Hep3B2.1-7	Quercetina	50,35	[46,23; 74,63]
	Sorafenib	13,08	[10,78; 14,03]
	Querc + Sor	12,59 Querc + 5,91 Sor	[4,97; 6,29]
TFK-1	Quercetina	48,65	[35,66; 66,04]
	Sorafenib	4,63	[13,53; 16,06]
	Querc + Sor	12,16 Querc + 3,99 Sor	[2,63; 4,64]

De acordo com a Tabela 21 verifica-se que, para todas as linhas celulares em estudo, a adição de quercetina induziu uma diminuição no valor de IC₅₀ de sorafenib.

A linha celular HuH7 é aquela que demonstrou ser mais sensível ao tratamento combinado, uma vez que se observou um decréscimo acentuado da concentração de sorafenib necessária para atingir o IC₅₀ relativamente à incubação com sorafenib isoladamente, de facto, a concentração de sorafenib passou de 17,99 μ M para 3,08 μ M ($p < 0,01$). Relativamente à linha celular HepG2, ao adicionar 9,42 μ M de quercetina sensibilizaram-se as células para o sorafenib, uma vez que o valor de IC₅₀ do mesmo se reduziu de uma forma estatisticamente significativa ($p < 0,01$) de 6,62 μ M para 2,92 μ M. No que respeito à linha celular Hep3B2.1-7, a adição simultânea de 12,59 μ M de quercetina induziu uma redução no valor de IC₅₀ de sorafenib de 13,08 μ M para 5,91 μ M, tendo ocorrido significância estatística ($p < 0,001$) (Tabela 21). À semelhança do que se observou para as linhas celulares de carcinoma hepatocelular, no que diz respeito à linha celular TFK-1, a utilização de 12,16 μ M de quercetina conseguiu induzir uma redução no valor de IC₅₀ de sorafenib de 4,63 μ M para 3,99 μ M (Tabela 21).

A avaliação do efeito produzido pelo tratamento combinado de quercetina com sorafenib pelo método de Chou e Talalay resultou nos índices de combinação descritos na Tabela 22.

Tabela 22: Índices de combinação dos tratamentos combinados de quercetina com sorafenib obtidos para as linhas celulares HepG2, HuH7, Hep3B2.1-7 e TFK-1 pelo método de Chou e Talalay.

Índice de combinação				
	HepG2	HuH7	Hep3B2.1-7	TFK-1
Querc + Sor	0,69	0,42	0,70	1,11

De acordo com o método de Chou e Talalay (Tabela 22) verificou-se que, aquando da adição simultânea dos dois compostos, ocorreu sinergia para todas as linhas celulares de carcinoma hepatocelular estudadas, mas não para a linha celular de colangiocarcinoma.

A Figura 79 representa as curvas dose-resposta obtidas através do tratamento combinado de gossipol com sorafenib para as diversas linhas celulares em estudo.

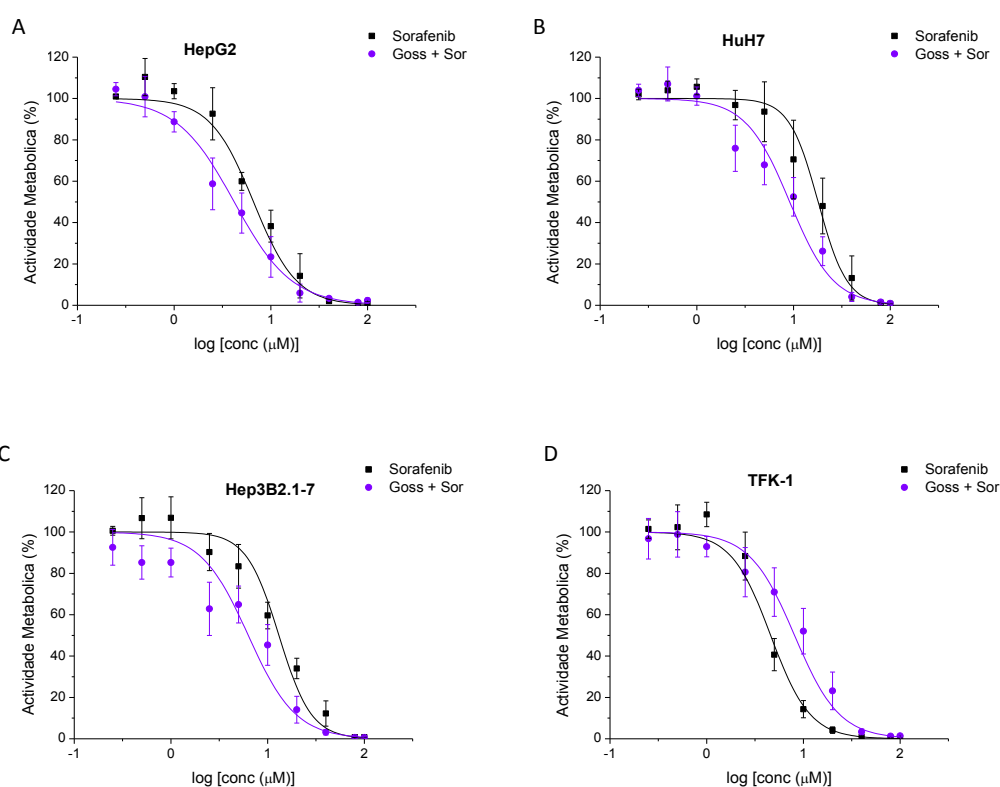


Figura 79: Curvas dose-resposta obtidas para o tratamento combinado de gossipol com sorafenib nas quatro linhas celulares em estudo. A adição dos dois compostos foi efectuada em simultâneo, e o seu efeito na actividade metabólica avaliado 48 horas depois. Os gráficos representam os resultados obtidos para as linhas celulares HepG2 (A), HuH7 (B), Hep3B2.1-7 (C) e TFK-1 (D). Os resultados expressam a média e o desvio padrão de seis experiências independentes. O r^2 obtido foi sempre igual ou superior a 0,9.

A partir das curvas dose-resposta anteriormente representadas foi possível calcular os valores de IC₅₀ para cada um dos tratamentos testados. Os valores de IC₅₀, assim como os respectivos intervalos de confiança são apresentados na Tabela 23. Na mesma tabela estão também representados os valores de IC₅₀ e os intervalos de confiança obtidos para cada um dos compostos isoladamente.

Tabela 23: Valores de IC₅₀ e intervalos de confiança obtidos para as linhas celulares HepG2, HuH7, Hep3B2.1-7 e TFK-1, quando tratadas em combinação com gossipol e sorafenib, assim como para cada um dos compostos isoladamente.

Linha celular	Condição	IC ₅₀ (μ M)	Intervalo de confiança sorafenib (μ M)
HepG2	Gossipol	2,16	[1,96; 2,37]
	Sorafenib	6,62	[5,46; 7,10]
	Goss + Sor	0,55 Goss + 4,17 Sor	[2,92; 5,97]
HuH7	Gossipol	4,24	[4,03; 4,46]
	Sorafenib	17,99	[13,32; 20,05]
	Goss + Sor	1,06 Goss + 9,13 Sor	[6,38; 13,08]
Hep3B2.1-7	Gossipol	0,87	[0,72; 1,05]
	Sorafenib	13,08	[10,78; 14,03]
	Goss + Sor	0,22 Goss + 6,31 Sor	[3,92; 10,18]
TFK-1	Gossipol	4,36	[3,87; 4,92]
	Sorafenib	4,63	[4,07; 4,85]
	Goss + Sor	1,09 Goss + 8,10 Sor	[5,68; 11,57]

Através do método de Chou e Talalay e utilizando os valores de IC₅₀ presentes na Tabela 23 foi possível determinar os índices de combinação, que se resumiam na tabela seguinte (Tabela 24).

Tabela 24: Índices de combinação dos tratamentos com gossipol e sorafenib obtidos para as linhas celulares HepG2, HuH7, Hep3B2.1-7 e TFK-1 pelo método de Chou e Talalay.

Índice de combinação				
	HepG2	HuH7	Hep3B2.1-7	TFK-1
Goss + Sor	0,88	0,76	0,73	2,00

De acordo com a Tabela 23 constata-se que, para as linhas celulares de carcinoma hepatocelular, o valor de IC_{50} do sorafenib diminuiu quando se efectuou a adição simultânea de gossipol. Por sua vez, no caso da linha celular TFK-1 esse valor aumentou.

Para a linha celular HepG2, aquando da adição simultânea dos dois compostos, embora sem significância estatística, observou-se uma diminuição do valor de IC_{50} do sorafenib de 6,62 μM para 4,17 μM . De acordo com os valores dos índices de combinação presentes na Tabela 24 constatou-se que, para esta linha celular, ocorreu sinergia quando as células foram tratadas com a combinação dos dois compostos. Já no caso das células HuH7, o tratamento combinado induziu uma diminuição do valor de IC_{50} do sorafenib de 17,99 μM para 9,13 μM de uma forma estatisticamente significativa ($p < 0,05$), verificando-se a existência de efeito sinérgico (Tabela 24). Relativamente à linha celular Hep3B2.1-7 o tratamento combinado também conduziu a uma diminuição do valor de IC_{50} de sorafenib, ocorrendo diferenças com significado estatístico ($p < 0,05$), e observando-se efeito sinérgico (Tabela 24). Por fim, no caso da linha celular TFK-1 observou-se um aumento do valor de IC_{50} determinado de 4,63 μM para 8,10 μM , de uma forma estatisticamente significativa ($p < 0,05$). De facto, no caso desta linha celular verificou-se a ocorrência de antagonismo aquando do tratamento combinado de gossipol com sorafenib.

No decorrer deste trabalho experimental também se efectuaram estudos de combinação de quercetina com doxorrubicina. As curvas de dose-resposta obtidas com este tratamento para todas as linhas celulares em estudo estão representadas na Figura 80.

A partir das curvas dose-resposta representadas na figura 80 foi possível determinar os IC_{50} em resposta aos diversos tratamentos, assim como os respectivos intervalos de confiança. Os valores determinados assim como os valores calculados para cada um dos compostos isoladamente estão representados na Tabela 25.

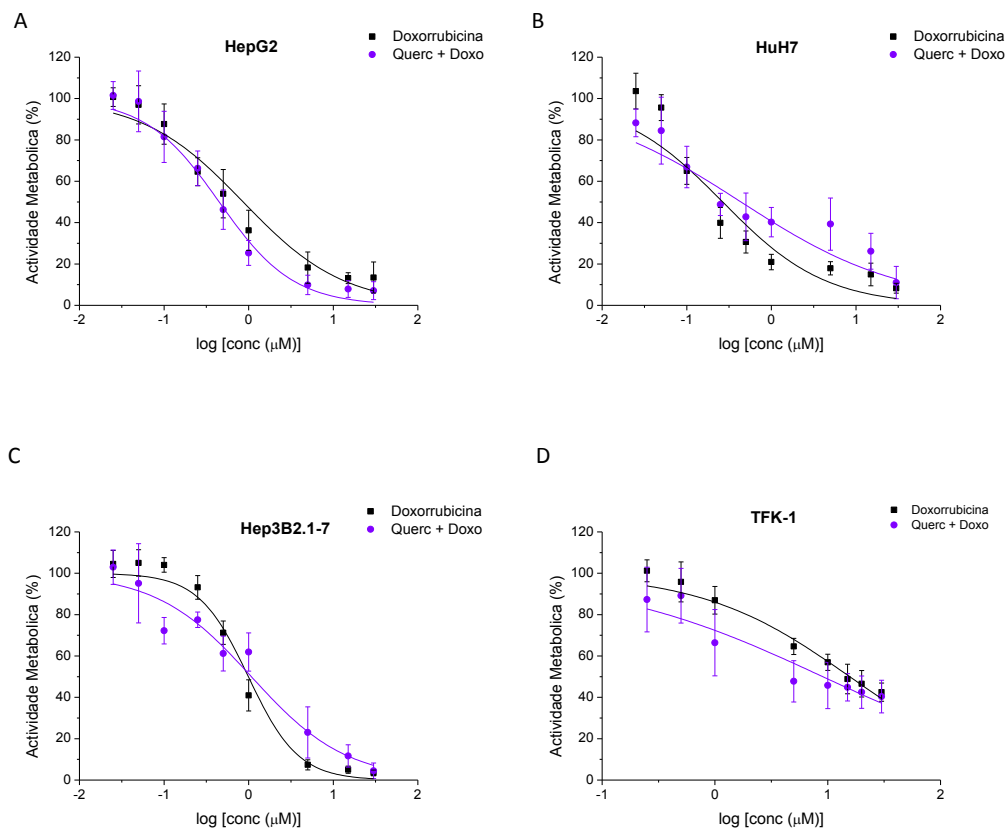


Figura 80: Curvas dose-resposta obtidas para o tratamento combinado de quercetina com doxorubicina nas quatro linhas celulares em estudo. A adição dos dois compostos foi efectuada em simultâneo, e o seu efeito na actividade metabólica avaliado 48 horas depois. Os gráficos representam os resultados obtidos para as linhas celulares HepG2 (A), HuH7 (B), Hep3B2.1-7 (C) e TFK-1 (D). Os resultados expressam a média e o desvio padrão de seis experiências independentes. O r^2 obtido foi sempre igual ou superior a 0,9.

Tabela 25: Valores de IC_{50} e intervalos de confiança obtidos para as linhas celulares HepG2, HuH7, Hep3B2.1-7 e TFK-1, quando tratadas em combinação com quercetina e doxorubicina, assim com para cada um dos compostos isoladamente.

Linha celular	Condição	$IC_{50}(\mu M)$	Intervalo de confiança doxorubicina (μM)
HepG2	Quercetina	37,67	[31,24; 43,82]
	Doxorubicina	0,68	[0,54; 0,79]
	Querc + Doxo	9,42 Querc + 0,46 Doxo	[0,38; 0,55]
HuH7	Quercetina	90,60	[79,35; 101,44]
	Doxorubicina	0,24	[0,21; 0,26]
	Querc + Doxo	22,65 Querc + 0,45 Doxo	[0,33; 0,60]
Hep3B2.1-7	Quercetina	50,35	[46,23; 74,63]
	Doxorubicina	0,83	[0,76; 0,86]
	Querc + Doxo	12,59 Querc + 1,08 Doxo	[0,88; 1,32]
TFK-1	Quercetina	48,65	[35,66; 66,04]
	Doxorubicina	15,52	[13,48; 17,86]
	Querc + Doxo	12,16 Querc + 11,08 Doxo	[8,27; 14,83]

A partir dos valores de IC_{50} calculados e anteriormente apresentados, recorrendo ao método de Chou e Talalay foi possível determinar os índices de combinação que se apresentam de seguida (Tabela 26).

Tabela 26: Índices de combinação dos tratamentos resultantes do tratamento combinado de quercetina com doxorubicina obtidos para as linhas celulares HepG2, HuH7, Hep3B2.1-7 e TFK-1 pelo método de Chou e Talalay.

Índice de combinação				
	HepG2	HuH7	Hep3B2.1-7	TFK-1
Querc + Doxo	0,77	1,92	1,32	0,96

De acordo com os dados apresentados na Tabela 25 verifica-se que no caso da linha celular HepG2 a adição simultânea de quercetina com doxorubicina induziu uma diminuição do valor de IC_{50} da doxorubicina de $0,68 \mu\text{M}$ para $0,46 \mu\text{M}$ de uma maneira estatisticamente significativa ($p < 0,01$). De facto, e tendo em conta a Tabela 26 constata-se que o tratamento combinado com estes dois compostos na linha celular HepG2 conduziu a um efeito sinérgico. De modo similar, para a linha celular TFK-1 a adição de quercetina induziu um decréscimo do valor de IC_{50} da doxorubicina de $15,52 \mu\text{M}$ para $11,08 \mu\text{M}$ (Tabela 25), verificando-se a ocorrência de sinergia (Tabela 26). Para as outras linhas celulares em estudo, o protocolo de combinação induziu um aumento dos valores de IC_{50} da doxorubicina, de um modo estatisticamente significativo ($p < 0,001$) (Tabela 25). De facto, para as linhas celulares HuH7 e Hep3B2.1-7 o tratamento combinado de quercetina com doxorubicina induziu um efeito antagónico (Tabela 26).

Efectuaram-se em simultâneo, para todas as linhas celulares, estudos de combinação de gossipol com doxorubicina. Os resultados do teste do MTT permitiram traçar as curvas dose-resposta correspondentes que estão representadas na Figura 81.

A partir das curvas dose-resposta mostradas na Figura 81 foi possível determinar os valores de IC_{50} e respectivos intervalos de confiança para todas as linhas celulares em estudo, em resposta aos diversos tratamentos testados. Os resultados obtidos assim como os resultados determinados para cada um dos compostos isoladamente estão sumariados na Tabela 27.

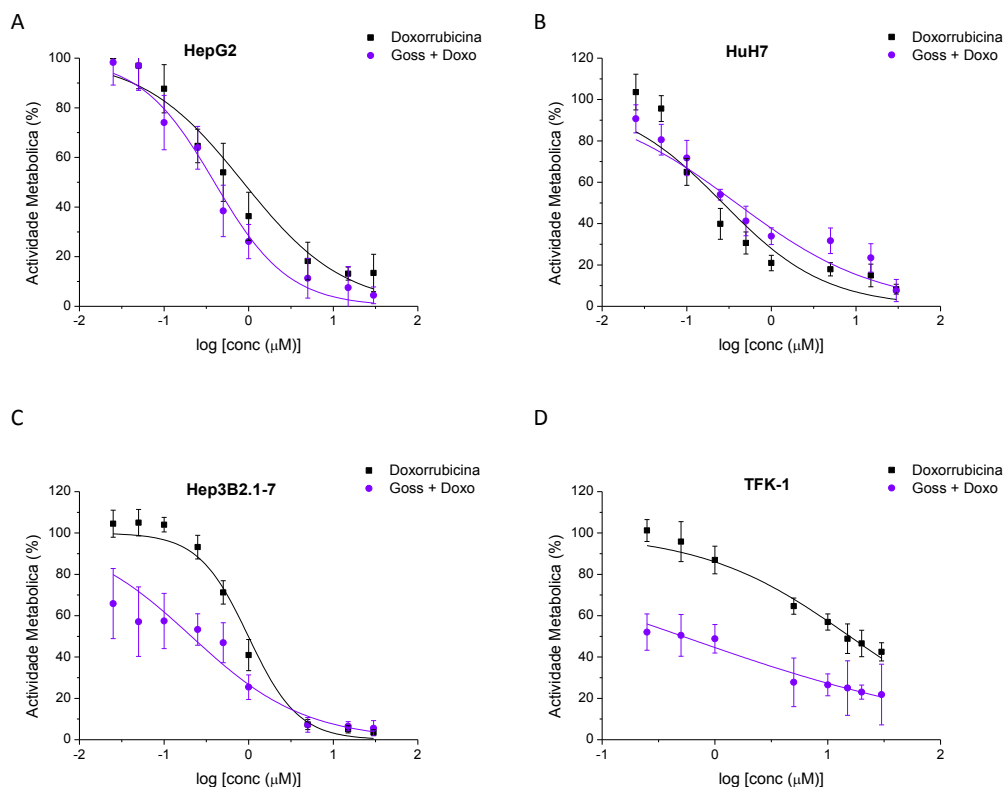


Figura 81: Curvas dose-resposta obtidas para o tratamento combinado de gossipol e doxorubicina nas quatro linhas celulares em estudo. A adição dos dois compostos foi efectuada em simultâneo, e o seu efeito na actividade metabólica avaliado 48 horas depois. Os gráficos representam os resultados obtidos para as linhas celulares HepG2 (A), HuH7 (B), Hep3B2.1-7 (C) e TFK-1 (D). Os resultados expressam a média e o desvio padrão de seis experiências independentes. O r^2 obtido foi sempre igual ou superior a 0,9.

Tabela 27: Valores de IC_{50} e intervalos de confiança obtidos para as linhas celulares HepG2, HuH7, Hep3B2.1-7 e TFK-1, quando tratadas em combinação com gossipol e doxorubicina, assim como para cada um dos compostos isoladamente.

Linha celular	Condição	$IC_{50}(\mu M)$	Intervalo de confiança doxorubicina (μM)
HepG2	Gossipol	2,16	[1,96; 2,37]
	Doxorrubicina	0,68	[0,54; 0,79]
	Goss+ Doxo	0,55 Goss + 0,40 Doxo	[0,34; 0,47]
HuH7	Gossipol	4,24	[4,03; 4,46]
	Doxorrubicina	0,24	[0,21; 0,26]
	Goss+ Doxo	1,06 Goss + 0,39 Doxo	[0,32; 0,47]
Hep3B2.1-7	Gossipol	0,87	[0,72; 1,05]
	Doxorrubicina	0,83	[0,76; 0,86]
	Goss+ Doxo	0,22 Goss + 0,18 Doxo	[0,13; 0,24]
TFK-1	Gossipol	4,36	[3,87; 4,92]
	Doxorrubicina	15,52	[13,48; 17,86]
	Goss+ Doxo	1,09 Goss + 0,54 Doxo	[0,43; 0,66]

Através do método de Chou e Talalay anteriormente mencionado foi possível determinar o índice de combinação para cada tratamento efectuado e para todas as linhas celulares em estudo. Os resultados obtidos estão representados na Tabela 28.

Tabela 28: Índices de combinação dos tratamentos combinados de gossipol com doxorrubicina obtidos para as linhas celulares HepG2, HuH7, Hep3B2.1-7 e TFK-1 pelo método de Chou e Talalay.

Índice de combinação				
	HepG2	HuH7	Hep3B2.1-7	TFK-1
Goss + Doxo	0,70	1,71	0,43	0,28

Ao observar a Tabela 27 verifica-se que no caso das células HepG2 a adição simultânea de gossipol e doxorrubicina induziu uma diminuição no valor do IC₅₀ desta última de uma forma estatisticamente significativa ($p < 0,001$). Nesta linha celular, o tratamento combinado de gossipol com doxorrubicina induziu um efeito sinérgico (Tabela 28). Já no que diz respeito à linha celular HuH7 a terapia combinada originou um aumento no valor de IC₅₀ da doxorrubicina comparativamente ao valor obtido com este fármaco isoladamente, de 0,24 μM para 0,39 μM (Tabela 27). De facto, verificou-se ainda que o tratamento combinado de gossipol com doxorrubicina nesta linha celular produziu um efeito antagónico (Tabela 28). Em oposição ao que se verificou para a linha celular HuH7, no caso da linha celular Hep3B2.1-7 o tratamento combinado de gossipol com doxorrubicina induziu uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,001$) do valor de IC₅₀ da doxorrubicina comparativamente à terapia isolada com este fármaco de 0,83 μM para 0,18 μM tendo-se observado sinergia (Tabela 28). Por fim, para a linha celular TFK-1, aquando da adição simultânea dos dois compostos verificou-se uma diminuição do valor de IC₅₀ da doxorrubicina de 15,52 μM para 0,54 μM , de um modo estatisticamente significativo ($p < 0,001$) (Tabela 27). Também para esta linha celular se observou a ocorrência de sinergia aquando do tratamento combinado com os dois compostos em estudo (Tabela 28).

Terapia génica

Expressão de GLUT-1

Após a realização do protocolo de transfecção celular, com o intuito de inibir a expressão do GLUT-1 na linha celular HuH7, procedeu-se à análise da expressão proteica deste transportador na linha parental e na linha transfectada por western blot. Os resultados obtidos estão representados na Figura 82.

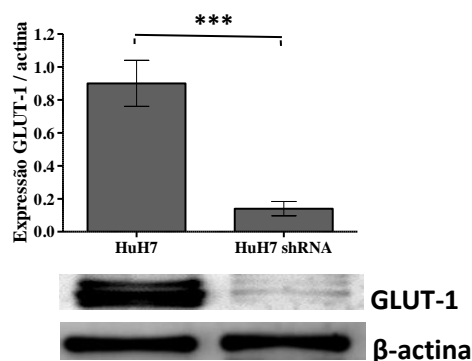


Figura 82: Expressão proteica de GLUT-1 em relação à actina nas linhas celulares HuH7 e HuH7shRNA. Os resultados expressam a média e o desvio padrão de quatro experiências independentes. As diferenças estatisticamente significativas estão representadas com *** que representa $p < 0,001$.

Observando a Figura 82 constata-se que a linha celular transfectada (HuH7shRNA) possui uma expressão proteica de GLUT-1 bastante inferior à linha celular parental (HuH7). Os níveis de expressão de GLUT-1 pelas duas linhas celulares em estudo apresentam diferenças com significado estatístico ($p < 0,001$).

Actividade metabólica

Na Figura 83 está representada a razão entre a actividade metabólica da linha HuH7shRNA e a linha celular parental, HuH7. Essa razão foi avaliada 24, 48, 72 e 96 horas após a distribuição pelas placas das células.

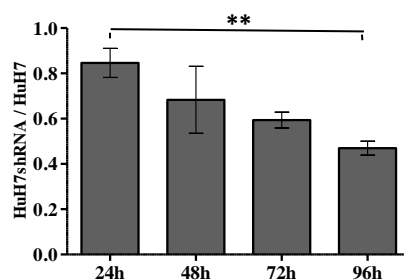


Figura 83: Razão entre a actividade metabólica das linhas celulares HuH7shRNA e HuH7 24, 48, 72 e 96 horas após distribuição pelas placas. Os resultados expressam a média e o desvio padrão de quatro experiências independentes. As diferenças estatisticamente significativas estão representadas por ** que representa $p < 0,01$.

De acordo com os resultados representados na Figura 83 verifica-se que a razão entre a actividade metabólica da linha celular transfectada (HuH7shRNA) e da linha celular HuH7 diminui ao longo do tempo, ocorrendo diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$) entre a razão calculada às 24 horas e a razão calculada às 96 horas. Ao comparar as razões obtidas para os diversos tempos de incubação com o valor de 1 constata-se que ocorrem sempre diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$). Este resultado é indicativo de que a linha celular HuH7shRNA possui, comparativamente à linha celular que lhe deu origem, menor actividade metabólica.

A Figura 84 representa a percentagem de actividade metabólica da linha celular HuH7shRNA quando incubada durante 48 horas com os valores de IC_{50} de cisplatina, de doxorrubicina, de 5-fluorouracilo e de sorafenib obtidos para a linha celular parental.

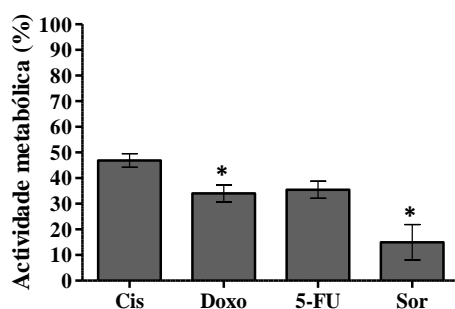


Figura 84: Percentagem de actividade metabólica relativamente ao controlo da linha celular HuH7shRNA quando incubada durante 48 horas com os valores de IC_{50} obtidos na linha celular HuH7 em resposta à incubação com cisplatina, doxorrubicina, 5-fluorouracilo e sorafenib. Os resultados expressam a média e o desvio padrão de três experiências independentes. As diferenças estatisticamente significativas relativamente a 50% estão assinaladas por * que representa $p < 0,05$.

A análise da Figura 84 demonstra que quando a linha celular HuH7shRNA foi incubada com o valor de IC₅₀ de cisplatina obtido para a linha celular HuH7 a percentagem de actividade metabólica permaneceu sensivelmente semelhante a 50%. Por sua vez, ao incubar com os valores de IC₅₀ obtidos para a linha celular HuH7 para os outros fármacos em estudo constatou-se que ocorreu um decréscimo da actividade metabólica relativamente à linha celular mãe, ou seja, a percentagem de actividade metabólica foi inferior a 50%, sendo este efeito mais pronunciado quando se incubou a linha celular transfectada com sorafenib. Comparativamente ao valor de 50%, observaram-se diferenças estatisticamente significativas quando as células foram incubadas com doxorrubicina e com sorafenib ($p < 0,05$).

Viabilidade e morte celular

Após a avaliação do efeito da cisplatina, da doxorrubicina, do 5-fluorouracilo e do sorafenib na actividade metabólica da linha celular HuH7shRNA procedeu-se à análise da viabilidade celular e os tipos de morte celular induzida em resposta ao tratamento com doxorrubicina, 5-fluorouracilo e sorafenib, através da citometria de fluxo com recurso à dupla marcação AV-FITC e IP. Uma vez que a nível da actividade metabólica não se observaram diferenças entre o efeito da cisplatina na linha celular mãe e na linha celular transfectada, optou-se por não se proceder à análise do seu efeito na viabilidade celular e tipos de morte celular induzidos na nova linha celular. Os resultados obtidos com os outros fármacos assim como nas células na condição controlo, estão representados na Figura 85.

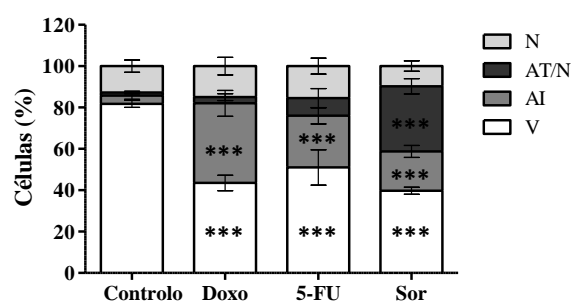


Figura 85: Análise da viabilidade celular das células HuH7shRNA, por citometria de fluxo recorrendo à dupla marcação AV-FITC e IP, após incubação, durante 48 horas, com os valores de IC₅₀ de doxorrubicina, 5-fluorouracilo e sorafenib obtidos para a linha celular HuH7. Os resultados estão representados na forma de percentagem de células viáveis (V), em apoptose inicial (AI), apoptose tardia/necrose (AT/N) e necrose (N). Os resultados expressam a média e o desvio padrão de quatro experiências independentes. As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo estão assinaladas com *** que representa $p < 0,001$.

Através da análise da Figura 85 consegue-se verificar que todos os fármacos em estudo induziram uma diminuição da viabilidade celular de um modo estatisticamente significativo relativamente ao controlo ($p < 0,001$). Quando as células foram incubadas com doxorrubicina e com sorafenib, a viabilidade celular foi inferior a 50%, e no caso do 5-fluorouracilo foi cerca de 50%. Observaram-se ainda diferenças com significado estatístico entre as células viáveis após incubação com 5-fluorouracilo e com sorafenib ($p < 0,05$).

Em relação aos tipos de morte celular induzidos verificou-se que, quando se utilizou doxorrubicina predominou a apoptose inicial, e para os outros fármacos ocorreu um balanço entre os vários tipos de morte celular induzida, com tendência para a apoptose inicial quando se utilizou 5-fluorouracilo, e apoptose tardia/necrose com o sorafenib. No que diz respeito às células em apoptose inicial, para os diversos tratamentos, observou-se significância estatística entre a condição controlo e as células incubadas com doxorrubicina ($p < 0,001$), entre a condição controlo e as células tratadas com 5-fluorouracilo ($p < 0,001$), entre a condição controlo e as células sujeitas ao sorafenib ($p < 0,001$), assim como entre as células incubadas com doxorrubicina e com sorafenib ($p < 0,01$). Também entre as células em apoptose tardia/necrose na condição controlo e em resposta ao tratamento com sorafenib se observaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$).

Capítulo VI

Discussão

Os tumores primitivos do fígado constituem um problema de importância global na medida em que as suas taxas de incidência e de mortalidade têm aumentado abruptamente nas últimas décadas. Actualmente, o carcinoma hepatocelular, a nível mundial, é já o sétimo tipo de cancro mais incidente e constitui a segunda causa de morte por cancro (GLOBOCAN 2012). Em relação ao colangiocarcinoma, a sua taxa de mortalidade têm vindo a aumentar marcadamente nos últimos anos, principalmente nos países ocidentais (Anderson *et al.*, 2004; Blehacz & Gores, 2008; Al-Bahrani *et al.*, 2013). Tanto para o carcinoma hepatocelular, como para o colangiocarcinoma, o número de casos diagnosticados e o número de mortes é muito semelhante, o que se deve em parte ao facto destes serem diagnosticados, na maioria das vezes, em estádios bastante avançados da doença (Ferlay *et al.*, 2010; Venook *et al.*, 2010; Yang & Roberts, 2010; Jemal *et al.*, 2011). O diagnóstico tardio destas entidades nosológicas e as escassas opções terapêuticas disponíveis conferem um mau prognóstico aos doentes com estes tumores. Das opções terapêuticas, apenas a ressecção hepática parcial e a transplantação oferecem hipóteses curativas, no entanto, devido ao estado avançado da doença em que, maioritariamente, os doentes se encontram aquando do diagnóstico, estes não podem usufruir destas opções cirúrgicas, optando-se por outras terapias que normalmente têm carácter meramente paliativo (Wörns *et al.*, 2009; Giglia *et al.*, 2010; Friman, 2011; Gomes *et al.*, 2013). Urge então, investigar novos alvos terapêuticos assim como novas formas de tratamento para os tumores primitivos do fígado.

O transportador de glicose 1 tem sido apontado como um alvo terapêutico numa ampla variedade de tumores, incluindo o carcinoma hepatocelular. Amman e colaboradores demonstraram que, suprimindo a expressão deste transportador com recurso a siRNA, se consegue reduzir a tumorigénese de linhas celulares de carcinoma hepatocelular (Amann & Hellerbrand, 2009; Amann *et al.*, 2009; Young *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013). Surge então a questão: será o GLUT-1 um alvo terapêutico promissor para os tumores primários do fígado?

Neste sentido, ao longo deste trabalho experimental, procurou-se clarificar qual o papel que os transportadores de glicose, e mais especificamente o GLUT-1, poderão ter na progressão destas doenças, mas também no auxílio do seu diagnóstico. Assim, procuraram-se estabelecer paralelismos entre a expressão deste transportador e a captação de ^{18}F -FDG e também correlacionar a captação deste radiofármaco com o processo de resistência multifármacos. Efectuaram-se diversas abordagens terapêuticas que vão desde a inibição competitiva do GLUT-1 à sua inibição genética, passando pelo estabelecimento de tratamentos combinados entre os inibidores competitivos e fármacos comumente utilizados

no tratamento destas neoplasias.

Tendo em conta a diversidade de resultados obtidos ao longo deste trabalho experimental, a discussão está dividida em subcapítulos, correlacionando-se, sempre que possível, a informação contida em cada um deles.

Caracterização das linhas celulares

As mutações no gene *TP53* e na proteína por ele codificada a P53 são uma característica comum em muitos tumores incluindo os tumores primários do fígado (Fabregat, 2009; Alves *et al.*, 2011). Por sua vez, as mutações no referido gene e consequente expressão anormal da P53 conduzem a fenótipos mais agressivos e estão também muitas vezes associadas à resistência à quimioterapia (Ferreira *et al.*, 1999; Fabregat, 2009). Através da análise imunocitoquímica e também através da utilização da técnica de *western blot*, confirmou-se o perfil de expressão das linhas celulares utilizadas (Figuras 14 e 55 e Tabela 6), ou seja, verificou-se tal como descrito na literatura que a linha celular HuH7 possui níveis aumentados desta proteína, a linha celular HepG2 tem uma expressão normal desta proteína, enquanto que as linhas celulares Hep3B2.1-7 e TFK-1 não expressam a P53 (Jia *et al.*, 1997; Kaino, 1997).

Embora a P53 seja uma proteína importante em oncologia, pois fornece informação relevante acerca de cada tumor, assumindo papel de destaque no caso dos tumores primários do fígado, outros biomarcadores assumem um papel de bastante relevância, como a CK19. Assim, a utilização da CK19, a nível dos tumores primários do fígado tem vindo a ser defendida como método de distinção entre carcinoma hepatocelular e colangiocarcinoma, podendo ser utilizada também como factor de prognóstico para o carcinoma hepatocelular (Jain *et al.*, 2010). Em concordância com este facto, a linha celular TFK-1 apresentou uma expressão citoplasmática de CK19 focal e fraca, enquanto que as linhas celulares de carcinoma hepatocelular apresentaram uma expressão forte (Tabela 6 e Figura 15). Em concordância com os nossos resultados, já em 2007, Zen e colaboradores haviam descrito que as linhas celulares HepG2 e HuH7 expressavam CK19 (Zen *et al.*, 2007).

No que diz respeito ao carcinoma hepatocelular, a presença de AFP sérica é considerada como o principal indício de doença, já no que diz respeito ao colangiocarcinoma, a AFP não é normalmente utilizada enquanto marcador tumoral, embora existam casos isolados onde se observou uma forte expressão da

mesma (El-Serag & Rudolph, 2007; Vij & Wang, 2008). Tal como seria de esperar, as células TFK-1 não expressaram AFP. No entanto, curiosamente, de entre as três linhas celulares de carcinoma hepatocelular estudadas, apenas as HepG2 expressaram este biomarcador (Tabela 6 e Figura 16), o que vem reforçar a teoria defendida por muitos autores de que a sua utilização possui uma baixa especificidade (El-Serag & Rudolph, 2007).

A utilização da KI67 enquanto indicador de proliferação celular tem vindo a ser amplamente utilizada em oncobiologia, transmitindo informação relevante no que diz respeito ao prognóstico (Scholzen & Gerdes, 2000). Os nossos resultados demonstraram que, com excepção da linha celular Hep3B2.1-7, todas as outras linhas celulares em estudo expressam fortemente KI67 (Tabela 6 e Figura 17), o que se traduz num alto índice proliferativo.

Uma das componentes principais deste trabalho experimental foi a avaliação da expressão do transportador de glicose 1 nas linhas celulares em estudo, tentando correlacioná-la com a captação de ^{18}F -FDG. No entanto, o GLUT-1 não é o único responsável pela captação de ^{18}F -FDG pelas células, nomeadamente pelas células tumorais. Neste sentido, o GLUT-3 também tem sido alvo de um estudo intensivo e, mais recentemente, o GLUT-5 e o GLUT-12 têm também sido indicados como possíveis mediadores do transporte de ^{18}F -FDG por células tumorais, nomeadamente nos cancros da mama e do cólon (Jadvar *et al.*, 2009; Brito *et al.*, 2014). Para além disso, neste trabalho é de ter em conta a expressão de GLUT-2, por ser descrito como um transportador de glicose expresso pelas células do fígado, assim como em tumores primitivos deste órgão (Paudyal *et al.*, 2008). Deste modo, neste trabalho analisaram-se os perfis de captação de ^{18}F -FDG por todas as linhas celulares em estudo, assim como a expressão dos transportadores de glicose -1, -2, -3, -5 e -12. Avaliou-se também a influência da concentração de glicose no meio de cultura na captação de ^{18}F -FDG e na expressão dos GLUTs analisados. Assim, as células das várias linhas celulares foram cultivadas em dois meios de cultura que diferiram na concentração de glicose, um meio com elevado teor de glicose (25 mM) que é o aconselhado pelo fornecedor para a cultura celular, e um meio com baixo teor de glicose (5 mM) que mimetiza a glicemia humana.

Para todas as linhas celulares em estudo, os nossos resultados demonstraram que a percentagem de captação de ^{18}F -FDG é dependente da concentração de glicose no meio de cultura (Figura 24 e Tabela 7). Assim, observou-se que, para todas as linhas celulares em estudo, as células captaram mais ^{18}F -FDG quando cresceram em meio de cultura com baixo teor de glicose como resposta às necessidades energéticas das células, captando deste modo mais radiofármaco com vista a suprir as suas necessidades glicolíticas. Quando as

células foram propagadas em meio de cultura com elevado teor de glicose as células, captaram menos ^{18}F -FDG, pois não se encontram ávidas de glicose. Estes resultados vão de encontro àquilo que se observa na prática clínica, onde as concentrações plasmáticas de glicose afectam o valor diagnóstico da PET com recurso ao ^{18}F -FDG (Rabkin *et al.*, 2010).

Relativamente às linhas celulares de carcinoma hepatocelular, para ambas as concentrações de glicose no meio de cultura utilizadas, a linha celular Hep3B2.1-7 que não expressa P53, tal como foi comprovado pela análise imunocitoquímica (Figura 14) e por *western blot* (Figura 55), foi aquela que mais captou ^{18}F -FDG e, por sua vez, a linha celular HepG2 que expressa a forma normal desta proteína foi aquela que menos captou o referido radiofármaco (Figura 24B e Tabela 7). De facto, existem evidências na literatura que indicam que a expressão de P53 pode influenciar a captação de ^{18}F -FDG. Assim, tal como descrito na literatura, também no nosso estudo, as células que não expressam P53, o que lhes confere um mau prognóstico, são aquelas que mais captam ^{18}F -FDG (Smith, 2010; Groheux *et al.*, 2011). Existem algumas explicações para o facto de células que não expressam P53, ou expressam uma forma não funcional desta proteína, possuírem uma taxa de captação de ^{18}F -FDG mais elevada. Alguns estudos indicam que as mutações na proteína P53 diminuem o efeito supressor que esta proteína tem sobre os genes que codificam o GLUT-1 e o GLUT-4 (Schwartzenberg-bar-yoseph *et al.*, 2004; Liang *et al.*, 2013). Para além disso, a perda de expressão do regulador da apoptose e da glicólise estimulado pela P53 (TIGAR, do inglês *TP53 – induced glycolysis and apoptosis regulator*) nos tumores onde a P53 não é funcional também pode estar correlacionada com as elevadas taxas de captação de ^{18}F -FDG (Bensaad *et al.*, 2006; Liang *et al.*, 2013). Em suma, a supressão da P53 parece estar associada às alterações no metabolismo da glicose detectadas pela PET. De facto, na prática clínica elevadas taxas de captação de ^{18}F -FDG através desta modalidade imagiológica são já consideradas como factor de mau prognóstico (Smith *et al.*, 2006; Riedl *et al.*, 2007; Zhen-Jiang *et al.*, 2007).

No que diz respeito à expressão dos GLUTs analisados, constata-se que existem diferenças entre todas as linhas celulares de carcinoma hepatocelular estudadas (Figuras 18, 19 e 20). Curiosamente, quase nunca se observam diferenças estatisticamente significativas entre a expressão de cada um dos GLUTs, quer na componente membranar, quer na componente citoplasmática, pelas células que cresceram em meio de cultura com elevada concentração de glicose e nas mesmas células quando cultivadas em meio de cultura com baixa concentração de glicose (Figuras 18, 19 e 20). Este resultado indica que a concentração de glicose do meio de cultura, na maioria dos casos, não influencia a expressão dos

GLUTs. Estes resultados estão de acordo com um estudo prévio onde a concentração de glicose também não afectou significativamente a expressão de GLUT-1 e GLUT-3 em tecidos tumorais (Zhao *et al.*, 2002).

Verificou-se também que os GLUTs mais expressos na membrana nem sempre são aqueles que estão mais presentes no citoplasma. De facto, alguns GLUTs são pouco expressos na membrana mas, no entanto, têm níveis de expressão bastante aumentados no citoplasma. São exemplos os transportadores de glicose -1 e -3 na linha celular HepG2 (Figura 18). Estes transportadores poderão funcionar enquanto reserva, podendo ser recrutados do citoplasma para a membrana celular em resposta a um qualquer estímulo. Para além disso, no que diz respeito ao GLUT-1, outros autores sugeriram, noutros tipos de cancro, tais como no carcinoma da próstata, no linfoma e no melanoma, que a expressão citoplasmática deste transportador é um importante factor de prognóstico (Jans *et al.*, 2010; Carvalho *et al.*, 2011). Outros autores afirmaram ainda que os GLUTs expressos no citoplasma poderão mediar o transporte de glicose entre a membrana celular e o retículo endoplasmático (Takanaga & Frommer, 2010; Carvalho *et al.*, 2011).

Relativamente à expressão membranar dos GLUTs analisados constatou-se que o GLUT-3 é aquele que está mais expresso na linha celular Hep3B2.1-7 (Figura 20), o que poderá estar correlacionado com o facto desta linha celular ser aquela que mais capta ^{18}F -FDG. Os níveis de expressão membranar do GLUT-12 são bastante expressivos para todas as linhas celulares em estudo, o que está de acordo com os resultados publicados por outros autores que indicam que este transportador possui um papel activo no transporte deste radiofármaco noutros tipos de tumores (Schoder & Larson, 2004; Buerkle & Weber, 2008; Jadvar *et al.*, 2009; Minamimoto *et al.*, 2011). Deste modo, os nossos resultados indicam que também nas células de carcinoma hepatocelular, o GLUT-12 poderá ter um papel bastante activo no transporte de ^{18}F -FDG e, por consequência, de glicose. Embora o GLUT-2 seja referenciado como um transportador de glicose bastante expresso por células do fígado, quer normais quer tumorais (Paudyal *et al.*, 2008), o nosso estudo revelou que este transportador poderá não ter um papel primordial na captação de ^{18}F -FDG nas linhas celulares de carcinoma hepatocelular referidas, uma vez que os seus níveis de expressão foram pouco relevantes (Figuras 18, 19 e 20).

Embora o GLUT-1 seja consideravelmente expresso pela linha celular HuH7 e o GLUT-3 pela linha celular Hep3B2.1-7, tendo em conta os elevados índices de expressão de GLUT-12, os nossos resultados indicam que estes transportadores poderão não ser os únicos responsáveis pela captação de ^{18}F -FDG pelas células

tumorais e, mais precisamente, pelas células de carcinoma hepatocelular (Figuras 18, 19 e 20). Para além disso, os resultados por nós obtidos indicam que a PET, com recurso ao ^{18}F -FDG, poderá ser utilizada como método complementar de diagnóstico, uma vez que nos fornece alguma informação acerca do perfil genético do tumor, o que poderá auxiliar na escolha de uma terapêutica mais adequada.

Relativamente à linha celular de colangiocarcinoma, os nossos resultados revelaram, à semelhança do ocorrido para as linhas celulares de carcinoma hepatocelular, elevados níveis de expressão, tanto citoplasmática como membranar de GLUT-12 (Figura 21). A nível do citoplasma a expressão de GLUT-1 foi bastante semelhante à de GLUT-12, e também a nível membranar, após o GLUT-12, a isoforma mais expressa foi o GLUT-1. A informação bibliográfica acerca da expressão dos transportadores de glicose nos colangiócitos e no colangiocarcinoma é escassa. Existem apenas alguns autores que referem que os colangiócitos expressam GLUT-1, e que o colangiocarcinoma também, sendo referido até que este último expressa este transportador em maior proporção do que o carcinoma hepatocelular (Lee *et al.*, 2005; Karim *et al.*, 2012). De facto os nossos resultados demonstraram que as células TFK-1 expressam mais GLUT-1 do que as linhas celulares HepG2 e Hep3B2.1-7, mas menos que as HuH7. No entanto, o mais relevante é o facto de se ter observado uma expressão aumentada de GLUT-12, facto nunca antes mencionado.

No que diz respeito ao colangiocarcinoma, a PET-CT com recurso ao ^{18}F -FDG tem sido descrita como uma modalidade imagiológica bastante sensível no diagnóstico e no estadiamento desta neoplasia, fornecendo em simultâneo informação anatómica e funcional (Sharma *et al.*, 2013). De facto, a linha celular TFK-1 captou ^{18}F -FDG de uma forma bastante notória, pois quando as células foram incubadas com meio com elevada concentração de glicose, estas células captaram o referido radiofármaco numa percentagem semelhante à das células Hep3B2.1-7 (Figura 24D). Este dado reforça o papel que o GLUT-12 poderá ter na captação de ^{18}F -FDG pelas células de colangiocarcinoma, o que já havia sido demonstrada em diversos tipos de outros tumores (Schoder & Larson, 2004; Buerkle & Weber, 2008; Jadvar *et al.*, 2009; Minamimoto *et al.*, 2011;). Adicionalmente, os nossos resultados também comprovaram (Figuras 14 e 55) que esta linha celular não expressa P53 (Saijo *et al.*, 1995; Jia *et al.*, 1997; Tanno *et al.*, 2004), o que, como já foi referido é factor preditivo para elevadas taxas de captação deste radiofármaco (Smith, 2010; Groheux *et al.*, 2011).

À semelhança do que havia sido observado para as linhas celulares de carcinoma hepatocelular, também as células TFK-1 captaram mais ^{18}F -FDG quando cultivadas em meio de cultura com baixa concentração de glicose, porém, a

concentração de glicose no meio de cultura não influenciou significativamente os níveis de expressão dos GLUTs analisados (Figuras 21, 24D e Tabela 7).

A capacidade das células tumorais se tornarem resistentes a diversos tipos de fármacos utilizados em quimioterapia está correlacionada com diferentes mecanismos, possuindo especial importância a presença de bombas de efluxo (proteínas transportadoras que extrusam os fármacos) que impedem a sua actuação (Gottesman *et al.*, 2002; Brito *et al.*, 2014). Nos últimos tempos, alguns autores têm defendido que a captação de ^{18}F -FDG pelas células tumorais, incluindo células de carcinoma hepatocelular, está inversamente relacionada com os níveis de expressão de PGP, sugerindo que este radiofármaco pode ser substrato das proteínas MDR, e que estas proteínas podem estar a extrusar o ^{18}F -FDG, o que reduz a sua acumulação no interior da célula (Yamada *et al.*, 2005; Seo *et al.*, 2007, 2009; Brito *et al.*, 2014).

Deste modo, com o intuito de verificar a influência da expressão das bombas de efluxo na acumulação de ^{18}F -FDG nas linhas celulares em estudo, efectuaram-se estudos de retenção deste radiofármaco, tendo-se analisado também os níveis de expressão das proteínas ABC, PGP e MRP1, assim como da proteína *Vault*, a LRP.

Relativamente às linhas celulares de carcinoma hepatocelular, os resultados obtidos através dos estudos de retenção de ^{18}F -FDG vão de encontro aos alcançados através dos estudos de captação. Ou seja, todas as linhas celulares retiveram mais ^{18}F -FDG quando cultivadas em meio de cultura com baixa concentração de glicose (Figura 25 e Tabela 8). Ora, a captação e a retenção são processos que ocorrem em simultâneo, e tendo em conta que concentrações inferiores de glicose, levam a que as células se encontrem ávidas deste nutriente e, conseqüentemente, captem mais ^{18}F -FDG. Assim, e de acordo com o exposto, as referidas linhas celulares também irão reter mais o radiofármaco em causa.

Também em concordância com os estudos de captação, verificou-se que a linha celular Hep3B2.1-7 foi aquela que mais reteve o radiofármaco em questão (Figura 25C e Tabela 8), e a linha celular HepG2 aquela que menos reteve (Figura 25A e Tabela 8). Analisando a expressão das proteínas MDR constata-se que de entre as linhas celulares de carcinoma hepatocelular, as células Hep3B2.1-7 são aquelas que menos expressam PGP (Figura 22), o que poderá justificar as elevadas taxas de retenção de ^{18}F -FDG, uma vez que a relação inversa entre a expressão desta proteína e a retenção de ^{18}F -FDG já está amplamente descrita na literatura (Seo *et al.*, 2007, 2009; Brito *et al.*, 2014). Por outro lado, é importante referir novamente que os processos de captação e de retenção ocorrem em simultâneo e, deste modo, o facto de a linha celular Hep3B2.1-7 ser aquela que mais capta ^{18}F -FDG também contribui para as elevadas taxas de retenção do radiofármaco.

Tendo em conta que a linha celular HepG2 é aquela que menos retém ^{18}F -FDG (Figura 25A e Tabela 8), seria de esperar que esta fosse a linha celular que mais expressasse PGP, no entanto, isso não se verifica. Apesar disso, esta é a linha celular de carcinoma hepatocelular que mais expressa MRP1, apresentando este resultado diferenças estatisticamente significativas (Figura 22). Porém, apesar da extrusão de ^{18}F -FDG pela MRP1 ser um mecanismo menos explorado, existe já um trabalho realizado em 2005 que indica que este radiofármaco pode ser substrato desta proteína (Yamada *et al.*, 2005). Também nas células HepG2, o ^{18}F -FDG poderá estar a ser extrusado pela MRP1. No entanto há ainda que ter em conta que esta é a linha celular que menos capta o referido radiofármaco, o que também poderá estar relacionado com a baixa taxa de retenção de ^{18}F -FDG. Relativamente à expressão de LRP (Figura 23), não se observaram diferenças significativas entre as linhas celulares de carcinoma hepatocelular estudadas, o que nos leva a postular a hipótese de, neste tipo de cancro, a LRP não estar envolvida no efluxo de ^{18}F -FDG.

No que diz respeito ao colangiocarcinoma, a expressão de proteínas MDR está bastante menos explorada do que no carcinoma hepatocelular. Sabe-se porém, que a maioria dos casos de colangiocarcinoma sobreexpressam PGP o que, consequentemente, induz quimiorresistência (Itsubo *et al.*, 1994; Seo *et al.*, 2008). Também em 2005, Tepsiri e colaboradores avaliaram, em cinco linhas celulares de colangiocarcinoma, a expressão de vários genes relacionados com a MDR, tendo verificado que todas elas expressavam MRP1 (Tepsiri *et al.*, 2005). Já relativamente à expressão de LRP no colangiocarcinoma, até à data, nada se sabe. De acordo com os resultados obtidos verificou-se que, à semelhança do que havia ocorrido com as linhas celulares de carcinoma hepatocelular, também as células TFK-1 retiveram mais ^{18}F -FDG quando incubadas em meio de cultura com baixa concentração de glicose (Figura 25D e Tabela 8). Porém, as diferenças entre a retenção das células incubadas em meio com baixa concentração de glicose e das células incubadas com meio de cultura com elevada concentração de glicose, não foi tão notória como nas linhas celulares de carcinoma hepatocelular. Assim, quando cresceram em meio de cultura com concentração de glicose diminuída, as células TFK-1 foram aquelas que menos retiveram ^{18}F -FDG (Figura 25 e Tabela 8). Tal ocorrência poderá estar intimamente relacionada com o facto de ser também nesta linha celular que o decréscimo na concentração de glicose no meio de cultura introduziu menos diferenças na captação de ^{18}F -FDG (Figura 24 e Tabela 7). Embora esta linha celular expresse menos PGP do que as linhas celulares de carcinoma hepatocelular, ela expressa MRP1 em níveis semelhantes às células HepG2 (Figura 22), podendo esta proteína MDR estar envolvida na extrusão deste radiofármaco também nas células de colangiocarcinoma, à semelhança do que

havia sido observado por Yamada e colaboradores num outro tipo de cancro (Yamada *et al.*, 2005). Curioso é o facto de as células TFK-1 expressarem LRP de uma forma bastante mais evidente do que qualquer uma das linhas celulares de carcinoma hepatocelular estudadas (Figura 23), o que leva a postular a hipótese de que, nesta linha celular, a LRP estar envolvida na extrusão de ^{18}F -FDG.

Uma vez que o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI é, por eleição, o radiofármaco utilizado no estudo da resistência multifármacos (Casalta-Lopes *et al.*, 2011; Brito *et al.*, 2014), efectuaram-se também estudos de captação e de retenção deste radiofármaco em todas as linhas celulares. O transporte do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI para o interior celular ocorre de uma forma bastante distinta do transporte de ^{18}F -FDG. A captação de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI ocorre por difusão passiva devido ao potencial electroquímico transmembranar, ocorrendo acumulação do radiofármaco na mitocôndria (Piwnica-Worms *et al.*, 1990; Casalta-Lopes *et al.*, 2011). O $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI é catiónico e lipofílico, características comuns de vários substratos de bombas de efluxo, tais como a PGP. Neste sentido, no que respeita à PGP, tal como acontece com os fármacos antineoplásicos, o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI ao ser captado pelas células tumorais interage com os domínios de ligação do transportador e é bombardeado para o meio extracelular (Piwnica-Worms *et al.*, 1993; Casalta-Lopes *et al.*, 2011). Apesar da PGP e a MRP1 possuírem apenas 15% de homologia na sequência de aminoácidos, sabe-se que estas proteínas transportam um espectro semelhante de substratos, sendo o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI um deles (Piwnica-Worms *et al.*, 1993; Hendrikse *et al.*, 1998; Kruh & Belinsky, 2003).

Relativamente aos resultados obtidos, à semelhança do que se observou para o ^{18}F -FDG, relativamente às linhas celulares de carcinoma hepatocelular, também a captação e a retenção de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI foi mais notória pela linha celular Hep3B2.1-7, para ambas as concentrações de glicose no meio de cultura (Figuras 26 e 27 e Tabelas 9 e 10).

Relativamente às outras duas linhas celulares de carcinoma hepatocelular, as células HuH7 captaram mais $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI do que as HepG2 quando foram cultivadas em meio de cultura com baixa concentração de glicose, no entanto, quando cresceram em meio com elevada concentração de glicose, as células HepG2 captaram mais o referido radiofármaco, embora sem diferenças estatisticamente significativas relativamente às células HuH7 (Figura 26 e Tabela 9). Já no que diz respeito à retenção de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI, quando as células cresceram em meio de cultura com baixa concentração de glicose, as células HepG2 retiveram mais o referido radiofármaco do que as células HuH7, verificando-se o inverso quando as células cresceram em meio de cultura com elevada concentração de glicose (Figura 27 e Tabela 10). No entanto, para as células HepG2 e HuH7 os perfis de retenção de

^{99m}Tc -MIBI foram muito semelhantes, não se tendo observado diferenças entre os valores de retenção mínima determinados para estas linhas celulares para ambas as formulações de meio de cultura utilizadas.

Sendo a linha celular Hep3B2.1-7 aquela que mais capta ^{99m}Tc -MIBI, poderá correlacionar-se esse resultado com o facto de ser também esta linha celular aquela que mais retém o referido radiofármaco, uma vez que, como mencionado anteriormente, é sabido que a captação e o efluxo ocorrem em simultâneo. Por outro lado, tanto a linha celular HepG2 como a linha celular HuH7 expressam mais PGP do que as células Hep3B2.1-7 e, para além disso, as células HepG2 também expressam mais MRP1 do que as outras duas linhas celulares de carcinoma hepatocelular estudadas (Figura 22). Ora, é sabido, e já foi referido, que o ^{99m}Tc -MIBI é substrato tanto da PGP como da MRP1, e a sua diminuta expressão pela linha celular Hep3B2.1-7 quando comparada com as outras linhas celulares de carcinoma hepatocelular em estudo podem explicar, pelo menos em parte, as maiores taxas de retenção de ^{99m}Tc -MIBI pelas células Hep3B2.1-7 (Piwnicaworms *et al.*, 1993; Hendrikse *et al.*, 1998; Kruh & Belinsky, 2003; Casalta-Lopes *et al.*, 2011).

De notar que, no que diz respeito às linhas celulares de carcinoma hepatocelular estudadas, existe um certo paralelismo entre a captação e a retenção de ^{18}F -FDG e de ^{99m}Tc -MIBI, podendo estes resultados reforçar, pelo menos em parte, a hipótese de que o ^{18}F -FDG é substrato para as proteínas MDR, PGP e MRP1 (Seo *et al.*, 2007, 2009; Brito *et al.*, 2014).

Já em relação à linha celular de colangiocarcinoma, a captação e a retenção de ^{99m}Tc -MIBI foram semelhantes às obtidas com a linha celular HuH7, para ambas as concentrações de glicose no meio de cultura utilizadas (Figuras 26 e 27 e Tabelas 9 e 10). Deste modo, e uma vez que a linha celular de colangiocarcinoma possui uma expressão de LRP bastante aumentada relativamente às linhas celulares de carcinoma hepatocelular (Figura 23), estes resultados indicam que a referida proteína *vault*, nas linhas celulares estudadas, não deverá estar envolvida na extrusão de ^{99m}Tc -MIBI.

Um resultado curioso é o facto de, de um modo geral, todas as linhas celulares em estudo captarem e reterem mais ^{99m}Tc -MIBI quando cultivadas em meio de cultura com baixo teor de glicose. Na literatura, nada indica que a captação e a retenção deste radiofármaco estejam correlacionadas com o mecanismo glicolítico. Apesar disso algumas correlações com outros estudos já publicados poderão ser efectuadas. Num estudo efectuado em miócitos de galinha, Piwnicaworms e colaboradores constataram que a entrada de ^{99m}Tc -MIBI na célula depende do metabolismo da mitocôndria e do potencial negativo da sua membrana

interna, bem como dos potenciais da membrana plasmática (Piwnica-Worms *et al.*, 1990; Piwnica-Worms *et al.*, 1993). Ora, é amplamente sabido que na grande maioria das células tumorais o metabolismo mitocondrial está comprometido dando lugar ao elevado metabolismo glicolítico (Jezek *et al.*, 2010). Assim, poderá ser possível que havendo privação de glicose, as células tumorais recorrem a mecanismos energéticos que para elas são alternativos, ou seja à mitocôndria, o que poderá explicar as elevadas taxas de captação e retenção de $^{99m}\text{Tc-MIBI}$. Para além disso, num estudo realizado em células HeLa demonstrou-se que concentrações elevadas de glicose induzem a repolarização da membrana mitocondrial (Huber *et al.*, 2011), o que também poderá estar a ocorrer nas linhas celulares utilizadas neste trabalho, comprometendo a entrada de $^{99m}\text{Tc-MIBI}$. Contudo, o mecanismo adjacente à elevada captação e retenção de $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ em condições de baixa glicemia, necessita de ser alvo de um estudo intensivo.

A inibição farmacológica dos transportadores MDR é ainda a principal estratégia para superar esta ocorrência. Neste âmbito, os fármacos mais amplamente utilizados são substratos destes transportadores, modulando a sua actividade através de uma inibição competitiva, ou através da indução de alterações conformacionais nestas proteínas, o que impede o reconhecimento do substrato, ou a hidrólise do ATP (Casalta-Lopes *et al.*, 2011; Brito *et al.*, 2014). O verapamil, um bloqueador dos canais de cálcio do tipo L, e um modulador MDR de primeira geração, é capaz de modular a actividade da PGP e da MRP1 (Minderman *et al.*, 2004; Lee, 2010; Casalta-Lopes *et al.*, 2011). Deste modo, procederam-se a estudos de retenção com ambos os radiofármacos, o $^{18}\text{F-FDG}$ e o $^{99m}\text{Tc-MIBI}$, em células previamente incubadas com verapamil, de modo a reafirmar o possível papel que as bombas de efluxo PGP e MRP1 possam ter na sua extrusão nas linhas celulares em estudo. Através da análise dos resultados obtidos pelos estudos de retenção em células incubadas com verapamil, verificou-se que, para todas as linhas celulares e para ambas as concentrações de glicose no meio de cultura, ocorreu um aumento do valor de retenção mínima, isto para ambos os radiofármacos em estudo (Tabelas 11 e 12). Em suma, este resultado indica que a incubação com verapamil conduziu a um aumento da percentagem de radiofármaco retido. Este resultado corrobora os anteriormente descritos e indica que ambos os radiofármacos são substratos da PGP e/ou da MRP1, o que mais uma vez, reforça a possibilidade do $^{18}\text{F-FDG}$ ser utilizado no estudo da resistência multifármacos no carcinoma hepatocelular e no colangiocarcinoma, tal como tem vindo a ser defendido por vários autores (Yamada *et al.*, 2005; Seo *et al.*, 2007, 2008).

Efeito da quimioterapia

Tendo em conta todas as alterações moleculares e genéticas anteriormente descritas, algumas delas identificadas nas linhas celulares em estudo, sabe-se que os tumores primários do fígado são classificados como sendo altamente quimiorresistentes, o que na maioria das vezes está associado à elevada resistência à apoptose (Johnson, 2000; Briggs *et al.*, 2009; Brito *et al.*, 2012).

Relativamente ao carcinoma hepatocelular, em termos de quimioterapia quando utilizada é normalmente apenas em termos paliativos, sendo a doxorrubicina, a cisplatina e o 5-fluorouracilo fármacos de eleição, embora com resultados decepcionantes (Johnson, 2000; Brito *et al.*, 2012). Mais recentemente, tem sido prática comum a utilização de uma terapia dirigida, nomeadamente o sorafenib, um inibidor multikinase de dupla acção no tratamento de estadios intermédios e avançados deste tipo de tumor, embora apenas se verifique o aumento de alguns meses na sobrevida global (Lencioni *et al.*, 2010; Villanueva, 2011).

No que diz respeito ao colangiocarcinoma, também aqui a quimioterapia é utilizada em termos paliativos, sendo o fármaco mais comumente utilizado o 5-fluorouracilo quer isoladamente, quer em combinação com outros fármacos tais como a cisplatina e a doxorrubicina (Anderson *et al.*, 2004; Blechacz & Gores, 2008). Já em relação ao sorafenib, ele não é utilizado na prática clínica, no tratamento de colangiocarcinoma, contudo algumas evidências apontam para um potencial papel promissor deste fármaco no tratamento desta neoplasia (Blechacz & Gores, 2008; Noel & Hezel, 2013).

Tendo em conta estes factos, neste trabalho experimental objectivou-se avaliar, *in vitro*, a eficácia terapêutica dos fármacos acima mencionados em todas as linhas celulares em estudo.

Analisando os resultados obtidos para as linhas celulares de carcinoma hepatocelular constata-se que todas elas são sensíveis à cisplatina, à doxorrubicina e ao sorafenib (Tabelas 13, 14 e 16), apresentando uma sensibilidade acrescida à doxorrubicina. Por outro lado, as linhas celulares de carcinoma hepatocelular apresentaram alguma resistência ao 5-fluorouracilo (Tabela 15). Apesar disso, para todas as linhas celulares de carcinoma hepatocelular em estudo, e todos os fármacos referenciados, verificou-se que a sensibilidade celular é dependente da concentração de fármaco testada e do tempo de incubação.

Para longos tempos de incubação, a linha celular de carcinoma hepatocelular mais sensível à cisplatina foi a HuH7 (Tabela 13). A mesma linha celular foi também bastante sensível ao tratamento com doxorrubicina (Tabela 14).

De facto, esta linha celular possui uma mutação no gene *TP53* que conduz a uma sobreexpressão da proteína correspondente (Kaino, 1997). A sobreexpressão desta proteína supressora tumoral pode ser responsável por um maior reconhecimento da lesão celular induzida pelos fármacos, conduzindo, conseqüentemente, a uma maior citotoxicidade. Contudo, há que ter algumas reservas no que diz respeito à acção de formas mutadas de P53. De facto, cada vez mais lhe tem sido atribuído um papel dual sendo que, dependendo da mutação, tanto a célula se pode tornar mais sensível às terapias como mais resistente. Para além disso, uma sobreexpressão desta proteína não significa que ela esteja activa e funcional, pois pode ocorrer uma expressão aberrante da mesma (Cadwell & Zambetti, 2001; Soussi & Lozano, 2005; Brito *et al.*, 2012). Por outro lado, já em 2002 Lee e colaboradores haviam testado o efeito da doxorrubicina nas linhas celulares HepG2, HuH7 e Hep3B2.1-7, tendo verificado também que as células HuH7 foram aquelas que apresentaram maior sensibilidade ao referido fármaco. Segundo os autores, ao contrário do que ocorreu para as outras linhas celulares, nas células HuH7 a doxorrubicina não foi capaz de induzir bloqueios nem na fase G1, nem na fase G2 do ciclo celular, o que lhe confere uma maior sensibilidade ao referido fármaco. Em contraste, o bloqueio do ciclo celular na fase G1 observado nas células HepG2 confere à célula o tempo suficiente para activar os mecanismos de reparação celular conferindo por consequência, uma maior resistência celular (Lee *et al.*, 2002).

No que diz respeito ao 5-fluorouracilo, de um modo geral, pode-se concluir que, com a excepção das células HepG2 para os longos tempos de incubação, as linhas celulares de carcinoma hepatocelular em estudo não são sensíveis a este fármaco (Tabela 15). A maior sensibilidade apresentada pelas células HepG2 poderá ser explicada, em parte, pelo facto de esta linha celular expressar uma proteína P53 normal o que poderá conduzir a um correcto reconhecimento do dano que o 5-fluorouracilo causa a nível do ADN (Kaino, 1997). De notar que os resultados decepcionantes que se observaram através da avaliação da citotoxicidade do 5-fluorouracilo nas linhas celulares de carcinoma hepatocelular estudadas poderão estar também correlacionados com os resultados controversos que a utilização deste fármaco tem apresentado na clínica (Longley *et al.*, 2003; Coriat *et al.*, 2012).

Curiosamente, no que diz respeito à avaliação do efeito citotóxico do sorafenib, constatou-se que a linha celular que apresentou maior resistência a este fármaco foi a HuH7 (Tabela 16). Mais uma vez, este resultado poderá estar relacionado com o papel dual que as mutações na proteína P53 podem apresentar, podendo a maior resistência desta linha celular ao sorafenib estar correlacionada com o facto de possuir uma mutação na referida proteína (Kaino, 1997; Cadwell &

Zambetti, 2001; Soussi & Lozano, 2005). De facto, têm sido propostos variados papéis e funções para as mutações no gene *TP53*, tendo-se verificado cada vez mais avanços nesta área que se tornam extremamente úteis para a compreensão do valor preditivo que as referidas mutações possam ter em alguns tipos de cancro e, conseqüentemente, na resposta às terapias adoptadas (Roy *et al.*, 2010; Goldstein *et al.*, 2011; Arnault *et al.*, 2012; Coriat *et al.*, 2012; Zauli *et al.*, 2012). Por sua vez, a linha celular Hep3B2.1-7 foi aquela que apresentou maior sensibilidade ao tratamento com sorafenib. O facto desta linha celular possuir uma mutação no gene *TP53* que conduz a uma não expressão da proteína correspondente, a P53, o que à partida lhe confere alguma resistência, fornece um carácter promissor a este resultado. De facto, embora com diferenças entre elas, pode-se considerar que as três linhas celulares de carcinoma hepatocelular em estudo são sensíveis ao tratamento com sorafenib. Este resultado vem de encontro àquilo que se pratica na prática clínica, onde actualmente o sorafenib é a terapia sistémica mais utilizada no tratamento deste tumor (Hilgard *et al.*, 2008; Villanueva, 2011). Por outro lado, e apesar do tratamento com sorafenib ser amplamente utilizado na prática clínica, estudos indicam que a resposta ao tratamento com este fármaco varia entre doentes com carcinoma hepatocelular, facto este que foi comprovado nas linhas celulares estudadas onde também se verificou alguma variação na resposta ao tratamento com sorafenib. Neste sentido julga-se que alguns doentes e linhas celulares poderão possuir alguma resistência intrínseca ou adquirida ao tratamento com este fármaco, que poderão estar directamente correlacionados com as características celulares e moleculares de cada tumor (Abou-Alfa, 2009; Ezzoukhry *et al.*, 2012).

Relativamente à linha celular de colangiocarcinoma, no que diz respeito ao tratamento com cisplatina é de notar que estas células demonstraram possuir uma maior resistência ao tratamento com este fármaco do que as linhas celulares de carcinoma hepatocelular estudadas (Tabela 13). Algo de semelhante se verificou com a doxorrubicina onde, na generalidade, esta linha celular demonstrou ser mais resistente ao tratamento com a mesma do que as linhas celulares de carcinoma hepatocelular (Tabela 14). À semelhança do que havia ocorrido para as linhas celulares de carcinoma hepatocelular, também a linha celular de colangiocarcinoma demonstrou elevada resistência ao tratamento com 5-fluorouracilo (Tabela 15). De facto, o colangiocarcinoma é tido como um tipo de cancro altamente quimiorressistente, sendo os resultados obtidos através do tratamento com fármacos utilizados na quimioterapia convencional altamente desanimadores (Lim *et al.*, 2010). Nos últimos tempos têm sido feitas algumas tentativas de efectuar terapias com combinações de fármacos, sendo normalmente

utilizado o 5-fluorouracilo em combinação com um ou vários outros fármacos. Contudo, também aqui os resultados têm sido desanimadores, de tal modo que esta modalidade terapêutica é utilizada apenas pontualmente e em termos paliativos (Anderson *et al.*, 2004; Thongprasert, 2005; Blechacz & Gores, 2008).

Relativamente aos resultados obtidos com do tratamento da linha celular TFK-1 com sorafenib verificou-se que, curiosamente, esta linha celular demonstrou maior sensibilidade ao sorafenib do que as linhas celulares de carcinoma hepatocelular em estudo (Tabela 16). De facto, o sorafenib não é utilizado na prática clínica no tratamento de colangiocarcinoma, isto porque inicialmente este fármaco foi indicado para o tratamento de tumores altamente vascularizados com o intuito de inibir o desenvolvimento da nova microvasculatura (Wilhelm *et al.*, 2008; Ibrahim *et al.*, 2012). Ora, este não é o caso do colangiocarcinoma e, por isso, o sorafenib não está indicado para o tratamento deste tipo de tumor. Contudo, estudos vieram a demonstrar que o sorafenib possui um campo de acção bastante mais diversificado, sendo actualmente considerado um fármaco de ampla acção. De facto, para além de ser considerado um inibidor do VEGFR-1, do VEGFR-2 e do VEGFR-3, o sorafenib pode actuar em diversas outras vertentes, por exemplo, enquanto inibidor de alguns membros da família MAPK, mais precisamente da RAF-cinase, assim como dos receptores de tirosina cinases, sendo actualmente considerado também um indutor da apoptose mediada por TRAIL (Blechacz & Gores, 2008; Noel & Hezel, 2013). De facto, mutações na via de sinalização MAPK são uma das alterações genéticas mais frequentes no colangiocarcinoma. Mais especificamente, dentro desta via de sinalização as mutações na RAS e na B-RAF estão sinalizadas em muitos casos de colangiocarcinoma, o que torna o sorafenib um fármaco com potencial promissor no tratamento desta neoplasia, o que vai de encontro aos resultados por nós obtidos (Huether *et al.*, 2007).

Por sua vez, de acordo com os resultados obtidos através da citometria de fluxo no que diz respeito à análise da viabilidade celular e dos tipos de morte celular induzidos pelos fármacos testados, verifica-se que, no caso das linhas celulares de carcinoma hepatocelular, quando incubadas com a concentração correspondente ao IC₅₀ quer de cisplatina quer de doxorrubicina, a percentagem de células mortas é sensivelmente 50% evidenciando a existência de um paralelismo entre a inibição da actividade metabólica e a morte celular induzida (Figuras 34 e 35). Por sua vez, a incubação com 5-fluorouracilo, mesmo com a maior concentração utilizada (500 µM) não conseguiu induzir uma grande diminuição na viabilidade celular, permanecendo esta sempre superior a 50% (Figura 36). Este resultado vai de encontro a algumas controvérsias clínicas acerca da utilização do 5-fluorouracilo no tratamento do carcinoma hepatocelular, tanto

em monoterapia como em terapia combinada (Longley *et al.*, 2003; Brito *et al.*, 2012; Coriat *et al.*, 2012).

Analisando cada linha celular isoladamente verifica-se que, no caso da linha celular HepG2, o tratamento com cisplatina induz maioritariamente morte celular por necrose enquanto que a incubação com doxorubicina conduz à morte celular por apoptose tardia/necrose (Figuras 34 e 35). Esta linha celular expressa uma forma normal e funcional da P53 (Kaino, 1997) e, conseqüentemente, possui a capacidade de reconhecer os danos celulares. Esta característica confere-lhe a capacidade de desencadear a morte celular por apoptose, mas também de activar vias de reparação, permitindo à célula não prosseguir pela via apoptótica (Amundson *et al.*, 1998; Janus *et al.*, 1999). Por outro lado, embora seja normalmente descrito que a cisplatina induz danos directos no ADN induzindo, por consequência, a apoptose, é sabido que este fármaco não interage apenas com o ADN mas também com outras moléculas, tais como proteínas. Assim, dependendo do dano celular induzido, a necrose pode ocorrer em resposta ao tratamento com cisplatina, ou de uma forma directa, ou como consequência de um processo de apoptose inacabado (Gonzalez *et al.*, 2001). Os resultados obtidos, através da análise da razão BAX/BCL-2 (Figura 38), em resposta ao tratamento com os fármacos mencionados, demonstram consistência com a análise da viabilidade celular e dos tipos de morte celular induzidos. Isto porque, no caso da cisplatina, em que a morte celular ocorre maioritariamente por necrose, não se denotam diferenças na razão BAX/BCL-2 entre as células controlo e as células incubadas com este fármaco. Já para a doxorubicina observou-se um aumento da razão BAX/BCL-2, o que indica uma activação da via pro-apoptótica, o que está em concordância com o tipo de morte celular observado (Brito *et al.*, 2012).

Curiosamente, quando as células HepG2 foram incubadas com 5-fluorouracilo a razão BAX/BCL-2 foi inferior à obtida para a condição controlo (Figura 38). Sabe-se que o 5-fluorouracilo possui a capacidade de bloquear a síntese de timidina através de uma interacção irreversível com a timidilato sintetase inibindo, conseqüentemente, a replicação do ADN (Longley *et al.*, 2003). De facto, os resultados demonstram que, comparativamente à condição controlo, o tratamento com 5-fluorouracilo induz um aumento da expressão da proteína anti-apoptótica BCL-2 em relação à proteína pró-apoptótica BAX diminuindo conseqüentemente a razão BAX/BCL-2, o que sugere uma activação dos mecanismos de reparação do ADN. Por outro lado, estes resultados estão em concordância com a análise da viabilidade celular e dos tipos de morte celular induzida, onde se havia verificado um efeito reduzido na diminuição da sobrevivência celular. Relativamente ao sorafenib, nas células HepG2, o tratamento

com este fármaco induziu morte celular por apoptose nas duas primeiras concentrações testadas, e por necrose para a maior concentração (Figura 37). De facto, a incubação com a concentração de sorafenib correspondente ao IC₅₀ induziu também uma tendência para um aumento da razão BAX/BCL-2, comparativamente ao controlo (Figura 38). A activação da BAX em resposta ao sorafenib pela linha celular HepG2 já havia sido anteriormente verificada, estando esses resultados de acordo com os que foram por nós obtidos (Fernando *et al.*, 2013).

Relativamente à linha celular HuH7, a incubação com cisplatina (Figura 34) induziu morte celular por apoptose, o que está de acordo com os resultados obtidos na análise da razão BAX/BCL-2, onde se observa uma tendência para o aumento da mesma comparativamente ao controlo (Figura 38). Este resultado poderá estar directamente correlacionado com o facto desta linha celular possuir uma mutação no gene *TP53* que lhe confere uma sobexpressão da proteína P53. Mais uma vez, é questionável a dualidade de funções da P53, principalmente das suas formas mutadas (Cadwell & Zambetti, 2001; Soussi & Lozano, 2005). Contudo, aqui parece que esta proteína se mantém funcional e activa, conseguindo desencadear o processo apoptótico. Quando a linha celular foi incubada com doxorrubicina ocorreu um balanço entre a morte celular por apoptose e por necrose (Figura 35), mas aqui a razão BAX/BCL-2 aumentou de forma estatisticamente significativa em comparação com o controlo (Figura 38), o que indica uma activação da cascata pró-apoptótica. Curiosamente a incubação com 5-fluorouracilo induziu um aumento na razão BAX/BCL-2 (Figura 38), o que é consistente com os resultados obtidos pela análise da viabilidade celular onde se observa que embora não se verifique uma grande percentagem de morte celular, quando ocorre é maioritariamente por apoptose (Figura 36). Na linha celular HuH7, o tratamento com sorafenib induziu um equilíbrio entre a morte celular por apoptose e por necrose (Figura 37), acompanhado de uma tendência para o aumento da razão BAX/BCL-2 relativamente às células controlo (Figura 38).

No caso das células Hep3B2.1-7 o tratamento com cisplatina e também com doxorrubicina induziu morte celular maioritariamente por apoptose tardia/necrose. Por sua vez, embora a morte celular induzida pelo 5-fluorouracilo possua pouca expressão, esta ocorre tanto por necrose como por apoptose. Também o sorafenib induz morte celular tanto por necrose como por apoptose. Contudo, no caso desta linha celular nenhuma das terapias aplicadas induziu diferenças significativas no que diz respeito à razão BAX/BCL-2. Este resultado pode ser explicado pela ausência de expressão de P53 por esta linha celular, o que resulta numa menor capacidade de reconhecer o dano induzido na célula, pelo que não consegue induzir a morte celular por apoptose (Brito *et al.*, 2012). Apesar

disso, no seu estudo de 2012 Fernando e colaboradores haviam demonstrado que o sorafenib era capaz de induzir a via mitocondrial da apoptose na linha celular Hep3B2.1-7, de um modo independente da P53, através da sobreexpressão das proteínas PUMA e BIM, e de uma diminuição na expressão de MCL-1 (Fernando *et al.*, 2013). Deste modo, também neste estudo poderá estar a ocorrer a activação da via mitocondrial da apoptose sem haver o envolvimento das proteínas BAX e BCL-2. Também no que diz respeito à doxorrubicina, já em 2001, Lee e colaboradores haviam demonstrado que este fármaco é capaz de induzir um bloqueio das células Hep3B2.1-7 na fase G2/M seguida de apoptose de uma forma independente da P53 (Lee *et al.*, 2002).

Tal como já foi referido, o carcinoma hepatocelular é considerado um tipo de cancro altamente resistente à apoptose, o que está em concordância com os resultados obtidos no nosso estudo, onde muitas vezes se observa uma preferência pela necrose ao invés da morte celular por apoptose (Yeo *et al.*, 2005; Brito *et al.*, 2012; Schattenberg, Schuchmann, & Galle, 2011).

Consistente com este facto, comparando as células controlo com aquelas que foram submetidas aos diversos tratamentos, apenas se observa um aumento na razão BAX/BCL-2 em algumas situações, o que pode ser indicativo de que a apoptose não é o tipo de morte predominante em resposta a algumas das estratégias terapêuticas aplicadas. Contudo, há que ter em conta que existem outras moléculas da família BCL-2 tais como a BAD, a BIM e a BCL-XL que podem estar envolvidas na activação da apoptose e/ou resistência à mesma, devendo este facto ser tido em conta. Por outro lado, outras vias de sinalização tais como a JAK/STAT, a PI3K/AKT e a RAS/ERKs podem estar activadas no carcinoma hepatocelular conferindo-lhe resistência à apoptose (Yeo *et al.*, 2005; Schattenberg *et al.*, 2011).

Relativamente à linha celular de colangiocarcinoma, constatou-se que a incubação com cisplatina não induziu grandes alterações a nível da viabilidade celular, uma vez que mesmo para a maior concentração de fármaco utilizada, a viabilidade celular permaneceu superior a 50% (Figura 34). No que diz respeito à morte celular induzida, quando ocorre é maioritariamente por apoptose, sendo acompanhada por uma tendência para aumento da razão BAX/BCL-2 (Figura 38). Já em relação aos fármacos doxorrubicina e 5-fluorouracilo, na linha celular TFK-1, estes induziram um balanço entre a morte celular por necrose e por apoptose que foram acompanhadas por uma tendência para um aumento da razão BAX/BCL-2 comparativamente à condição controlo (Figuras 35, 36 e 38). Curiosamente, e apesar do sorafenib não ser utilizado na prática clínica para o tratamento de colangiocarcinoma, verificou-se que após a incubação das células TFK-1 com este

fármaco houve um decréscimo bastante considerável na viabilidade celular que foi acompanhado por morte celular por necrose (Figura 37). Consistente com este resultado, o tratamento com sorafenib não induziu alterações a nível da razão BAX/BCL-2 em comparação com o controlo (Figura 38). Contrariamente aos resultados por nós obtidos existem dados na literatura, na mesma linha celular, que indicam que o sorafenib induz morte celular por apoptose (Huether *et al.*, 2007).

De facto, o colangiocarcinoma é tido como um tipo de tumor altamente resistente à quimioterapia (Lim *et al.*, 2010) sendo, por esse motivo, na maior parte das vezes esta é apenas utilizada como tratamento paliativo. Os nossos resultados são consistentes com esse facto, uma vez que nem sempre se observa um decréscimo considerável na viabilidade celular, e por outro lado, dependendo do fármaco testado, a apoptose pode não constituir a via de morte primordial. Tais resultados podem ser explicados, em parte, pelo facto de as células TFK-1 não expressarem P53 (Saijo *et al.*, 1995) e, deste modo, não conseguirem reconhecer os danos causados a nível do ADN, não despoletando a morte celular por apoptose. Por outro lado, é característica comum do colangiocarcinoma uma sobreexpressão de proteínas anti-apoptóticas da família BCL-2, nomeadamente a MCL-1 e a BCL-XL, que podem conferir resistência aos estímulos pró-apoptóticos e, consequentemente resistência às terapêuticas testadas (Okaro *et al.*, 2001).

Inibidores competitivos do GLUT-1: quercetina

O transportador de glicose-1 tem vindo a ser apontado por diversos autores como alvo terapêutico para o carcinoma hepatocelular, uma vez que neste tipo de tumor a expressão de GLUT-1 se encontra aumentada, promovendo a tumorigénese para além de contribuir para a elevada actividade glicolítica. Assim, neste contexto, este transportador tem vindo a ser apontado como um oncogene (Goodman, 2007; Amann & Hellerbrand, 2009; Amann *et al.*, 2009). No caso do colangiocarcinoma, embora o efeito do GLUT-1 na tumorigénese deste tumor não esteja ainda explorado, estudos indicam a ocorrência de uma sobreexpressão deste transportador neste tipo de cancro (Zimmerman *et al.*, 2002). Em paralelo, são vários os estudos que têm evidenciado que os flavonóides são potentes inibidores da glicose. Em particular, os flavonóis, tais como a quercetina inibem as tirosinas cinases de ligação de ATP e, através deste mecanismo, são capazes de inibir

competitivamente o GLUT-1 (Vera *et al.*, 2001; Amann & Hellerbrand, 2009; Furuta *et al.*, 2010; Vargas *et al.*, 2011; Moreira *et al.*, 2013). Tendo em conta estas particularidades, a quercetina poderá ter um papel promissor enquanto arma terapêutica no combate aos tumores primários do fígado. Assim, um dos objectivos deste trabalho experimental foi avaliar o efeito da quercetina nas linhas celulares de carcinoma hepatocelular e de colangiocarcinoma em estudo.

Através do ensaio do MTT verificou-se que a quercetina possui um efeito inibitório da actividade metabólica em todas as linhas celulares em estudo, sendo esse efeito dependente da concentração de fármaco e do tempo de incubação (Figura 39). Este resultado está de acordo com outros estudos referidos na literatura que já haviam demonstrado o efeito da quercetina a esse nível em vários tipos de cancro, incluindo o carcinoma hepatocelular e o colangiocarcinoma (Kudo *et al.*, 1999; Shi *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2009; Berndt *et al.*, 2013).

Observando os valores de IC₅₀ (Tabela 17), constata-se que, para os tempos de incubação mais curtos, a linha celular HepG2 é aquela que apresenta maior sensibilidade à quercetina. Tal ocorrência poderá estar correlacionada com o facto desta linha celular expressar a forma normal da proteína P53 (Kaino, 1997), o que lhe permitirá reconhecer o dano causado no ADN e despoletar uma resposta.

Com o objectivo de corroborar e reforçar os resultados obtidos através do ensaio do MTT realizou-se o ensaio clonogénico, tendo por finalidade verificar qual o efeito da quercetina na sobrevivência celular das células HepG2 em tempos de incubação mais longos. Verificou-se então que a incubação com as diferentes concentrações de quercetina testadas introduziu alterações significativas na capacidade de formação de colónias na linha celular HepG2 (Figura 41A). Deste modo, observou-se que a incubação com apenas 5 µM de quercetina conduziu a uma redução de cerca de 25% na capacidade de formação de colónias em relação ao controlo, verificando-se para as outras duas concentrações de composto testadas uma total ausência de formação de colónias. Este resultado indica que a quercetina possui um efeito mais pronunciado para tempos de incubação mais longos, e está de acordo com resultados obtidos em estudos *in vitro* noutros tipos de cancro onde se verificou que a quercetina possui um efeito antiproliferativo mais evidente para tempos mais longos (Yeh *et al.*, 1995). Através da análise da viabilidade celular e dos tipos de morte celular induzidos com recurso à dupla marcação com AV-FITC e IP verificou-se que ao incubar as células HepG2 com a concentração de quercetina correspondente ao IC₅₀ e com a concentração superior a esta a viabilidade celular permaneceu por volta dos 60% (Figura 43A), embora no ensaio do MTT essas concentrações induzissem uma redução de 50% ou mais da actividade metabólica. Este resultado permite-nos postular a hipótese de que

embora uma concentração de 37,67 μM de quercetina consiga inibir a actividade metabólica em 50% esta não é suficiente para induzir a morte celular na mesma percentagem, ou seja, as células permanecem viáveis porém com reduzida actividade metabólica (Zhang *et al.*, 2013). Por outro lado, de entre as células que morrem a linha celular HepG2 possui uma tendência para activar a morte celular por apoptose, o que poderá estar correlacionado com o facto desta linha celular expressar uma forma normal e funcional da P53 (Kaino, 1997) conseguindo, deste modo, reconhecer o danos e desencadear o processo apoptótico. Este resultado está ainda de acordo com a literatura onde diversos estudos indicam que este composto possui a capacidade de induzir a morte celular por apoptose (Bishayee *et al.*, 2013; Jakubowicz-gil *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013). Em concordância com o resultado anterior, verificou-se que o tratamento com quercetina conduziu a uma tendência do aumento da razão BAX/BCL-2, o que indica uma activação da via mitocondrial da apoptose (Figura 45A). De facto, outros autores haviam já demonstrado que a incubação com quercetina induz um aumento na expressão de BAX com uma diminuição concomitante dos níveis de proteínas anti-apoptóticas como a BCL-2, sugerindo que este composto induz morte celular através da via mitocondrial da apoptose (Gao *et al.*, 2012; J. Zhang *et al.*, 2013) Mais precisamente na linha celular HepG2, um estudo de 2009 demonstrou que a incubação com concentrações crescentes deste composto induziu uma diminuição nos níveis de BCL-2 (Tan *et al.*, 2009). A análise do ciclo celular permite-nos constatar que a incubação das células HepG2 com quercetina induz o aparecimento do pico apoptótico (Figura 47A). Mais uma vez, estes resultados estão em concordância com o tipo de morte celular induzida, assim como com o aumento da razão BAX/BCL-2 observado. As células em fase pré-G0 correspondem a células com baixo conteúdo de ADN e, deste modo, as células desta população podem ser caracterizadas como células em que o conteúdo de ADN está diminuído devido à fragmentação do mesmo, uma das características iniciais da apoptose (Li & Elsasser, 2005). De referir também que a incubação com quercetina conduziu a um aumento da população celular em fase G0/G1, o que sugere um bloqueio nesta fase do ciclo celular (Figura 47A). O bloqueio nesta fase já havia sido observado noutras linhas celulares cancerígenas em resposta ao tratamento com quercetina (Chen *et al.*, 2013). Observou-se também, à medida que se aumentou a concentração de quercetina, uma diminuição da população em fase S. O bloqueio na fase G0/G1 e a diminuição da população celular em fase S podem justificar, em parte, o facto de a inibição da actividade metabólica e da viabilidade celular não apresentarem valores coincidentes, ou seja, as células que não morrem permanecem em fase G0/G1, sem proliferarem, uma vez que a síntese diminui. De facto, já em 2009, Tan

e colaboradores haviam demonstrado que nesta linha celular o tratamento com quercetina induzia um aumento da população na fase G0/G1 acompanhado por uma diminuição na fase S (Tan *et al.*, 2009). No mesmo estudo, verificou-se que o tratamento com quercetina induziu uma diminuição da população celular em G2/M, contudo, os nossos resultados evidenciam que as células sujeitas à maior concentração de quercetina apresentam um pequeno aumento da população em fase G2/M e, neste sentido, é de referir que a literatura evidencia também que o tratamento com quercetina provoca paragens no ciclo celular ao nível da fase G2/M (Nomura *et al.*, 2008; Bishayee *et al.*, 2013).

Vários autores indicam que a apoptose mediada por quercetina pode resultar da indução de stresse proteico com consequente ruptura de microtúbulos e de mitocôndrias, libertação do citocromo c e activação das caspases (Nomura *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2013). Assim, a quercetina é caracterizada por alguns autores como um composto pró-oxidante (Ferraresi *et al.*, 2005; Bishayee *et al.*, 2013). No entanto, outros autores atribuem-lhe capacidades anti-oxidantes (Chen *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2013). Neste sentido tornou-se importante a avaliação da produção de ROS e a influência das defesas antioxidantes responsáveis pela sua inactivação na resposta ao tratamento com quercetina, de modo a clarificar o seu papel dual enquanto pró/anti-oxidante. Verificou-se que o tratamento com quercetina introduziu alterações a nível da produção intracelular de peróxidos na linha celular HepG2 (Figura 49A), nomeadamente, a produção de peróxidos aumentou gradualmente até ao valor da concentração correspondente ao IC₅₀, diminuindo de seguida para a maior concentração de quercetina utilizada. O aumento da produção de peróxidos nas células HepG2 incubadas com quercetina vem reforçar as suas características pró-oxidantes (Ferraresi *et al.*, 2005). No entanto, para a maior concentração de quercetina utilizada, observou-se uma diminuição na produção de peróxidos, que poderá ser explicada através da possibilidade de estas espécies terem sido convertidas em espécies mais lesivas para a célula como o radical hidroxilo (OH•) e/ou o peróxido de nitrito (ONOO•). Isto porque, é sabido que na presença de ferro livre, o peróxido de hidrogénio é transformado pela reacção de Fenton/Haber Weiss em radical OH•, e o anião superóxido na presença de óxido nítrico, NO•, pode ser convertido em ONOO•. Estes radicais livres são bastante reactivos e tóxicos para a célula podendo induzir morte celular, nomeadamente apoptose (Li *et al.*, 2007; Valko *et al.*, 2007). Estes dados poderão corroborar os resultados obtidos através da análise do tipo de morte celular induzida que se constatou ser, primordialmente, por apoptose. Já em relação à produção de anião superóxido, a análise da fluorescência pela sonda DHE demonstrou que, para a linha celular HepG2, a incubação com quercetina

introduziu uma diminuição na produção intracelular de anião superóxido relativamente às células controlo (Figura 51A). Ora, como foi referido anteriormente, o anião superóxido na presença de óxido nítrico pode ser convertido em peróxido de nitrito, que é bastante lesivo para a célula (Li *et al.*, 2007; Valko *et al.*, 2007). Já no que diz respeito às defesas anti-oxidantes, em resposta ao tratamento com as duas menores concentrações de quercetina, na linha celular HepG2, a expressão de GSH livre diminuiu ligeiramente comparativamente ao controlo, tendo aumentado para a maior concentração de quercetina utilizada (Figura 53A). A enzima GSH é responsável pela inactivação da reacção de dismutação que dá origem ao peróxido de hidrogénio (Hedley & Chow, 1994). Deste modo, o aumento da concentração de GSH livre pode ser responsável por uma diminuição da concentração de peróxido de hidrogénio, uma vez que este é substrato da GSH. De facto, estes resultados estão de acordo com os observados para a produção de peróxidos em resposta ao tratamento com quercetina anteriormente discutida (Figura 49A).

Em conjunto, os resultados anteriormente descritos apontam para o desencadear da morte celular por apoptose em resposta ao tratamento com quercetina. Ora, o desencadear da apoptose é muitas vezes resultado de danos induzidos a nível do ADN (Wang, 2001; Norbury & Zhivotovsky, 2004), sendo que algo de semelhante poderá estar a ocorrer aqui. Com o objectivo de comprovar essas evidências realizou-se o ensaio cometa, tendo-se verificado que, nas células HepG2, o aumento da concentração de quercetina provocou o aumento do comprimento da cauda do cometa, da percentagem de ADN na cauda e, conseqüentemente, do momento da cauda (Figura 59), um parâmetro que correlaciona os dois últimos. Estes resultados parecem indicar haver uma tendência para o aumento dos danos no ADN, nomeadamente quebras no ADN, desta linha celular com a presença de concentrações crescentes de quercetina. Curiosamente, são vários os estudos que demonstram o inverso, ou seja, uma capacidade da quercetina em prevenir os danos no ADN (Musonda & Chipman, 1998; Kapiszewska *et al.*, 2005; Ramos *et al.*, 2008). Contudo, já num estudo de 2000, efectuado em linfócitos T, Johnson e colaboradores haviam verificado que, dependendo da concentração de quercetina utilizada, este composto consegue prevenir ou causar dano oxidativo no ADN, comprovando mais uma vez a acção dual deste composto, enquanto agente pró/anti-oxidante (Johnson & Loo, 2000). Mais recentemente, num estudo de 2012 verificou-se que a quercetina é capaz de induzir danos no ADN na linha celular humana de cancro da próstata PC-3 de uma forma dependente da dose (Liu *et al.*, 2012).

Curiosamente, e ao contrário do que seria expectável, uma vez que os

restantes resultados indicam a ocorrência de morte celular por apoptose, o tratamento com quercetina induziu uma diminuição da expressão de P53 na linha celular HepG2 (Figura 56A). Apesar de a morte celular por apoptose decorrente de danos no ADN ser muitas vezes mediada pela P53, existem outras proteínas que poderão estar envolvidas neste mecanismo, tais como a P63 e a P73 (Ozaki & Nakagawara, 2005; Roos & Kaina, 2006). Consistente com os nossos resultados, um estudo efectuado em 2009 em células de cancro da mama, mostrou que a quercetina induziu morte celular por apoptose acompanhada por um decréscimo na expressão de P53 (Chien *et al.*, 2009). Contudo, neste estudo apenas foi avaliada a expressão total de P53, não se tendo avaliado o efeito da quercetina na expressão da forma fosforilada desta proteína. Ora, sabe-se que a forma fosforilada da P53 corresponde à sua forma activa (Ashcroft & Kubbutat, 1999) e, neste sentido, torna-se imperativo, como trabalho futuro, efectuar esta análise. De facto, já num estudo de 2011 em linhas celulares de cancro da mama se verificou que, embora o tratamento com quercetina não influencie a expressão total de P53, conduz a um aumento da sua forma fosforilada (Seo *et al.*, 2011), o que reforça a necessidade de uma análise de alterações induzidas na expressão da forma fosforilada desta proteína.

Alguns autores defendem, para além de que já foi mencionado anteriormente, que um dos potenciais mecanismos de acção da quercetina, enquanto composto anti-cancerígeno, está intimamente relacionado com a sua capacidade de inibir competitivamente o GLUT-1 (Vera *et al.*, 2001; Amann & Hellerbrand, 2009; Vargas *et al.*, 2011; Moreira *et al.*, 2013). Nesse sentido, avaliou-se a expressão deste transportador após incubação com quercetina, tendo os nossos resultados demonstrado que a incubação com quercetina conduziu a um aumento da expressão membranar deste transportador na linha celular HepG2 de uma maneira dependente da dose (Figura 74A). Em simultâneo observou-se uma diminuição da expressão citoplasmática do mesmo. De facto, alguns estudos haviam já demonstrado que os flavonóides e as isoflavonas são potentes inibidores do influxo de glicose, tendo sido demonstrado que os flavonóis, tais como a quercetina, inibem as tirosina cinases de ligação de ATP, sendo também capazes de inibir competitivamente o GLUT-1 através deste mecanismo (Vera *et al.*, 2001; Amann & Hellerbrand, 2009; Furuta *et al.*, 2010; Vargas *et al.*, 2011; Moreira *et al.*, 2013). Assim, ao que tudo indica, nas células HepG2, a quercetina parece estar a inibir competitivamente o GLUT-1 a nível membranar induzindo um recrutamento de mais transportadores do citoplasma para a membrana, de forma a suprimir as necessidades glicolíticas, o que na prática se traduz num aumento da expressão membranar de GLUT-1 com consequente diminuição da expressão

citoplasmática do mesmo transportador. O ^{18}F -FDG é um análogo radiomarcado da glicose (Jadvar *et al.*, 2009) e, deste modo, ao efectuar estudos de captação deste radiofármaco consegue-se mimetizar o que ocorre com a glicose. Deste modo, realizaram-se estudos de captação de ^{18}F -FDG em células HepG2 incubadas com quercetina e em células controlo, tendo-se verificado que a incubação com quercetina induziu um decréscimo na captação do radiofármaco (Figura 76A e Tabela 19) o que, por analogia, poderá postular que a quercetina compromete a captação de glicose, tal como já havia sido demonstrado em outros estudos (Park, 1999; Moreira *et al.*, 2013). Ora a diminuição da captação de ^{18}F -FDG não é acompanhada por um decréscimo na expressão membranar de GLUT-1, um das principais formas de entrada deste radiofármaco na célula neoplásica (Jadvar *et al.*, 2009) observando-se mesmo um aumento da expressão do mesmo. Tal facto indica que a quercetina poderá estar a actuar enquanto inibidor competitivo do GLUT-1 uma vez que consegue diminuir a sua função mas não a sua expressão (Vera *et al.*, 2001; Furuta *et al.*, 2010; Vargas *et al.*, 2011).

Em oposição à linha celular HepG2, a linha celular HuH7 foi aquela que apresentou maior resistência à quercetina (Tabela 17). Sabe-se, porém, que esta linha celular possui uma mutação no gene *TP53* que, por sua vez, conduz a uma sobreexpressão de uma forma mutada da P53. No entanto, não se sabe se esta forma mutada da proteína P53 é totalmente funcional. De facto, tal como referenciado anteriormente, as mutações no gene *TP53* podem comprometer a actividade da proteína correspondente e, por conseguinte, as células poderão adquirir uma maior dificuldade em reconhecer os danos causados no ADN e, conseqüentemente, induzir a morte celular (Cadwell & Zambetti, 2001; Soussi & Lozano, 2005). Para além disso, sabe-se que este composto possui também a capacidade de inibir a expressão de formas mutadas da P53 o que, por sua vez, confere resistência à célula (Kim *et al.*, 2008). À semelhança do que foi observado para a linha celular HepG2, também nas células HuH7 a quercetina induziu alterações bastante significativas na capacidade de formação de colónias, sendo que a incubação com a menor concentração deste composto induziu uma diminuição na sobrevivência celular em cerca de 40% relativamente ao controlo (Figura 41B) e as concentrações superiores conduziram a uma não capacidade de formação de colónias. Ao que tudo indica, a incubação com quercetina terá efeitos mais significativos para os tempos de incubação maiores. Relativamente à viabilidade celular, no caso da linha celular HuH7, constatou-se que quando as células foram incubadas com as duas menores concentrações de quercetina testadas, a viabilidade celular manteve-se semelhante à da condição controlo. Por sua vez, ao aumentar a concentração de quercetina para 200 μM observou-se uma

diminuição da sobrevivência celular, sendo que em relação à morte celular se estabeleceu um balanço entre a apoptose e a necrose (Figura 43B). Embora em resposta ao tratamento com quercetina a morte celular por apoptose seja mais frequente, a indução de morte celular por necrose por este composto também já foi verificada noutros estudos (Yamaguchi & Weitzmann, 2011; Granado-Serrano *et al.*, 2012; Gang Wang *et al.*, 2012). Este resultado pode, por um lado, estar correlacionado com o facto de se tratar da condição em que se utilizou a maior concentração de quercetina, o que poderá induzir efeitos mais agressivos nas células tais como a morte celular por necrose, por outro lado, esta linha celular expressa uma forma mutada da P53, que poderá não ser totalmente funcional, o que faz com que haja uma maior dificuldade em activar a via de morte celular por apoptose (Cadwell & Zambetti, 2001; Soussi & Lozano, 2005). No que diz respeito à expressão de BAX e de BCL-2, observou-se uma tendência para um aumento da razão BAX/BCL-2 à medida que se aumentou a concentração de quercetina (Figura 45B). Apesar de não se observar um grande envolvimento das proteínas BAX e BCL-2 na morte celular por apoptose nesta linha celular, como consequência do tratamento com quercetina, o facto é que algumas células morrem por apoptose. Ora, nesta linha celular, a apoptose poderá estar a ser mediada por outras proteínas da família BCL-2 tais como a BAD (do inglês *Bcl-2-associated death promoter*), a MCL-1 e a BCL-XL que já se comprovou estarem envolvidas no processo apoptótico em resposta ao tratamento com quercetina noutras linhas celulares cancerígenas (Vidya Priyadarsini *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2012; Russo *et al.*, 2013). Através da análise do ciclo celular (Figura 47B) observou-se o aparecimento do pico apoptótico à medida que se aumentou a concentração de quercetina, o que vem reforçar os resultados da viabilidade celular, e dar ênfase à teoria do envolvimento das proteínas da família BCL-2 neste processo. Deve-se salientar também o aumento da população de células em fase G0/G1 o que sugere um bloqueio nesta fase do ciclo celular que, inclusivamente, já havia sido observado nas células HepG2 assim como em outras linhas celulares tumorais quando incubadas com este composto (Chen *et al.*, 2013). Simultaneamente observou-se uma diminuição da população celular em fase S. Por fim, observou-se também um aumento da população celular em G2/M, o que vai de encontro aos resultados encontrados na literatura, e também ao observado na linha celular HepG2 (Nomura *et al.*, 2008; Bishayee *et al.*, 2013).

Em relação à produção de espécies reactivas de oxigénio e às defesas antioxidantes, a marcação com a sonda DCF demonstrou que o tratamento das células HuH7 com as duas menores concentrações de quercetina induziu um aumento na produção de peróxidos, tendo-se observado uma diminuição bastante

evidente quando se incubaram as células com 200 μM deste composto (Figura 49B). Tal resultado assemelha-se àquilo que havia sido observado para as células HepG2. Ora o aumento inicial na produção de peróxidos vai de encontro às características pró-oxidantes da quercetina (Ferraresi *et al.*, 2005; Valko *et al.*, 2007). Por outro lado, a diminuição subsequente poderá ser indicativa de que os peróxidos poderão estar a ser convertidos em espécies mais lesivas para a célula tais como o radical hidroxilo e o peróxido de nitrito (Li *et al.*, 2007). Já relativamente à produção de anião superóxido, a incubação com quercetina apenas induziu uma ligeira tendência para o aumento da expressão do mesmo (Figura 51B), podendo mesmo dizer-se que a quercetina não influencia a produção desta espécie reactiva de oxigénio nas células HuH7. Em relação à defesa antioxidante GSH, a incubação com o valor correspondente ao IC_{50} de quercetina induziu um aumento na expressão da mesma, tendo depois diminuído com a concentração superior (Figura 53B). De facto, o aumento da produção de peróxidos anteriormente verificado pode conduzir a uma maior produção de GSH pela célula com o intuito de neutralizar os peróxidos. Uma vez que para a maior concentração de quercetina ocorre uma diminuição na produção de peróxidos, a célula já não terá a necessidade de produzir uma quantidade de GSH tão elevada, o que poderá justificar, pelo menos em parte, o decréscimo na expressão de GSH.

Curiosamente, ao contrário daquilo que havia sido verificado para a linha celular HepG2, no caso das células HuH7 a incubação com quercetina não induziu danos a nível do ADN, pois para nenhuma das concentrações testadas se verificaram diferenças estatisticamente significativas, em relação ao controlo, para nenhum dos parâmetros estudados, isto é, percentagem de ADN na cauda do cometa, comprimento da cauda e, conseqüentemente, momento da cauda (Figura 61). De facto, nesta linha celular a morte celular por apoptose, que pode decorrer como consequência de danos no ADN, não foi muito evidente. Muitas vezes as quebras a nível do ADN são consequência do aumento da produção de espécies reactivas de oxigénio (Valko *et al.*, 2006; Dizdaroglu & Jaruga, 2012). Ora, nesta linha celular, a incubação nunca induziu aumentos significativos na produção quer de peróxidos, quer de anião superóxido, apesar de se postular a hipótese da conversão dos mesmos em espécies mais lesivas para a célula. Por outro lado, mais uma vez aparece aqui a dualidade das características pró e antioxidantes da quercetina, podendo este resultado estar correlacionado com as características anti-oxidantes deste composto. Num estudo de 2000, Johnson e Loo (Johnson & Loo, 2000) demonstraram que concentrações baixas de quercetina induziram um efeito protector a nível de danos no ADN de linfócitos T, enquanto que concentrações mais elevadas induziram danos no ADN. Contudo, a maior

concentração de quercetina utilizada por estes autores foi de 100 μM , ou seja, metade da maior concentração com que a linha celular HuH7 foi incubada. Apesar disso, este resultado poderá estar relacionado com diferenças intrínsecas das células estudadas, pois trata-se de células de origens bastante diferentes. Em concordância com estes resultados, observou-se que a quercetina não induz um aumento na expressão de P53, aliás, observou-se o inverso, ou seja, uma diminuição da expressão desta proteína, à medida que se aumentou a concentração de composto (Figura 56B). Ora, é sabido que a forma normal da P53 é uma proteína de curta duração mantida normalmente em níveis basais baixos. No entanto, em resposta a danos no ADN ocorre uma sobreexpressão e uma activação da P53 o que, por consequência, induz ou reprime a transcrição de vários genes (Sakaguchi *et al.*, 1998). De facto, os nossos resultados demonstraram que, na linha celular HuH7, o tratamento com quercetina não induziu danos no ADN e também não conduziu a um aumento da expressão da P53. Tais resultados poderão ser explicados, pelo menos em parte, pelos factos anteriormente relatados, ou seja, não ocorrendo danos a nível do ADN a célula não respondeu com um acréscimo na expressão de P53. No entanto há que ter em conta que a forma fosforilada desta proteína não foi quantificada, não se podendo por esse motivo afirmar com certeza que não ocorreu activação da mesma.

Já em relação à expressão de GLUT-1, verificou-se, que de modo similar ao que havia ocorrido para a linha celular HepG2, também no caso da linha celular HuH7 à medida que a concentração de quercetina aumentou, ocorreu um aumento na expressão membranar deste transportador, acompanhada por uma diminuição da sua componente citoplasmática (Figura 74B). Assim, também para esta linha celular parece que ocorre uma inibição competitiva do GLUT-1 pela quercetina, o que induz a célula a recrutar mais destes transportadores para a membrana para suprir as suas necessidades glicolíticas, o que dá origem a um aumento na expressão membranar e consequente diminuição da expressão citoplasmática do GLUT-1. Esta hipótese é corroborada pelos resultados dos estudos de captação de ^{18}F -FDG, uma vez que se verificou que a incubação com este composto induziu uma diminuição da captação do radiofármaco referido (Figura 76B e Tabela 19), o que por analogia indica que ocorre uma diminuição da captação de glicose, facto que é indicativo de uma inibição competitiva deste transportador (Moreira *et al.*, 2013).

Através do ensaio do MTT verificou-se que, para tempos de incubação mais longos, a linha celular mais sensível ao tratamento com quercetina foi a Hep3B2.1-7 (Tabela 17). Está descrito na literatura (Kaino, 1997; Seewoo *et al.*, 2012), e nós também demonstramos, que esta linha celular não expressa P53 (Figuras 14, 55 e Tabela 6) o que, em teoria, lhe confere resistência às terapias e um fenótipo mais

agressivo (Kastan *et al.*, 1995; Smith, 2010). Neste sentido, este resultado torna-se bastante promissor, na medida em que se poderá estar a reverter a resistência intrínseca destas células. O ensaio clonogénico revelou que, também para esta linha celular, o efeito da quercetina é persistente e mais notório para os tempos de incubação mais longos. De facto, a incubação com apenas 5 μ M deste composto conduziu a uma diminuição de cerca de 30% na sobrevivência celular, e ao incubar as células Hep3B2.1-7 com as outras duas concentrações testadas a sobrevivência celular foi nula (Figura 41C). Já no que diz respeito à análise da viabilidade celular e aos tipos de morte celular induzida, verificou-se que nesta linha celular a quercetina possui efeito mais notório na diminuição da viabilidade celular, e no que diz respeito à morte celular, para todas as concentrações de composto testadas observou-se um balanço entre a morte celular por apoptose e por necrose (Figura 43C). À partida, seria de estranhar o despoletar da morte celular por apoptose numa linha celular que não expressa P53, contudo, já outros autores verificaram que a quercetina é capaz de induzir este tipo de morte celular de uma forma independente da P53 (Chien *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2014). Em 2009 Chien e colaboradores verificaram que a quercetina induziu morte celular por apoptose numa linha celular de cancro da mama através do aumento da expressão da proteína pró-apoptótica BAX em paralelo com diminuição dos níveis de expressão da proteína anti-apoptótica BCL-2, de uma forma independente da P53 (Chien *et al.*, 2009). Por sua vez, já em 2014 Kim e colaboradores demonstraram que este composto induziu apoptose numa linha celular de cancro de cólon de uma forma independente da P53, através da activação da via de sinalização AMPK/P38 (Kim *et al.*, 2014). Por outro lado, como já anteriormente referido, outros autores já demonstraram que a quercetina é capaz de induzir a morte de células cancerígenas por apoptose, e já foi demonstrado que pode ocorrer um balanço entre a necrose e a apoptose (Haghiac & Walle, 2005). Em concordância com a morte celular por apoptose observada, verificou-se que nesta linha celular a incubação com quercetina induziu um aumento significativo da razão BAX/BCL-2 comparativamente ao controlo (Figura 45C). Este resultado está de acordo com o estudo de Chien, onde se verificou que a quercetina é capaz de induzir a morte celular por apoptose de uma forma independente da P53, através de um aumento da expressão da BAX e diminuição da BCL-2 (Chien *et al.*, 2009). Através da análise de alterações induzidas no ciclo celular constata-se que, embora sem significância estatística, a quercetina induz o aparecimento do pico apoptótico na linha celular Hep3B2.1-7, o que mais uma vez está de acordo com os resultados anteriormente discutidos e corrobora a tendência da activação da apoptose (Figura 47C). Simultaneamente, observou-se também uma ligeira tendência para a diminuição

da população celular em fase S (Figura 47C).

No que diz respeito à produção de espécies reactivas de oxigénio e de defesas anti-oxidantes, na linha celular Hep3B2.1-7 o tratamento com quercetina não introduziu grandes alterações. Apenas se verificou uma ligeira tendência para o aumento da produção de peróxidos, de anião superóxido e também de expressão de GSH (Figuras 49C, 51C e 53C). O facto de não se terem observado alterações significativas a este nível não afirma com certeza que o stresse oxidativo não intervém nos danos que a quercetina influi na linha celular Hep3B2.1-7. Se tivermos em conta que a avaliação da produção das espécies reactivas de oxigénio e que a expressão de GSH apenas foram avaliadas 48 horas após a incubação com quercetina, podemos postular que as espécies reactivas inicialmente formadas poderão estar a dar lugar a outras, ainda mais lesivas para a célula. De facto, o tempo de semi-vida dos peróxidos e do anião superóxido são geralmente curtos (Landriscina *et al.*, 2009) e, deste modo, peróxidos intracelulares poderão estar a ser convertidos em espécies mais lesivas para a célula tais como o radical hidroxilo e o peróxido de nitrito (Li *et al.*, 2007). De modo a comprovar esta hipótese, seria interessante efectuar uma avaliação da produção de espécies reactivas de oxigénio e de defesas anti-oxidantes a um tempo de incubação menor que as 48 horas, assim como avaliar a influência de outras espécies reactivas de oxigénio e de defesas anti-oxidantes neste processo.

Ao analisar os resultados obtidos através do ensaio cometa, verifica-se que, na linha celular Hep3B2.1-7, embora a incubação com quercetina não induza diferenças ao nível da percentagem de ADN na cauda do cometa (Figura 63A), consegue conduzir a um aumento no comprimento na cauda do cometa (Figura 63B) e, conseqüentemente, do momento da cauda (Figura 63C), o que nos indica que a quercetina introduz danos no ADN das células Hep3B2.1-7. Este resultado corrobora a hipótese de que a incubação com quercetina nesta linha celular pode introduzir alterações a nível da produção de espécies reactivas de oxigénio, uma vez que está descrito que a produção das mesmas normalmente conduz directa ou indirectamente a danos no ADN e conseqüentemente a morte celular por apoptose (Barrera, 2012; Kardeh *et al.*, 2014). Tendo em conta que se comprovou que a linha celular Hep3B2.1-7 não expressa P53 (Figura 55) não se procedeu à avaliação da expressão da referida proteína em resposta ao tratamento com quercetina.

Também nesta linha celular se verificou que a incubação com quercetina induziu um aumento da expressão membranar de GLUT-1, embora não ocorra uma diminuição significativa da expressão citoplasmática deste transportador (Figura 74C). Assim, nesta linha celular, para suprir as necessidades glicolíticas provenientes da inibição competitiva deste transportador, as células poderão estar

a induzir um processo de *síntese de novo* de GLUT-1. De facto, já anteriormente havia sido verificado que a privação de glicose é capaz de induzir a *síntese de novo* de GLUT-1 de uma forma dependente de AKT (von der Crone *et al.*, 2000). Consistente com este facto, observou-se que a quercetina introduziu um decréscimo bastante evidente na captação de ^{18}F -FDG por esta linha celular (Figura 76C e Tabela 19). Consegue-se inclusive verificar que de entre as linhas celulares de carcinoma hepatocelular estudadas, é na linha celular Hep3B2.1-7 que a inibição da captação de ^{18}F -FDG é mais notória. Em paralelo, denota-se que esta é a linha celular mais sensível à quercetina (maior inibição da viabilidade celular e da actividade metabólica para os tempos mais longos), o que leva a pensar que, de facto, é através da inibição competitiva do GLUT-1 que a quercetina poderá estar a actuar nas células Hep3B2.1-7.

Analisando agora os resultados obtidos com a linha celular de colangiocarcinoma, verifica-se que, de acordo com os resultados obtidos pelo ensaio do MTT, as células TFK-1 são sensíveis ao tratamento com quercetina de uma forma dependente do tempo e da concentração (Figura 39D e Tabela 17). Até à data, apenas foram publicados três estudos em que se avaliou o efeito da quercetina em linhas celulares de colangiocarcinoma (Kudo *et al.*, 1999; Kukongviriyapan *et al.*, 2006; Senggunprai *et al.*, 2013). Dentro destes, apenas em dois se avaliou o efeito da quercetina na proliferação celular, tendo-se verificado que as células deste tipo de tumor são sensíveis ao tratamento com quercetina (Kudo *et al.*, 1999; Senggunprai *et al.*, 2013). Através do ensaio clonogénico (Figura 41D) verificou-se que, também nesta linha celular, a longo prazo, a quercetina possui um efeito inibitório da sobrevivência celular. Contudo, ao contrário do que havia ocorrido para as linhas celulares de carcinoma hepatocelular, no caso das células TFK-1 não se observou uma total ausência de formação de colónias, para nenhuma das concentrações de quercetina testadas. Relativamente à análise da viabilidade celular e dos tipos de morte celular induzida, verificou-se que apenas para a maior concentração de composto ocorreu uma diminuição estatisticamente significativa da viabilidade celular, apesar de cerca de 65% das células terem permanecido viáveis (Figura 43D). Poder-se-á dizer que estes resultados estão em concordância com os obtidos no ensaio clonogénico, onde os resultados nesta linha celular também foram menos promissores do que nas linhas celulares de carcinoma hepatocelular. Porém, já havia sido demonstrado anteriormente que a quercetina é capaz de inibir a proliferação celular sem, no entanto, interferir com a sua viabilidade (Zamin *et al.*, 2009). Contudo, outras hipóteses se poderão colocar, por exemplo, em linhas celulares de outros tipos de cancro, demonstrou-se que a quercetina foi capaz de induzir o processo de autofagia (Kim *et al.*, 2011). Apesar

disso, verifica-se que a incubação com 100 μ M de quercetina foi capaz de induzir morte celular em cerca de 35% das células, maioritariamente por apoptose. Concordante com este resultado está o facto de o tratamento com quercetina induzir um aumento da razão BAX/BCL-2 (Figura 45D). É importante referir, neste contexto, que está descrito na literatura (Saijo *et al.*, 1995) e os nossos resultados comprovaram (Figuras 14 e 55 e Tabela 6) que a linha celular TFK-1 não expressa P53. Contudo, tal como referenciado para as células Hep3B2.1-7, alguns autores defendem que a quercetina é capaz de induzir apoptose através de um mecanismo independente da P53, induzindo um aumento da expressão de BAX e, concomitante, diminuição da expressão de BCL-2 (Chien *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2014). Ao que tudo indica, este processo poderá estar a ocorrer nas células TFK-1. Apesar disso, a incubação com quercetina não introduziu alterações a nível da população celular em fase pré-G0, o que poderá corroborar o facto de a morte celular não ser assim tão evidente (Figura 47D). No entanto, para a maior concentração de quercetina utilizada observou-se uma diminuição da população celular em fase S. De referir também a tendência para um aumento gradual da população em fase G2/M, facto que está de acordo com o descrito na literatura pois, como mencionado anteriormente, vários estudos já demonstraram que a quercetina é capaz de induzir paragens nesta fase do ciclo celular (Nomura *et al.*, 2008; Bishayee *et al.*, 2013).

Relativamente ao stresse oxidativo, a incubação com quercetina não introduziu alterações na produção de peróxidos intracelulares (Figura 49D) observando-se, no entanto, um aumento significativo na produção intracelular de anião superóxido (Figura 51D). Já no que diz respeito à expressão de GSH, também não se observaram diferenças estatisticamente significativas (Figura 53D), tal como seria de prever, uma vez que não ocorreram diferenças na produção de peróxidos. Porém, esta aparente ausência de efeito da quercetina a nível do stresse oxidativo não implica que o mesmo não possua nenhum papel a nível dos efeitos observados nas células TFK-1. Tal como discutido anteriormente para a linha celular Hep3B2.1-7, nesta fase da experiência (48 horas após a incubação com o composto), as espécies reactivas medidas poderão já ter dado lugar a outras mais reactivas, por exemplo, através da reacção de Fenton/Haber Weiss (Li *et al.*, 2007).

Pelo facto da linha celular TFK-1 não expressar P53 não se avaliou o efeito da quercetina a nível da expressão desta proteína nesta linha celular. Contudo efectuou-se o ensaio cometa com vista a determinar se este composto induz danos no ADN nestas células. De facto, observou-se que a quercetina causa danos no ADN da linha celular TFK-1, uma vez que a incubação com a mesma conduziu a um

aumento nos valores determinados para todos os parâmetros estudados, isto é, percentagem de ADN na cauda, comprimento da cauda e, conseqüentemente, momento da cauda (Figura 65). Estes resultados reforçam a hipótese de que a quercetina poderá estar a induzir alterações na produção de ROS que directa ou indirectamente irão lesar o ADN. Curiosamente, constatou-se que os danos causados no ADN nas células TFK-1 foi superior ao causado em qualquer uma das células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular.

Relativamente à expressão de GLUT-1, à semelhança do que foi descrito para as células Hep3B2.1-7, a incubação com quercetina conduziu a um aumento na sua expressão membranar sem no entanto se observarem alterações na expressão citoplasmática (Figura 74D). Em paralelo, observou-se que a quercetina foi capaz de induzir uma diminuição significativa na captação de ^{18}F -FDG (Figura 76D e Tabela 19). Em conjunto, estes dados indicam que a quercetina induz uma inibição competitiva do GLUT-1 nas células TFK-1 que, por sua vez, induzem um processo de síntese desta proteína com vista a suprir as necessidades glicolíticas decorrentes deste processo (von der Crone *et al.*, 2000; Vera *et al.*, 2001; Furuta *et al.*, 2011).

Em suma, os resultados por nós obtidos indicam que a quercetina é, de facto, um inibidor competitivo do GLUT-1, conseguindo comprometer a entrada de ^{18}F -FDG e, por analogia, de glicose em todas as linhas celulares em estudo. Por consequência, poderá ocorrer a indução de stresse oxidativo o que dará origem a danos no ADN. Decorrente deste mecanismo é despoletado um processo de morte que, na maioria das vezes, é a apoptose de uma maneira independente da P53.

Inibidores competitivos do GLUT-1: gossipol

À semelhança da quercetina, o gossipol também tem sido indicado como um inibidor competitivo do GLUT-1 e o seu efeito anti-cancerígeno já foi alvo de estudo em diversos tipos de tumores. Neste trabalho foi também avaliado o efeito deste composto nas linhas celulares de carcinoma hepatocelular e de colangiocarcinoma (Amann & Hellerbrand, 2009; Ojeda *et al.*, 2009; Hsiao *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013; Yuan *et al.*, 2013).

A análise dos resultados obtidos através da incubação das linhas celulares em estudo demonstrou que, também o gossipol, possui acção inibitória da actividade metabólica em todas as linhas celulares (Figura 40 e Tabela 18). Para

além disso, esse efeito parece ser mais notório do que aquele que foi obtido com a quercetina, pois para todas as linhas celulares os valores de IC₅₀ determinados para o gossipol foram menores do que os obtidos para a quercetina (Tabelas 17 e 18).

Analisando individualmente a linha celular HepG2, constata-se que o gossipol possui um efeito inibitório da actividade metabólica dependente da concentração e do tempo de incubação (Figura 40A e Tabela 18). Os resultados obtidos através do ensaio clonogénico revelaram que esse efeito é permanente para tempos de incubação mais longos (Figura 42A). Verificou-se que a incubação com diferentes concentrações de gossipol induziu uma diminuição progressiva no factor de sobrevivência celular, sendo que o mesmo atinge o valor nulo para a maior concentração de gossipol utilizada. De facto, o efeito inibitório na capacidade de formação de colónias já havia sido anteriormente demonstrado noutra tipo de células (Wang *et al.*, 2000). A análise da viabilidade celular demonstrou que o tratamento com gossipol não apenas induz diminuição da actividade metabólica, como também conduz a uma diminuição da viabilidade celular (Figura 44A). Esta última é acompanhada por morte celular maioritariamente por apoptose e, de facto, são diversos os estudos que indicam que o gossipol é capaz de induzir morte celular através deste mecanismo (Hou *et al.*, 2004; Bauer *et al.*, 2005). No entanto, os resultados obtidos revelaram que o tratamento das células HepG2 com gossipol não introduziu alterações ao nível da razão BAX/BCL-2 (Figura 46A). Não obstante alguns estudos evidenciarem que estas proteínas poderão estar envolvidas na morte celular por apoptose induzida pelo gossipol (Wang *et al.*, 2000; Balakrishnan *et al.*, 2008), outros autores indicam que este tipo de morte pode ser independente das mesmas apesar de poderem estar envolvidas outras moléculas da família BCL-2. Mais precisamente, este composto é capaz de induzir uma diminuição da expressão das proteínas anti-apoptóticas BCL-XL (Kitada *et al.*, 2003; Oliver *et al.*, 2005; Lei *et al.*, 2006; Meng *et al.*, 2008) e MCL-1 (Etxebarria *et al.*, 2008). Coincidente, com a morte celular por apoptose, através da análise do ciclo celular (Figura 48A) constatou-se que a incubação com gossipol foi capaz de induzir o aparecimento do pico pré-G0, tal como havia sido referenciado por outros autores noutras linhas celulares (Wang *et al.*, 2000). Para além disso, ao nível do ciclo celular o gossipol não induziu grandes alterações na linha celular HepG2, observando-se apenas uma tendência para um decréscimo da população celular na fase G0/G1 acompanhada por uma tendência para um aumento da percentagem de células em fase S (Figura 48A).

A dualidade do gossipol enquanto composto anti/pró-oxidante já foi anteriormente referida (Kovacic, 2003). Nesse sentido avaliou-se a produção de

peróxidos e de anião superóxido assim como a expressão de GSH em resposta à incubação com este composto. De facto, para as células HepG2 verificou-se que a incubação com gossipol conduziu a um decréscimo bastante evidente na produção de peróxidos para as duas maiores concentrações de gossipol testadas (Figura 50A). À semelhança do que ocorreu com a quercetina, apenas estamos a avaliar a produção de peróxidos 48 horas após a incubação com gossipol, sendo possível que os peróxidos anteriormente produzidos e, em particular, o peróxido de hidrogénio já se tenham convertido noutras espécies reactivas tais como o radical hidroxilo que é bastante lesivo para a célula. De facto, a capacidade do gossipol induzir a produção de radical hidroxilo já é bem conhecida (Laughton *et al.*, 1989), podendo estar a ocorrer nas células HepG2. O decréscimo na produção de peróxidos foi acompanhado, para a maior concentração de gossipol utilizada, de um decréscimo na expressão de GSH (Figura 54A). Com efeito, tendo a GSH a função de neutralizar o peróxido de hidrogénio (Hedley & Chow, 1994), a diminuição da produção do mesmo conduz, por consequência, a uma menor necessidade de expressão desta defesa anti-oxidante. Os resultados obtidos demonstraram ainda que o tratamento com a concentração de gossipol correspondente ao IC₅₀ levou a um aumento na produção de anião superóxido (Figura 52A). Também o aumento da produção de anião superóxido em resposta ao tratamento com gossipol já foi descrita em outros trabalhos, podendo decorrer, como consequência, da diminuição da expressão de superóxido dismutase (Hedley & Chow, 1994).

Paralelamente observou-se que o tratamento com gossipol induziu danos a nível do ADN das células HepG2, uma vez que a maior concentração deste composto conduziu a um aumento do comprimento da cauda do cometa (Figura 67B) e, conseqüentemente, a um aumento no momento da cauda (Figura 67D). De facto, já havia sido comprovado que o gossipol é capaz de induzir quebras no ADN como consequência da produção de espécies reactivas de oxigénio, o que poderá estar correlacionado com a indução da apoptose (Quintana *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2006; Ko *et al.*, 2007). Contudo, apesar de todos os resultados anteriormente descritos e de a morte celular ocorrer por apoptose, a incubação com gossipol não induziu diferenças significativas na expressão de P53 (Figura 57A). Mais uma vez, apenas se quantificou a forma total desta proteína não se podendo afirmar, com certeza, que não tenham ocorrido alterações na activação da mesma. Por outro lado, já em 2000 Wang e colaboradores haviam demonstrado que o gossipol é capaz de induzir a apoptose em células de cancro do cólon de uma maneira independente da P53, podendo estar a ocorrer algo semelhante na linha celular HepG2 (Wang *et al.*, 2000).

Tal como a quercetina, também o gossipol está descrito como sendo um inibidor competitivo do GLUT-1 (Pérez *et al.*, 2009). Consistente com isto, os nossos resultados demonstraram que a incubação com gossipol conduziu a um aumento na expressão membranar deste transportador com paralela tendência para aumento da expressão citoplasmática do mesmo (Figura 75A). Por outro lado, os estudos de captação de ^{18}F -FDG demonstraram que a incubação com este composto induziu um decréscimo na captação do referido radiofármaco (Figura 77A e Tabela 20). Assim e em conjunto estes resultados indicam que o gossipol induz uma inibição competitiva do GLUT-1 inibindo, deste modo, a sua função o que conduz a um decréscimo na captação do análogo radiomarcado da glicose. De modo a suprir as necessidades glicolíticas decorrentes deste processo as células HepG2 tendem a induzir uma *síntese de novo* deste transportador.

De acordo com os resultados obtidos através do ensaio do MTT, também a linha celular HuH7 é sensível ao tratamento com gossipol de uma forma dependente da concentração de composto e do tempo de incubação (Figura 40B e Tabela 18). Apesar desta linha celular ser aquela que apresentou menor sensibilidade nos dois menores tempos de incubação, o ensaio clonogénico revelou que o efeito do gossipol não é reversível, isto é, após 12 dias de incubação com este composto verificou-se que o gossipol induziu um decréscimo na sobrevivência celular bastante evidente, em que com a maior concentração de composto utilizada as células perderam a capacidade de formar colónias (Figura 42B). Algo semelhante havia sido observado com as células HepG2 e também em outras linhas celulares de cancro do cólon (Wang *et al.*, 2000). Para além disso, verificou-se que a incubação com gossipol foi capaz de induzir uma diminuição bastante significativa da viabilidade celular acompanhada por uma activação de morte celular, maioritariamente por apoptose tardia/necrose (Figura 44B). De facto, a dupla marcação com anexina V e iodeto de propídeo não consegue distinguir entre células em apoptose tardia e em necrose, pois ambas podem apresentar marcação positiva tanto para a anexina V como para o iodeto de propídeo (Rieger *et al.*, 2011). No entanto, neste caso em específico, os resultados obtidos das análises subsequentes indicaram que o tipo de morte celular predominante é a apoptose, isto porque o tratamento com a maior concentração de gossipol conduziu a uma tendência bastante evidente para o aumento da razão BAX/BCL-2 (Figura 46B) acompanhado por um aumento significativo da população celular na fase pré-G0 do ciclo celular (Figura 48B). Em suma, em concordância com a indução de morte celular por apoptose observou-se um aumento da expressão de BAX e a diminuição da expressão de BCL-2, assim como o aparecimento do pico apoptótico. Estes achados já haviam sido reportados por outros autores em linhas celulares de

outros tipos de cancro (Wang *et al.*, 2000; Kang & Reynolds, 2009). Para além disso, observou-se também que a incubação com gossipol induziu uma diminuição das populações celulares nas fases S e G0/G1 do ciclo celular (figura 48B). Em concordância com este resultado está o facto do gossipol já ter sido descrito anteriormente como um inibidor da síntese de ADN, o que poderá explicar, pelo menos em parte, a diminuição da população celular em fase S (Wang & Rao, 1984).

À semelhança do que se havia observado com as células HepG2, também na linha celular HuH7 a incubação com concentrações crescentes de gossipol conduziu a um decréscimo progressivo na produção de peróxidos (Figura 50B) acompanhado por um decréscimo na produção de GSH (Figura 54B) e por um aumento na produção de anião superóxido (Figura 52B). Assim, à semelhança do que ocorreu para as células HepG2, e de acordo com o que foi anteriormente descrito na literatura, os resultados indicam que após 48 horas de incubação com gossipol ocorre uma diminuição na produção de peróxidos intracelulares, apesar do peróxido de hidrogénio poder estar a ser convertido em radical hidroxilo (Laughton *et al.*, 1989). A acompanhar a diminuição da produção de peróxidos ocorre uma diminuição na expressão de GSH, uma vez que havendo menos peróxido de hidrogénio disponível, a célula já não tem tanta necessidade de o neutralizar. Concordante com a possibilidade da indução de stresse oxidativo está o facto de o tratamento com gossipol ter induzido danos no ADN das células HuH7, embora de uma forma menos evidente do que nas células HepG2 (Figura 69). De facto, já em resposta ao tratamento com quercetina, esta foi a linha celular que apresentou menos danos no ADN. Tal como ocorreu com a quercetina e nas células HepG2 quando incubadas com gossipol, os dados indicam que a indução da apoptose pelo gossipol na linha celular HuH7 parece ser independente da P53, uma vez que a incubação com este composto conduziu a uma diminuição da expressão desta proteína (Figura 57B).

Já em relação à expressão do transportador de glicose 1, o tratamento da linha celular HuH7 com gossipol induziu um aumento da expressão membranar deste transportador, sendo que no citoplasma se observou um aumento bastante evidente da expressão do mesmo para a maior concentração de composto (Figura 75B). Concomitante com estes resultados observou-se que a incubação com gossipol induziu um decréscimo bastante evidente na captação de ^{18}F -FDG (Figura 77B e Tabela 20). Assim, os resultados indicam que, na linha celular HuH7, o gossipol está a inibir competitivamente o GLUT-1 o que conduz a uma inibição da sua função e conseqüente decréscimo na capacidade de captar ^{18}F -FDG e, por analogia, glicose. Para além disso, de modo a suprir as suas necessidades glicolíticas, as células promovem a síntese de mais transportadores de glicose 1 no

citoplasma que posteriormente poderão ser recrutados para a membrana onde exercerão a sua função.

Em relação à linha celular Hep3B2.1-7, os resultados do ensaio do MTT demonstraram que esta linha celular é aquela que apresentou maior sensibilidade ao tratamento com gossipol (Figura 40C e Tabela 18). De facto, foi nas células Hep3B2.1-7 que se observou uma maior inibição da actividade metabólica. Esta ocorrência é particularmente interessante, uma vez que esta linha celular não expressa P53 (Bressac *et al.*, 1990; Kaino, 1997; Zhu *et al.*, 2004), o que à partida lhe confere maior agressividade. Em concordância com os resultados do teste do MTT, o ensaio clonogénico demonstrou que uma concentração de apenas 0,25 μM de gossipol induziu uma diminuição de cerca de 30% da sobrevivência celular, que aumentou para cerca de 65% quando se incubaram as células com 1 μM , observando-se uma total ausência de formação de colónias para a maior concentração testada (Figura 42C). Estes resultados evidenciam que o efeito que o gossipol possui nas células Hep3B2.1-7 é permanente ao longo do tempo, logo não reversível.

A análise da viabilidade celular demonstrou que o gossipol induz um decréscimo significativo da mesma acompanhado por activação da morte celular por apoptose inicial e apoptose tardia/necrose (Figura 44C). De facto, a activação dos mecanismos de morte celular por apoptose em resposta a este composto estão já bem descritos, parecendo ser a apoptose o tipo de morte preferencialmente induzido pelo gossipol (Kitada *et al.*, 2003; Oliver *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2013). A indução da morte celular por apoptose numa linha celular que não expressa a P53 não seria, a nível teórico, o resultado mais previsível. Contudo, como já referenciado anteriormente, outros autores demonstraram que o gossipol é capaz de activar a morte celular por apoptose através do aumento da expressão de BAX e diminuição da BCL-2 de uma forma independente da P53 (Wang *et al.*, 2000). Em concordância, também neste trabalho experimental foi possível verificar que nas células Hep3B2.1-7, em resposta ao tratamento com gossipol, ocorreu um aumento da razão BAX/BCL-2 (Figura 46C). Ainda em conformidade com a activação da morte celular por apoptose, verificou-se que a incubação com gossipol conduziu, no ciclo celular, ao aparecimento do pico pré-G0, o pico apoptótico (Figura 48C). Já num estudo de 2008, Moon e colaboradores haviam demonstrado que nesta linha celular a incubação com gossipol induz o aparecimento do pico apoptótico (Moon *et al.*, 2008). Relativamente a outras alterações induzidas pelo gossipol no ciclo celular, observou-se uma tendência para o aumento da população em fase S, acompanhada por uma tendência de diminuição da população celular na fase G0/G1 (Figura 48C).

Também nesta linha celular, o stresse oxidativo parece ter um papel activo no efeito produzido pelo gossipol. Neste sentido, embora para as duas primeiras concentrações testadas não se tenham observado diferenças relativamente ao controlo, no que diz respeito à produção de peróxidos, a incubação com 15 μM de gossipol induziu um decréscimo bastante evidente (Figura 50C). Em concordância, a incubação com as duas maiores concentrações deste composto conduziu a um decréscimo significativo na expressão de GSH (Figura 54C). Mais uma vez, postula-se aqui a hipótese do peróxido de hidrogénio estar a ser convertido em radical hidroxilo, o que leva a uma diminuição nos níveis de peróxidos medidos e, conseqüentemente, é mais diminuta a necessidade de expressar GSH. Relativamente à produção de anião superóxido, nesta linha celular, a incubação com gossipol não introduziu alterações (Figura 52C).

A análise dos resultados obtidos através do ensaio cometa demonstrou que o gossipol induziu, de uma forma bastante evidente, danos no ADN das células Hep3B2.1-7 (Figura 71). De facto, a incubação com ambas as concentrações de composto utilizadas conduziu a aumentos bastante significativos em todos os parâmetros analisados, ou seja, percentagem de ADN na cauda (Figura 71A), comprimento da cauda (Figura 71B) e momento da cauda (Figura 71C). Mais uma vez, se coloca a possibilidade da incubação com gossipol induzir a produção de espécies reactivas de oxigénio, mais precisamente de peróxido de hidrogénio e, posteriormente, de radical hidroxilo que irá lesar o ADN. Na realidade, o radical hidroxilo é tido como um dos principais responsáveis pelos danos causados no ADN através do stresse oxidativo mediado por exposição a estímulos tais como radiação e compostos pró-oxidantes (Balasubramanian *et al.*, 1998). Mais uma vez, este processo parece ser independente da proteína P53, uma vez que esta não é expressa pelas células Hep3B2.1-7 (Figuras 14 e 55 e Tabela 6).

Relativamente ao GLUT-1, a incubação com gossipol afecta a sua expressão e a sua funcionalidade nas células Hep3B2.1-7, já que de acordo com os resultados obtidos, se verificou que a incubação com este composto conduziu a um aumento da sua expressão membranar e também citoplasmática (Figura 75C). Por sua vez, através dos estudos de captação de ^{18}F -FDG verificou-se que a incubação com gossipol conduziu a um decréscimo na captação de ^{18}F -FDG (Figura 77C e Tabela 20). Assim, à semelhança do que havia sido descrito para as células HuH7, também na linha celular Hep3B2.1-7 a incubação com gossipol parece conduzir a uma inibição competitiva do GLUT-1 o que se reflecte num decréscimo da sua funcionalidade, comprovado pelo decréscimo da captação de ^{18}F -FDG. Para além disso, de modo a suprir as suas necessidades glicolíticas as células induzem uma maior expressão deste transportador. Como já havia sido referenciado

anteriormente, sabe-se que a privação de glicose é capaz de induzir a *síntese de novo* deste transportador de uma forma dependente de AKT (von der Crone *et al.*, 2000).

De acordo com a literatura, este é o primeiro estudo que avalia o efeito do gossipol numa linha celular de colangiocarcinoma e o que se verificou, através do ensaio do MTT, foi que à semelhança do que se havia observado para as linhas celulares de carcinoma hepatocelular, também as células TFK-1 são sensíveis ao tratamento com gossipol de uma forma dependente do tempo de incubação e da concentração de composto (Figura 40D e Tabela 18). Também o ensaio clonogénico revelou que esse efeito é persistente ao longo do tempo, uma vez que as duas maiores concentrações de composto conduziram a uma diminuição drástica do factor de sobrevivência, sendo que, inclusivamente, este se anulou quando as células foram incubadas com 15 μ M de gossipol (Figura 42D). O efeito do gossipol na capacidade de formação de colónias de linhas celulares tumorais foi descrito por nós, ao longo deste trabalho experimental, para as linhas celulares de carcinoma hepatocelular, e também por Wang e colaboradores em linhas celulares de cancro do cólon (Wang *et al.*, 2000).

O efeito do gossipol na inibição da actividade metabólica e da sobrevivência celular das células TFK-1 foi acompanhado por um decréscimo bastante evidente na viabilidade celular (Figura 44D). Por sua vez, o tratamento com este composto induziu morte celular por apoptose inicial e por apoptose tardia/necrose, que foi acompanhada por um aumento na razão BAX/BCL-2 (Figura 46D) e pelo aparecimento do pico apoptótico no ciclo celular (Figura 48D). É sabido, e por nós também demonstrado neste trabalho experimental (Figuras 14 e 55 e Tabela 6) que a linha celular TFK-1 não expressa P53 (Saijo *et al.*, 1995; Jia *et al.*, 1997; Tanno *et al.*, 2004) e, nesse sentido, também nesta linha celular e à semelhança do observado por Wang e colaboradores (Wang *et al.*, 2000) a apoptose poderá estar a ser mediada pelo aumento da expressão de BAX e diminuição da expressão de BCL-2 de uma maneira independente da P53. Por outro lado, a resistência à apoptose, através da sobreexpressão das proteínas anti-apoptóticas BCL-XL e MCL-1, é uma característica do colangiocarcinoma (Okaro *et al.*, 2001). Sabe-se também que o gossipol é capaz de induzir uma diminuição dessas proteínas e, por consequência, de activar o processo de apoptose (Kitada *et al.*, 2003; Oliver *et al.*, 2005; Lei *et al.*, 2006; Etxebarria *et al.*, 2008; Meng *et al.*, 2008), pelo que seria de extremo interesse, no contexto do colangiocarcinoma, o estudo do envolvimento das proteínas BCL-XL e MCL-1 na apoptose induzida por gossipol. A análise do ciclo celular revelou ainda uma tendência para a diminuição da população celular na fase G2/M à medida que se aumentou a concentração de gossipol (Figura 48D).

A maior concentração de gossipol utilizada conduziu também a uma diminuição bastante expressiva na produção de peróxidos intracelulares (Figura 50D) que foi acompanhada por uma tendência para uma diminuição nos níveis de expressão de GSH (Figura 54D). Também a produção de anião superóxido aumentou em resposta ao tratamento com gossipol (Figura 52D). Por outro lado, a incubação com gossipol induziu danos no ADN das células TFK-1, uma vez que o tratamento com este composto conduziu a um aumento dos valores obtidos para a percentagem de ADN na cauda do cometa (Figura 73A), comprimento da cauda do cometa (Figura 73B) e do momento da cauda do cometa (Figura 73C). Todos estes resultados parecem estar correlacionados, uma vez que a diminuição abrupta na produção de peróxidos poderá indicar que, nomeadamente, o peróxido de hidrogénio está a ser convertido em radical hidroxilo que, por sua vez, irá causar danos no ADN. A indução da produção de radical hidroxilo pelo gossipol assim como os danos que este provoca no ADN já haviam sido anteriormente descritos (Li *et al.*, 2000; Dodou, 2005). Tal como referido anteriormente é sabido, e nós comprovamos, que as células TFK-1 não expressam P53 (Figuras 14 e 55 e Tabela 6), o que mais uma vez reforça a ideia que todo o processo consequente da indução de danos no ADN das células TFK-1 é independente desta proteína.

No que diz respeito à relação entre a expressão do transportador de glicose 1 e a tumorigénese do colangiocarcinoma pouco ou nada se sabe, reforçando a importância do estudo desta temática. Através da análise da expressão de GLUT-1 em resposta ao tratamento com gossipol, verificou-se que ambas as fracções (citoplasmática e membranar) aumentaram à medida que aumenta a concentração de gossipol testada (Figura 75D). À semelhança do que ocorreu com as linhas celulares de carcinoma hepatocelular, também nas células TFK-1 a incubação com gossipol induziu um decréscimo na captação de ^{18}F -FDG (Figura 77D e Tabela 20), postulando a hipótese de que também nesta linha celular o gossipol inibe competitivamente o GLUT-1 comprometendo a sua função. Em consequência, as células tendem a induzir a *síntese de novo* deste transportador para suprir as suas necessidades glicolíticas.

De um modo geral, para as linhas celulares de tumores primitivos do fígado em estudo, a incubação com gossipol induziu a inibição competitiva do GLUT-1 e, por consequência, conduziu a um decréscimo na captação de ^{18}F -FDG e, por analogia, de glicose. Em resposta à privação glicolítica, os resultados indicam que ocorreu stresse proteico o que, por consequência, conduziu a danos no ADN das linhas celulares em estudo culminando num processo de morte celular, maioritariamente por apoptose, de um modo independente da P53.

Terapia combinada

Actualmente torna-se cada vez mais necessário investigar novas terapias para o tratamento do cancro, pois a eficácia dos tratamentos regularmente utilizados atingiu um patamar que se tem mantido estável. Nesse sentido, tem sido utilizada a combinação de vários fármacos com o intuito de obter efeitos sinérgicos ou potenciadores e diminuir os efeitos secundários induzidos por cada fármaco individualmente. Em oncologia, para além do referido, a utilização da terapia combinada tem como base a possibilidade de se atingir ao mesmo tempo vários alvos da doença (Chou, 2007).

Para além da associação entre fármacos normalmente utilizados em quimioterapia no tratamento oncológico, tem também sido algo de profunda investigação o efeito combinado entre os referidos fármacos e alguns promissores compostos naturais tais como a quercetina e o gossipol (Bauer *et al.*, 2005; Meng *et al.*, 2008; Uzoigwe & Sauter, 2012; Chan *et al.*, 2013). E foi este o racional de ao longo deste trabalho experimental ter sido também estudado o potencial efeito terapêutico da combinação da quercetina e do gossipol com o sorafenib e a doxorubicina.

Através da utilização do método de Chou-Talalay (Chou & Talalay, 1984) conseguimos constatar que para todas as linhas celulares de carcinoma hepatocelular em estudo o tratamento combinado de quercetina com sorafenib induziu um efeito sinérgico. Por sua vez, a combinação destes dois compostos no tratamento da linha celular de colangiocarcinoma conduziu a um efeito antagónico (Figura 78 e Tabelas 21 e 22). Existem dois mecanismos possíveis através dos quais o tratamento com estes dois compostos pode estar a induzir sinergia nas linhas celulares de carcinoma hepatocelular. Por um lado, tal como o sorafenib, a quercetina também pode actuar enquanto inibidor da actividade de tirosinas cinases (Akiyama *et al.*, 1987; Chen *et al.*, 2010) e, neste sentido, ambos podem actuar sinergicamente através deste mecanismo. Por outro lado, uma hipótese ainda mais auspiciosa demonstra que a quercetina consegue inibir o EGFR, sendo que a sobreexpressão deste receptor é a principal responsável pela resistência que alguns carcinomas hepatocelulares apresentam ao sorafenib. Desta forma, a quercetina consegue sensibilizar as células de carcinoma hepatocelular para o tratamento com sorafenib (Jung *et al.*, 2010; Ezzoukhry *et al.*, 2012). Neste sentido, seria interessante numa fase futura avaliar o efeito da quercetina na expressão de EGFR das linhas celulares de carcinoma hepatocelular em estudo. Relativamente à linha celular de colangiocarcinoma, como referido, o tratamento combinado da quercetina com o sorafenib induziu um efeito antagónico. Este resultado poderá

estar correlacionado com o facto de, intrinsecamente, esta ser a linha celular mais resistente ao tratamento isolado com quercetina (Figura 78D e Tabela 21). Por outro lado este resultado indica que a acção combinada da quercetina com o sorafenib varia de acordo com o tipo de cancro em estudo, o que enfatiza a necessidade de utilização de uma terapêutica personalizada.

De modo semelhante ao que ocorreu para a quercetina, também com o tratamento combinado do gossipol com o sorafenib se obteve sinergia para todas as linhas celulares de carcinoma hepatocelular em estudo, mas não para a linha celular de colangiocarcinoma (Figura 79 e Tabelas 23 e 24). Um trabalho de 2012 demonstrou que o gossipol é capaz de sensibilizar as células de carcinoma da próstata para o sorafenib através da sub-regulação da proteína anti-apoptótica MCL-1 e, por consequência, a incubação com estes dois compostos induziu efeito sinérgico. Curiosamente, dependendo da linha celular esta combinação induziu morte celular por apoptose ou por autofagia (Lian *et al.*, 2012). Ora, é sabido que a sobre-expressão da MCL-1 também é uma característica comum no carcinoma hepatocelular (Fleischer *et al.*, 2006; Fabregat, 2009) e, assim, também nas linhas celulares de carcinoma hepatocelular estudadas o gossipol poderá estar a sensibilizar as células para o sorafenib através da sub-regulação desta proteína. No que diz respeito à linha celular TFK-1, tal como havia sido observado para o tratamento combinado da quercetina com o sorafenib, também o tratamento com gossipol e sorafenib induziu um efeito antagónico (Tabela 24). Não deixa de ser um paradoxo, uma vez que a sobreexpressão de MCL-1 é também uma característica comum observada no colangiocarcinoma (Okaro *et al.*, 2001). Contudo, não existem evidências práticas que nos permitam explicar qualquer explicação para este facto.

Respeitante ao tratamento combinado de doxorrubicina com a quercetina, apenas se observou sinergia para as linhas celulares HepG2 e TFK-1 (Figura 80 e Tabelas 25 e 26). Num estudo de 2012 efectuado em linhas celulares de carcinoma hepatocelular demonstrou-se que a quercetina é capaz de sensibilizar as células deste tipo de cancro para a doxorrubicina, protegendo as células normais (Wang *et al.*, 2012). Esse efeito ocorreu através da diminuição da expressão de BCL-XL de uma forma dependente da P53, tendo-se verificado que a utilização de um inibidor da P53 diminuiu os efeitos da quercetina sobre a apoptose mediada pela doxorrubicina (Wang *et al.*, 2012). Tendo em conta que de entre as linhas celulares de carcinoma hepatocelular em estudo a HepG2 é a única que expressa a forma normal da P53, os resultados de Wang e colaboradores vão de encontro aos obtidos neste trabalho. No entanto, para a linha celular TFK-1, que não expressa P53, também se obteve efeito sinérgico através do tratamento destas células com a

quercetina e a doxorrubicina. Porém, outros mecanismos poderão estar envolvidos na resposta ao tratamento combinado de quercetina com a doxorrubicina. De facto, uma das vias através das quais o gossipol consegue sensibilizar as células tumorais para a acção dos fármacos utilizados em quimioterapia envolve a PUMA e a NOXA, duas proteínas pró-apoptóticas da família BCL-2, sendo reconhecido que o efeito sinérgico através da acção destas proteínas pode ser dependente, mas também independente da P53 (Meng *et al.*, 2008).

Por fim, o tratamento combinado de gossipol com a doxorrubicina induziu efeito sinérgico em todas as linhas celulares em estudo com excepção das células HuH7 (Figura 81 e Tabelas 27 e 28). Também neste sentido, estudos anteriores revelaram que o gossipol é capaz de sensibilizar as células para a acção da doxorrubicina através de uma sub-regulação de proteínas anti-apoptóticas tais como a BCL-XL e a MCL-1 (Li *et al.*, 2008; Lestini *et al.*, 2009). Ora é sabido, e já foi referenciado várias vezes, que os tumores primários do fígado normalmente sobreexpressam estas proteínas (Okaro *et al.*, 2001; Fabregat, 2009), podendo ser através deste mecanismo que a sinergia possa estar a ocorrer. O facto de na linha celular HuH7 se ter observado um efeito antagónico, no que diz respeito ao tratamento combinado de gossipol com a doxorrubicina, mais uma vez enfatiza a necessidade de se tratar cada tumor individualmente, reforçando a ideia da adopção de uma medicina cada vez mais personalizada.

Terapia génica

É sabido que o GLUT-1 está presente na grande maioria dos tecidos normais, contudo, actualmente sabe-se também que este está sobreexpresso em diversas neoplasias (Amann & Hellerbrand, 2009). Para além disso, considera-se actualmente que elevados níveis de expressão deste transportador nas células tumorais não é apenas consequência da elevada taxa glicolítica que as mesmas apresentam. Ao que tudo indica, a sobreexpressão deste transportador traduz informação que vai para além do elevado índice metabólico da célula, existindo inclusivamente autores que defendem que o mesmo actua como um oncogene em diversos tipos de tumores (Evans *et al.*, 2008; Amann & Hellerbrand, 2009; Amann *et al.*, 2009; Furuta *et al.*, 2010). No caso dos tumores primários do fígado, alguns estudos indicam que o GLUT-1 se encontra sobreexpresso no carcinoma hepatocelular promovendo a tumorigénese (Chen *et al.*, 2002; Amann &

Hellerbrand, 2009; Amann *et al.*, 2009). Em 2009, Amann e colaboradores demonstraram que através da inibição da expressão deste transportador se consegue reduzir a tumorigénese em culturas celulares de carcinoma hepatocelular (Amann *et al.*, 2009). Deste modo, foi uma tarefa primordial deste trabalho experimental promover a inibição génica do GLUT-1. Na impossibilidade de efectuar o procedimento em todas as linhas celulares em estudo escolheu-se a HuH7, pois, de acordo com os resultados por nós previamente obtidos, é de entre as linhas celulares em estudo, aquela que mais expressa este transportador na membrana celular.

Através dos resultados obtidos por *western blot* conseguimos constatar que a inibição por nós induzida foi bem-sucedida, isto porque a expressão proteica de GLUT-1 da nova linha celular é cerca de 6 vezes inferior à da linha celular parental (Figura 82). De seguida procedeu-se à comparação entre a actividade metabólica da linha celular parental e da linha celular transfectada, e o que se verificou foi que, para todos os tempos de incubação analisados, a actividade metabólica da linha celular transfectada é sempre inferior à da linha celular que lhe deu origem, e que essa diferença se vai acentuando à medida que se aumenta o tempo de incubação (Figura 83). Este resultado é bastante promissor e corrobora os resultados anteriormente obtidos por Amann e colaboradores (Amann *et al.*, 2009). De facto, poderemos dizer que a inibição do GLUT-1 reduziu significativamente a actividade metabólica da linha celular HuH7 e, por consequência, a sua capacidade proliferativa. Algo semelhante já havia sido observando por Chen e colaboradores, que ao utilizarem outra estratégia de inibição do GLUT-1 verificaram que a mesma induziu um decréscimo de 50% da capacidade proliferativa das células HepG2 (Chen *et al.*, 2002).

Outros autores defendem ainda que existe uma ligação entre a expressão de GLUT-1 e a resistência à quimioterapia característica de alguns tipos de tumores, nomeadamente, a sobreexpressão deste transportador poderá estar correlacionada com a resistência à apoptose (Evans *et al.*, 2008; Amann & Hellerbrand, 2009; Amann *et al.*, 2009). De modo a comprovar esta hipótese, foram efectuados estudos na linha celular transfectada com os fármacos anteriormente testados na linha celular parental. Ao incubar a nova linha celular com os valores de IC₅₀ da cisplatina, da doxorubicina, do 5-Fluorouracilo e do sorafenib anteriormente obtidos para a linha celular mãe verificou-se que, à excepção da cisplatina, todos eles induziram uma inibição da actividade metabólica da linha celular transfectada maior do que 50% (Figura 84). A análise da viabilidade celular transmitiu resultados ainda mais promissores, uma vez que tanto a doxorubicina, como o 5-Fluorouracilo e o sorafenib induziram, de facto, uma inibição da

viabilidade celular superior a 50% (Figura 85). Para além disso, constatou-se que os referidos fármacos induziram morte celular por apoptose inicial ou por apoptose tardia/necrose, reforçando a hipótese proposta por alguns autores de que a inibição do GLUT-1 consegue reverter a resistência à apoptose (Evans *et al.*, 2008; Amann & Hellerbrand, 2009; Amann *et al.*, 2009).

Em suma, estes resultados indicam que o GLUT-1 poderá ter um papel activo na tumorigénese do carcinoma hepatocelular, influenciando a sua sensibilidade à quimioterapia. Os resultados obtidos transmitem alguma esperança, no sentido em que a terapia génica, onde se inclui a utilização de siRNA e shRNA, tem sofrido constantes avanços nas últimas décadas. De facto, actualmente já se encontram em desenvolvimento ensaios clínicos de fase III que visam estabelecer a utilização de siRNAs contra vários genes-alvo relacionados com o desenvolvimento e com a progressão tumoral (Shen *et al.*, 2006; Amann & Hellerbrand, 2009; Castanotto & Rossi, 2009).

Translação: da investigação básica à prática clínica

A adopção de uma medicina personalizada para cada doente tem sido alvo de um intensivo estudo nas últimas décadas. Esta temática assume especial importância no que se refere aos tratamentos anti-neoplásicos, uma vez que de doente para doente existe uma elevada variabilidade na resposta às várias opções terapêuticas disponíveis. De facto, são diversos os factores, moléculas, genes e mutações que podem influenciar a resposta à quimioterapia e à radioterapia (Gonzalez de Castro *et al.*, 2013; Kalia, 2013).

No que diz respeito aos tumores primários do fígado, como referido anteriormente, é sabido que estes são muito resistentes à quimioterapia (Bonin *et al.*, 2002; Tepsiri *et al.*, 2005; Wörns *et al.*, 2009). Essa resistência poderá estar correlacionada com mutações em diversos genes e proteínas correspondentes, sendo que ao longo deste trabalho experimental se explorou em detalhe o papel do GLUT-1, da P53 e das proteínas de efluxo PGP, MRP1 e LRP. De facto, a existência de um método de diagnóstico que nos permita inferir alguma informação acerca da genética tumoral e, conseqüentemente, da possível resposta às terapias fornece um avanço bastante evidente na área da oncobiologia. Nesses sentidos, e embora a PET com recurso ao ¹⁸F-FDG não seja actualmente utilizada como método de primeira linha no diagnóstico de tumores primários do fígado, os nossos resultados indicam que esta metodologia imagiológica pode ser utilizada enquanto método auxiliar de

diagnóstico, auxiliando na escolha do tratamento a adoptar e fornecendo informação acerca do prognóstico. Os nossos resultados indicam que as linhas celulares que possuem mutações na P53 captam mais ^{18}F -FDG do que aquelas que expressam normalmente esta proteína. Este resultado assume uma elevada importância, no sentido em que mutações na P53 têm sido cada vez mais apontadas como factor de mau prognóstico, conferindo também resistência às terapias actualmente disponíveis (Ferreira *et al.*, 1999; Wörns *et al.*, 2009; Smith, 2010). Para além disso, verificou-se que existe uma correlação entre a resistência multifármacos e a captação e a retenção de ^{18}F -FDG. Em conjunto, estes resultados, permitem-nos prever que a utilização da PET com recurso ao ^{18}F -FDG poderá ser uma arma bastante útil para a escolha da terapia a adoptar.

Após um adequado diagnóstico, torna-se essencial adoptar um tratamento o mais eficaz possível. No que respeita aos tumores primitivos do fígado, as únicas opções curativas continuam a ser as alternativas cirúrgicas. Porém, na maioria das vezes, estes tumores são diagnosticados em estadios bastante avançados da doença, sendo os doentes conduzidos para outras modalidades terapêuticas, na maioria das vezes, com âmbito meramente paliativo (Johnson, 2000; Wörns *et al.*, 2009; Giglia *et al.*, 2010; Yang & Roberts, 2010; Noel & Hezel, 2013). O GLUT-1 tem sido apontado como um possível alvo terapêutico em diversos tipos de cancro, nomeadamente no carcinoma hepatocelular (Amann & Hellerbrand, 2009; Amann *et al.*, 2009). A utilização deste transportador enquanto alvo terapêutico pode passar por uma inibição génica do mesmo, ou pelo recurso a compostos que se comportem como seus inibidores competitivos. Os nossos resultados demonstraram que a inibição génica do GLUT-1 reduziu a resistência da linha celular HuH7 à doxorrubicina, ao 5-Fluorouracilo e ao sorafenib. Se no passado a utilização da terapia génica na prática clínica era alvo de grandes controvérsias, na actualidade têm-se obtido resultados que transmitem um encorajamento constante, estando mesmo em curso ensaios clínicos de fase III que visam estabelecer a utilização de siRNAs contra diversos genes alvo intimamente correlacionados com o desenvolvimento e a progressão tumoral (Shen *et al.*, 2006; Amann & Hellerbrand, 2009; Castanotto & Rossi, 2009). Os nossos resultados indicam que algo de semelhante poderá ser desenvolvido no que diz respeito ao GLUT-1 e ao carcinoma hepatocelular.

Por outro lado, a utilização da quercetina e do gossipol nas linhas celulares de tumores primários do fígado estudadas trouxe à luz resultados bastante promissores, com potencial efeito em todas as linhas celulares mas, particularmente, na linha celular Hep3B2.1-7 que não expressa P53, o que lhe confere um mau prognóstico. A utilização destes dois compostos no tratamento do

cancro já foi abordada para diversos tipos de tumores, embora tenha sido pouco explorada na perspectiva da inibição do GLUT-1 (Jiang *et al.*, 2004; Amann & Hellerbrand, 2009; Azmi & Mohammad, 2009; Chen *et al.*, 2010; Gunassekaran *et al.*, 2011). Para além disso, os nossos resultados demonstraram a existência de sinergia no tratamento combinado da quercetina ou do gossipol com a doxorrubicina ou o sorafenib. Em concordância, para além de nós, outros autores haviam já demonstrado, noutros tipos de cancro, que a quercetina e o gossipol conseguem sensibilizar as células cancerígenas para uma ampla variedade de fármacos através de vias de sinalização diversas. Por este motivo, estes compostos são por vezes denominados como quimiossensibilizadores (Meng *et al.*, 2008b; Chen *et al.*, 2010; Guanyu Wang *et al.*, 2012; Chan *et al.*, 2013; Karaca *et al.*, 2013). Neste âmbito, a utilização do gossipol e da quercetina na prática clínica do tratamento do cancro, em monoterapia ou em terapia combinada, parece ser uma via promissora. De facto, as novas abordagens das terapêuticas anti-neoplásicas passam cada vez mais pela utilização de vários fármacos em combinação, com o intuito de interferir em diversos alvos e vias de sinalização e, em simultâneo, diminuir os efeitos secundários associados que por vezes se tornam bastante agressivos (Chou, 2007). Relativamente ao gossipol foram também já realizados ensaios clínicos de fase I e fase II utilizando este composto na terapia de diversas patologias oncológicas, quer em monoterapia quer em terapia combinada (Van Poznak *et al.*, 2001; Heist *et al.*, 2010; Ready *et al.*, 2011), tendo-se obtido resultados bastante promissores, o que abre uma janela de esperança no que diz respeito aos tumores primários do fígado.

Em suma, os nossos resultados indicam que no futuro, o ^{18}F -FDG poderá ser utilizado no diagnóstico de tumores primitivos do fígado, auxiliando na escolha da terapêutica e, para além disso, os nossos dados reforçam ainda que o GLUT-1 é, de facto, um alvo terapêutico para estes tipos de tumores, sendo que a sua inibição quer farmacológica quer génica poderá constituir uma valiosa arma terapêutica no combate destes tumores altamente agressivos.

Capítulo VII

Conclusões e Perspectivas Futuras

Neste capítulo serão destacadas as conclusões mais relevantes assim como as perspectivas futuras primordiais na continuação do estudo desta temática.

1. Nos capítulos resultados e discussão foram interpretados e discutidos os resultados obtidos ao longo do trabalho experimental. De modo a facilitar a discussão optou-se por dividir a discussão em sub-capítulos, sendo que cada um deles possui a discussão parcelar de cada temática que integrou os diferentes resultados. Assim, ao longo da discussão abordaram-se os efeitos dos fármacos comumente utilizados na terapêutica de tumores primários do fígado, assim como o efeito da quercetina e do gossipol em linhas celulares de carcinoma hepatocelular e de colangiocarcinoma. Discutiram-se também os resultados obtidos a partir do efeito combinado da quercetina ou do gossipol com o sorafenib ou a doxorrubicina. Dentro da mesma temática avaliou-se o efeito da inibição génica do GLUT-1 na linha celular HuH7. Discutiram-se também os resultados obtidos através dos estudos de cinética de ^{18}F -FDG e $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI, a expressão de GLUTs e de proteínas MDR assim como o efeito da modulação com verapamil na retenção dos radiofármacos mencionados.
2. Através dos resultados obtidos, constata-se que as linhas celulares em estudo diferem entre si no que diz respeito à expressão de P53, CK19, AFP e KI67. As linhas celulares Hep3B2.1-7 e TFK-1 não expressam P53, enquanto que as células HepG2 expressam esta proteína moderadamente, e as HuH7 sobreexpressam P53. As linhas celulares de carcinoma hepatocelular apresentam uma expressão forte de CK19, enquanto que as células TFK-1 expressam de forma fraca. A linha celular HepG2 expressa fortemente AFP, enquanto que as outras linhas celulares em estudo não expressam. A linha celular Hep3B2.1-7 é aquela que apresenta o menor índice proliferativo.
3. A expressão de P53 afecta a captação de ^{18}F -FDG, sendo que mutações nesta proteína e a ausência de expressão da mesma conduzem a elevadas taxas de captação deste radiofármaco.
4. Nem sempre os GLUTs -1 e -3 são os mais expressos pelas linhas celulares em estudo, salientando-se os elevados níveis de expressão

de GLUT-12 por todas as linhas celulares estudadas, podendo este transportador estar envolvido na captação de ^{18}F -FDG pelas células estudadas.

5. Existe um paralelismo entre a captação e a retenção de ^{18}F -FDG e de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI, sendo que a linha celular Hep3B2.1-7 é aquela que mais capta e retém ambos os radiofármacos, e a linha celular HepG2 aquela que menos capta e menos retém.
6. A concentração de glicose presente no meio de cultura influencia a captação e a retenção de ^{18}F -FDG, e também de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI. Assim, para ambos os radiofármacos em estudo, as células captam e retém mais quando cultivadas em meio de cultura com baixa concentração de glicose. Já a modulação com verapamil induziu um acréscimo na retenção de ^{18}F -FDG e de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI por parte de todas as linhas celulares em estudo, corroborando a hipótese do ^{18}F -FDG ser substrato da PGP e da MRP1.
7. Todas as linhas celulares de carcinoma hepatocelular em estudo são sensíveis à cisplatina, à doxorubicina e ao sorafenib, apresentando uma sensibilidade acrescida à doxorubicina. Por outro lado, as mesmas linhas celulares apresentaram alguma resistência ao 5-fluorouracilo. A sensibilidade das linhas celulares para todos os fármacos testados é dependente da concentração do fármaco e do tempo de incubação.
8. As células de colangiocarcinoma apresentaram maior resistência à cisplatina e à doxorubicina do que as linhas celulares de carcinoma hepatocelular. Também a linha celular TFK-1 apresentou elevada resistência ao 5-Fluorouracilo. A linha celular de colangiocarcinoma apresentou maior sensibilidade ao sorafenib do que as células de carcinoma hepatocelular.
9. A quercetina possui um efeito inibitório da actividade metabólica em todas as linhas celulares em estudo, sendo este efeito mais evidente para a linha celular HepG2 e menos pronunciado para as células HuH7. Esse efeito é dependente da concentração de composto e do tempo de incubação.

10. A quercetina inibe competitivamente o GLUT-1 nas linhas celulares em estudo, comprometendo a captação de ^{18}F -FDG e, por analogia, de glicose. Por consequência ocorre a indução de stress oxidativo, originando danos no ADN (excepto nas células HUH7), despoletando a morte celular essencialmente por apoptose, de forma independente da P53.
11. O gossipol possui um efeito inibitório da actividade metabólica em todas as linhas celulares em estudo, sendo este efeito mais evidente para a linha celular Hep3B2.1-7, e menos pronunciado para as células TFK-1. O efeito é dependente da concentração do composto e do tempo de incubação.
12. De modo similar ao observado para a quercetina, para as linhas celulares em estudo, a incubação com gossipol induziu uma inibição competitiva do GLUT-1 com conseqüente decréscimo na captação de ^{18}F -FDG. Em resposta à privação glicolítica ocorreu a indução de stress oxidativo o que, por sua vez, induz danos no ADN culminando em morte celular, maioritariamente por apoptose, de um modo independente da P53.
13. Através do tratamento combinado de quercetina ou de gossipol com o sorafenib observou-se um efeito sinérgico em todas as linhas celulares de carcinoma hepatocelular estudadas, mas não na linha celular de colangiocarcinoma. Por sua vez, o tratamento com o gossipol e a doxorrubicina apresentou sinergia em todas as linhas celulares em estudo excepto na HuH7. O tratamento com a quercetina e com a doxorrubicina apenas apresentou sinergia nas células HepG2 e TFK-1.
14. A transfecção celular induziu um decréscimo da expressão de GLUT-1 por parte das células HUH7 e, por consequência, a nova linha celular obtida apresentou maior sensibilidade aos fármacos comumente utilizados na clínica. Este resultado reforça a hipótese do GLUT-1 ser um alvo terapêutico para este tipo de tumores.

Tendo em conta os resultados obtidos, este estudo experimental apresenta um contributo inovador nesta temática. A falta de abordagens terapêuticas eficazes para os tumores primários do fígado aliada à resistência intrínseca que os mesmos apresentam às terapias comumente utilizadas, são elementos que conduzem às elevadas taxas de mortalidade registadas nos doentes que padecem destas patologias. Neste sentido, este trabalho constitui um ponto de partida para investigações futuras, uma vez que indica que o GLUT-1 poderá ser considerado um alvo terapêutico para este tipo de tumores e ainda indica que a PET com recurso ao ^{18}F -FDG poderá ser utilizada como método de prever a resposta à quimioterapia.

Porém, este trabalho não termina aqui e como perspectivas futuras propõe-se:

1. Estudar o mecanismo molecular subsequente ao silenciamento genético do GLUT-1 na linha celular HuH7, uma vez que este demonstrou ser uma abordagem promissora na quimiossensibilização destas células aos fármacos comumente utilizados. Para além disso, seria de todo o interesse efectuar o mesmo procedimento nas outras linhas celulares estudadas. Por outro lado, seria também importante efectuar uma transfecção celular que conduzisse à sobreexpressão deste transportador e estudar o seu efeito na sensibilidade às terapêuticas.
2. Avaliar os tipos de morte celular induzidos pelo tratamento combinado de quercetina ou de gossipol com o sorafenib ou com a doxorrubicina assim como os mecanismos celulares e moleculares subjacentes aos mesmos. Actualmente, uma das abordagens mais promissoras no tratamento do cancro centra-se na combinação de fármacos com o intuito de interagir com a doença através de vários mecanismos distintos. Neste estudo experimental obtiveram-se resultados bastante promissores através da combinação da quercetina ou do gossipol com o sorafenib ou com a doxorrubicina, contudo, não foram explorados os mecanismos moleculares que conduzem aos efeitos sinérgicos obtidos.
3. Avaliar o efeito da quercetina e do gossipol em colangiócitos e hepatócitos de modo a comprovar a selectividade destes compostos pelas células oncológicas. Isto porque, a utilização de compostos naturais tais como a quercetina e o gossipol no tratamento de neoplasias malignas tem sido cada vez mais defendida pela comunidade científica. Uma das vantagens que

estas terapêuticas apresentam é, normalmente, a selectividade que estes compostos apresentam para as células oncológicas sem contudo danificarem as células saudáveis adjacentes.

4. Ainda como perspectiva futura seria importante a obtenção de modelos animais ortotópicos de carcinoma hepatocelular e de colangiocarcinoma, nos quais fosse possível aplicar todas as terapêuticas estudadas nos modelos *in vitro*.

Parte III
Referências Bibliográficas

- Abou-Alfa, G. K. (2009). Selection of patients with hepatocellular carcinoma for sorafenib. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 7(4), 397–403.
- Abou-Alfa, G. K., Schwartz, L., Ricci, S., Amadori, D., Santoro, A., Figer, A., De Greve, J., Douillard, J.Y., Lathia, C., Schwartz, B., Taylor, Y., Moscovici, & M., Saltz, L. B. (2006). Phase II study of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, 24(26), 4293–300.
- Adebamowo, C. A., Cho, E., Sampson, L., Katan, M. B., Spiegelman, D., Willett, W. C., & Holmes, M. D. (2005). Dietary flavonols and flavonol-rich foods intake and the risk of breast cancer. *International Journal of Cancer*, 114(4), 628–33.
- Aft, R. L., Zhang, F. W., & Gius, D. (2002). Evaluation of 2-deoxy-D-glucose as a chemotherapeutic agent: mechanism of cell death. *British Journal of Cancer*, 87(7), 805–12.
- Afzal, I., Cunningham, P., & Naftalin, R. J. (2002). Interactions of ATP, oestradiol, genistein and the anti-oestrogens, faslodex (ICI 182780) and tamoxifen, with the human erythrocyte glucose transporter, GLUT1. *Biochemical Journal*, 361, 707–719.
- Ahmed, I., & Lobo, D. N. (2009). Malignant tumours of the liver. *Surgery (Oxford)*, 27(1), 30–37.
- Akimoto, M., Yoshikawa, M., Ebara, M., Sato, T., Fukuda, H., Kondo, F., & Saisho, H. (2006). Relationship between therapeutic efficacy of arterial infusion chemotherapy and expression of P-glycoprotein and p53 protein in advanced hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, 12(6), 868–73.
- Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., Shibuya, M., & Fukami, Y. (1987). Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(12), 5592–5.
- Al-Bahrani, R., Abuetaf, Y., Zeitouni, N., & Sergi, C. (2013). Cholangiocarcinoma: risk factors, environmental influences and oncogenesis. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 43(2), 195–210.
- Aljiffry, M. (2009). Advances in diagnosis, treatment and palliation of cholangiocarcinoma: 1990-2009. *World Journal of Gastroenterology*, 15(34), 4240.
- Al-Khalili, L., Cartee, G. D., & Krook, A. (2003). RNA interference-mediated reduction in GLUT1 inhibits serum-induced glucose transport in primary human skeletal muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 307(1), 127–132.
- Alves, R. C. P., Alves, D., Guz, B., Matos, C., Viana, M., Harriz, M., Terrabuio, D., Kondo, M., Gampel, O., & Polletti, P. (2011). Advanced hepatocellular carcinoma. Review of targeted molecular drugs. *Annals of Hepatology*, 10(1), 21–7.
- Amann, T., & Hellerbrand, C. (2009). GLUT1 as a therapeutic target in hepatocellular carcinoma. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 13(12), 1411–27.
- Amann, T., Maegdefrau, U., Hartmann, A., Agaimy, A., Marienhagen, J., Weiss, T. S., Stoeltzing, O., Warnecke, C., Scholmerich, J., Oefner, P.J., Kreutz, M., Bosserhoff, A.K., &

- Hellerbrand, C. (2009). GLUT1 expression is increased in hepatocellular carcinoma and promotes tumorigenesis. *The American Journal of Pathology*, 174(4), 1544–52.
- Amundson, S. A., Myers, T. G., & Fornace, J. (1998). Roles for p53 in growth arrest and apoptosis: putting on the brakes after genotoxic stress. *Oncogene*, 17(25), 3287–99.
- Anderson, C. D., Pinson, C. W., Berlin, J., & Chari, R. S. (2004). Diagnosis and Treatment of Cholangiocarcinoma. *The Oncologist*, 9, 43–57.
- Arnault, J. P., Mateus, C., Escudier, B., Tomasic, G., Wechsler, J., Hollville, E., Soria, J.C., Malka, D., Sarasin, A., Larcher, M., André, J., Kamsu-Kom, M., Boussermart, L., Lacroix, L., Spatz, A., Eggermont, A.M., Druillennec, S., Vagner, S., Eychène, A., Dumaz, N., & Robert, C. (2012). Skin tumors induced by sorafenib; paradoxical RAS-RAF pathway activation and oncogenic mutations of HRAS, TP53, and TGFBR1. *Clinical Cancer Research*, 18(1), 263–72.
- Ashcroft, M., & Kubbutat, M. H. G. (1999). Regulation of p53 Function and Stability by Phosphorylation. *Molecular and Cellular Biology*, 19(3), 1751–1758.
- Azmi, A. S., & Mohammad, R. M. (2009). Non-peptidic small molecule inhibitors against Bcl-2 for cancer therapy. *Journal of Cellular Physiology*, 218(1), 13–21.
- Bailin, W., Xiaoping, C., Shuping, Z., Haiyan, Y., & Yong, Z. (2004). Expression of Lung Resistance Protein (LRP) Gene in Hepatocellular Carcinoma and Its Significance. *The Chinese-German Journal of Clinical Oncology*, 3(3), 132–136.
- Balakrishnan, K., Wierda, W. G., Keating, M. J., & Gandhi, V. (2008). Gossypol, a BH3 mimetic, induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*, 112(5), 1971–80.
- Balasubramanian, B., Pogozelski, W. K., & Tullius, T. D. (1998). DNA strand breaking by the hydroxyl radical is governed by the accessible surface areas of the hydrogen atoms of the DNA backbone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(17), 9738–43.
- Ballinger, J. R., Bannerman, J., Boxen, I., Firby, P., Hartman, N. G., & Moore, M. J. (1996). Technetium-99m-Tetrofosmin as a Substrate for P-Glycoprotein : In Vitro Studies in Multidrug-Resistant Breast Tumor Cells. *Journal of Nuclear Medicine*, 37(9), 1578–1582.
- Barrera, G. (2012). Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. *International Scholarly Research Network Oncology*, 2012, 137289. doi:10.5402/2012/137289
- Bauer, J. A., Trask, D. K., Kumar, B., Los, G., Castro, J., Lee, J. S., Chen, J., Wang, S., Bradford, C.R., & Carey, T. E. (2005). Reversal of cisplatin resistance with a BH3 mimetic, (-)-gossypol, in head and neck cancer cells: role of wild-type p53 and Bcl-xL. *Molecular Cancer Therapeutics*, 4(7), 1096–104.
- Bensaad, K., Tsuruta, A., Selak, M. a, Vidal, M. N. C., Nakano, K., Bartrons, R., Gottlieb, E., & Vousden, K. H. (2006). TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell*, 126(1), 107–20.

- Bernas, T., & Dobrucki, J. (2002). Mitochondrial and Nonmitochondrial Reduction of MTT : Interaction of MTT With TMRE , JC-1 , and NAO. *Cytometry*, *242*, 236–242.
- Berndt, K., Campanile, C., Muff, R., Strehler, E., Born, W., & Fuchs, B. (2013). Evaluation of quercetin as a potential drug in osteosarcoma treatment. *Anticancer Research*, *33*(4), 1297–306.
- Berridge, M. V, Herst, P. M., & Tan, A. S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology : New insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*, *11*(05), 127–152.
- Bishayee, K., Ghosh, S., Mukherjee, A., Sadhukhan, R., & Mondal, J. (2013). Quercetin induces cytochrome-c release and ROS accumulation to promote apoptosis and arrest the cell cycle in G2 / M , in cervical carcinoma : signal cascade and drug-DNA interaction. *Cell Proliferation*, *46*, 153–163.
- Blechacz, B., & Gores, G. J. (2008). Cholangiocarcinoma: advances in pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Hepatology*, *48*(1), 308–21.
- Blok, J., Gibbs, E. M., Lienhard, G. E., Slot, J. W., & Geuze, H. J. (1988). Insulin-induced translocation of glucose transporters from post-Golgi compartments to the plasma membrane of 3T3-L1 adipocytes. *The Journal of Cell Biology*, *106*(1), 69–76.
- Blonski, W. (2010). Non-viral causes of hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, *16*(29), 3603.
- Bonin, S., Pascolo, L., Croc , L. S., Stanta, G., & Tiribelli, C. (2002). Gene expression of ABC proteins in hepatocellular carcinoma, perineoplastic tissue, and liver diseases. *Molecular Medicine*, *8*(6), 318–25.
- Borner, C. (2003). The Bcl-2 protein family : sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Molecular Immunology*, *39*, 615–647.
- Borst, P., Evers, R., Kool, M., & Wijnholds, J. (1999). The multidrug resistance protein family. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1461*(2), 347–57.
- Bragazzi, M. C., Cardinale, V., Carpino, G., Venere, R., Semeraro, R., Gaudio, E., & Alvaro, D. (2012). Cholangiocarcinoma : Epidemiology and risk factors. *Translational Gastrointestinal Cancer*, (I), 21–32.
- Brechot, C., Kremsdorf, D., Soussan, P., Pineau, P., Dejean, a, Paterlini-Brechot, P., & Tiollais, P. (2010). Hepatitis B virus (HBV)-related hepatocellular carcinoma (HCC): molecular mechanisms and novel paradigms. *Pathologie-Biologie*, *58*(4), 278–87.
- Bressac, B., Galvin, K. M., Liang, T. J., Isselbacher, K. J., & Wands, J. R. (1990). Abnormal structure and expression of p53 gene in human hepatocellular carcinoma. *Sciences-New York*, *87*, 1973–1977.
- Briggs, C. D., Neal, C. P., Mann, C. D., Steward, W. P., Manson, M. M., & Berry, D. P. (2009). Prognostic molecular markers in cholangiocarcinoma: a systematic review. *European Journal of Cancer*, *45*(1), 33–47.

- Brito, A. F., Abrantes, A. M., Pinto-Costa, C., Gomes, A. R., Mamede, A. C., Casalta-Lopes, J., Gonçalves, A.C., Sarmiento-Ribeiro, A.B., Tralhão, J.G., & Botelho, M. F. (2012). Hepatocellular carcinoma and chemotherapy: the role of p53. *Chemotherapy*, *58*(5), 381–6.
- Brito, A. F., Mendes, M., Abrantes, A. M., Tralhão, J. G., & Botelho, M. F. (2014). Positron Emission Tomography Diagnostic Imaging in Multidrug-Resistant Hepatocellular Carcinoma: Focus on 2-Deoxy-2-(18F)Fluoro-D-Glucose. *Molecular Diagnosis & Therapy*. doi:10.1007/s40291-014-0106-3
- Bruix, J., Boix, L., Sala, M., & Llovet, J. M. (2004). Focus on hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell*, *5*(3), 215–9.
- Bruix, J., & Llovet, J. M. (2002). Prognostic prediction and treatment strategy in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, *35*(3), 519–24.
- Bruix, J., & Sherman, M. (2005). Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, *42*(5), 1208–36.
- Bruix, J., & Sherman, M. (2011). Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology*, *53*(3), 1020–2.
- Buerkle, A., & Weber, W. A. (2008). Imaging of tumor glucose utilization with positron emission tomography. *Cancer Metastasis Reviews*, *27*(4), 545–54.
- Burgos, C., Gerez de Burgos, N. M., Rovai, L. E., & Blanco, A. (1986). In vitro inhibition by gossypol of oxidoreductases from human tissues. *Biochemical Pharmacology*, *35*(5), 801–4.
- Bushunow, P., Reidenberg, M. M., Wasenko, J., Winfield, J., Lorenzo, B., Lemke, S., Himpler, B., Corona, R., & Coyle, T. (1999). Gossypol treatment of recurrent adult malignant gliomas. *Journal of Neuro-Oncology*, *43*(1), 79–86.
- Cadwell, C., & Zambetti, G. P. (2001). The effects of wild-type p53 tumor suppressor activity and mutant p53 gain-of-function on cell growth. *Gene*, *277*(1-2), 15–30.
- Cao, Y., Fu, Y.L., Yu, M., Yue, P.B., Ge, C.H., Xu, W.X., Zhan, Y.Q., Li, C.Y., Wang, X.H., Wang, Z.D., Li, Y.H., & Yang, X.M. (2009). Human augments liver regeneration is important for hepatoma cell viability and resistance to radiation-induced oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*, *47*(7), 1057–66.
- Cardoso, S., Santos, S., Swerdlow, R., Oliveira, & CR. (2001). Functional mitochondria are required for amyloid B-mediated neurotoxicity. *The Journal of Federation of American Societies for Experimental Biology*, *15*, 1439–41.
- Carvalho, C., Santos, R. X., Cardoso, S., Correia, S., Oliveira, P. J., Santos, M. S., & Moreira, P. I. (2009). Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. *Current Medicinal Chemistry*, *16*(25), 3267–85.
- Carvalho, K. C., Cunha, I. W., Rocha, R. M., Ayala, F. R., Cajaíba, M. M., Begnami, M. D., Vilela, R. S., Paiva, G. R., Andrade, R. G., & Soares, F. A. (2011). GLUT1 expression in malignant tumors and its use as an immunodiagnostic marker. *Clinics*, *66*(6), 965–972.

- Casalta-lobes, J., Abrantes, A. M., Laranjo, M., Rio, J., Cristina, A., Oliveiros, B., Sarmento-Ribeiro, A. B., & Botelho, M. F. (2011). Efflux Pumps Modulation in Colorectal Adenocarcinoma Cell Lines : The Role of Nuclear Medicine. *Journal of Cancer Therapy*, 2, 408–417.
- Castanotto, D., & Rossi, J. J. (2009). The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics. *Nature*, 457(7228), 426–433.
- Chakunta, H. R., Sunderkrishnan, R., Kaplan, M. A., & Mostofi, R. (2013). Cholangiocarcinoma: treatment with sorafenib extended life expectancy to greater than four years. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 4(4), E30–E32.
- Chan, S.T., Yang, N.C., Huang, C.S., Liao, J.W., & Yeh, S.L. (2013). Quercetin enhances the antitumor activity of trichostatin A through upregulation of p53 protein expression in vitro and in vivo. *PloS One*, 8(1), e54255.
- Chang, Y. F., Hsu, Y. C., Hung, H. F., Lee, H. J., Lui, W.Y., Chi, C.W., & Wang, J. J. (2009). Quercetin induces oxidative stress and potentiates the apoptotic action of 2-methoxyestradiol in human hepatoma cells. *Nutrition and Cancer*, 61(5), 735–45.
- Chen, C., Zhou, J., & Ji, C. (2010). Quercetin: a potential drug to reverse multidrug resistance. *Life Sciences*, 87(11-12), 333–8.
- Chen, C. P., Li, X. X., Zhang, L. R., Min, J. M., Chan, J. Y. W., Fung, K. P., Wang, S. K., & Zhang, L.-H. (2002). Synthesis of antisense oligonucleotide-peptide conjugate targeting to GLUT-1 in HepG-2 and MCF-7 Cells. *Bioconjugate Chemistry*, 13(3), 525–9.
- Chen, G. G., Merchant, J. L., Lai, P. B. S., Ho, R. L. K., Hu, X., Okada, M., Huang, S. F., Chui, A. K., Law, D. J., Li, Y. G., Lau, W. Y., & Li, A. K. C. (2003). Mutation of p53 in recurrent hepatocellular carcinoma and its association with the expression of ZBP-89. *The American Journal of Pathology*, 162(6), 1823–9.
- Chen, S., Nien, S., Wu, C., Liu, C., & Chang, Y. (2013). Reappraisal of the anticancer efficacy of quercetin in oral cancer cells. *Journal of the Chinese Medical Association*, 76(3), 146–152.
- Chen YB, Yan ML, Gong JP, Xia RP, Liu LX, Li N, Lu SC, Zhang JG, Zeng DB, Xie JG, Yang JY, Y. L. (2007). Establishment of hepatocellular carcinoma multidrug resistant cell line HepG2/mdr1. *Chinese Medical Journal*, 120(30170925), 703–707.
- Chen, Z. S., & Tiwari, A. K. (2011). Multidrug resistance proteins (MRPs/ABCCs) in cancer chemotherapy and genetic diseases. *Federation of European Biochemical Societies journal*, 278(18), 3226–3245.
- Cheung, T. T. (2010). Combined resection and radiofrequency ablation for multifocal hepatocellular carcinoma: Prognosis and outcomes. *World Journal of Gastroenterology*, 16(24), 3056.
- Chien, S., Wu, Y., Chung, J., Yang, J., Lu, H., Tsou, M., Wood, W. G., Kuo, S. J., & Chen, D. (2009). Quercetin-induced apoptosis acts through mitochondrial- and caspase-3-dependent pathways in human breast cancer MDA-MB-231 cells. *Human & Experimental Toxicology*, 28, 493–502.

- Chou, T. (2007). Theoretical Basis , Experimental Design , and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies. *Pharmacological Reviews*, 58, 621–681.
- Chou, T., & Talalay, P. (1984). Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in enzyme regulation*, 22, 27–55.
- Chou, Y. Y., Cheng, a L., & Hsu, H. C. (1997). Expression of P-glycoprotein and p53 in advanced hepatocellular carcinoma treated by single agent chemotherapy: clinical correlation. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 12(8), 569–75.
- Collins, A. R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Molecular biotechnology*, 26(3):249-61.
- Constanzo, F., Bevilacqua, M., Giordano, M., & Cimino, F. (1989). Expression of genes of ferritin subunits in human hepatoma cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 161(2), 902–909.
- Coriat, R., Mir, O., Cessot, A., Brezault, C., Ropert, S., Durand, J. P., Cacheux, W., Chaussade, S., & Goldwasser, F. (2012). Feasibility of oxaliplatin, 5-fluorouracil and leucovorin (FOLFOX-4) in cirrhotic or liver transplant patients: experience in a cohort of advanced hepatocellular carcinoma patients. *Investigational New Drugs*, 30(1), 376–81.
- Dal Lago, L., D'Hondt, V., & Awada, A. (2008). Selected combination therapy with sorafenib: a review of clinical data and perspectives in advanced solid tumors. *The Oncologist*, 13(8), 845–58.
- Dikalov, S., Griendling, K. K., & Harrison, D. G. (2007). Measurement of Reactive Oxygen Species in Cardiovascular Studies. *Hypertension*, 49, 717–727.
- Dizdaroglu, M., & Jaruga, P. (2012). Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radical Research*, 46(4), 382–419.
- Dodou, K., Anderson, R. J., Small, D. A., & Groundwater, P. W. (2005). Investigations on gossypol: past and present developments. *Expert opinion on investigational drugs*, 14(11):1419-34.
- Eichhorst, S. T. (2005). Modulation of apoptosis as a target for liver disease. *Expert opinion on therapeutic targets*, 9(1):83-99..
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516.
- El-Serag, H. B. (2012). Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 142(6), 1264–1273.e1.
- El-Serag, H. B., & Rudolph, K. L. (2007). Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*, 132(7), 2557–76.

- Ettxebarria, A., Landeta, O., Antonsson, B., & Basañez, G. (2008). Regulation of antiapoptotic MCL-1 function by gossypol: mechanistic insights from in vitro reconstituted systems. *Biochemical Pharmacology*, 76(11), 1563–76.
- Evans, A., Bates, V., Troy, H., Hewitt, S., Holbeck, S., Chung, Y. L., Phillips, R., Stubbs, M., Griffiths, J., & Airley, R. (2008). Glut-1 as a therapeutic target: increased chemoresistance and HIF-1-independent link with cell turnover is revealed through COMPARE analysis and metabolomic studies. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 61(3), 377–93.
- Ezzoukhry, Z., Louandre, C., Trécherel, E., Godin, C., Chauffert, B., Dupont, S., Diouf, M., Barbare, J. C., Mazières, J. C., & Galmiche, A. (2012). EGFR activation is a potential determinant of primary resistance of hepatocellular carcinoma cells to sorafenib. *International Journal of Cancer*, 131(12), 2961–9.
- Fabregat, I. (2009). Dysregulation of apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *World Journal of Gastroenterology*, 15(5), 513.
- Fabregat, I., Roncero, C., & Fernández, M. (2007). Survival and apoptosis: a dysregulated balance in liver cancer. *Liver International*, 27(2), 155–62.
- Ferlay, J., Shin, H.-R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., & Parkin, D. M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer*, 127(12), 2893–917.
- Fernando, J., Sancho, P., Fernández-Rodríguez, C. M., Lledó, J. L., Caja, L., Campbell, J. S., Fauto, N., & Fabregat, I. (2013). Sorafenib sensitizes Hepatocellular Carcinoma cells to physiological apoptotic stimuli. *Journal of cellular physiology*, 227(4), 1319–1325.
- Ferraresi, R., Troiano, L., Roat, E., Lugli, E., Nemes, E., Nasi, M., Pinti, M., Fernandez, M. I., Cooper, E. L., & Cossarizza, A. (2005). Essential requirement of reduced glutathione (GSH) for the anti-oxidant effect of the flavonoid quercetin. *Free Radical Research*, 39(11), 1249–58.
- Ferreira, C. G., Tolis, C., & Giaccone, G. (1999). P53 and Chemosensitivity. *Annals of Oncology*, 10(9), 1011–21.
- Finn, R. S. (2013). Emerging targeted strategies in advanced hepatocellular carcinoma. *Seminars in Liver Disease*, 33 Suppl 1, S11–9.
- Fleischer, B., Schulze-Bergkamen, H., Schuchmann, M., Weber, A., Biesterfeld, S., Müller, M., Krammer, P. H., Galle, P. R. (2006). Mcl-1 is an anti-apoptotic factor for human hepatocellular carcinoma. *International Journal of Oncology*, 28(1), 25–32.
- Forslund, A., Zeng, Z., Qin, L. X., Rosenberg, S., Ndubuisi, M., Pincas, H., Gerald, W., Notterman, D. A., Barany, F., & Paty, P. B. (2008). MDM2 gene amplification is correlated to tumor progression but not to the presence of SNP309 or TP53 mutational status in primary colorectal cancers. *Molecular Cancer Research*, 6(2), 205–11.
- Friman, S. (2011). Cholangiocarcinoma-current treatment options. *Scandinavian Journal of Surgery*, 100(1), 30–4.

- Furuta, E., Okuda, H., Kobayashi, A., & Watabe, K. (2010). Metabolic genes in cancer: their roles in tumor progression and clinical implications. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1805*(2), 141–152.
- Gao, X., Wang, B., Wei, X., Men, K., Zheng, F., Zhou, Y., & Zheng, Y. (2012). Nanoscale Anticancer effect and mechanism of polymer micelle-encapsulated quercetin. *Nanoscale*, 7021–7030.
- Gatenby, R. A. , & Gillies, R. J. (2007). Glycolysis in cancer: a potential target for therapy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *39*(7-8), 1358–66.
- Giglia, J. L., Antonia, S. J., Berk, L. B., Bruno, S., Dessureault, S., & Finkelstein, S. E. (2010). Systemic therapy for advanced hepatocellular carcinoma: past, present, and future. *Cancer Control*, *17*(2), 120–9.
- Gillet, J., & Gottesman, M. M. (2010). Multi-Drug Resistance in Cancer. *Methods in Molecular Biology*, 596.
- GLOBOCAN: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. (2013). Retrieved from <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>
- Goldstein, I., Marcel, V., Olivier, M., Oren, M., Rotter, V., & Hainaut, P. (2011). Understanding wild-type and mutant p53 activities in human cancer: new landmarks on the way to targeted therapies. *Cancer Gene Therapy*, *18*(1), 2–11.
- Gomes, M. A., Priolli, D. G., Tralhão, J. G., & Botelho, M. F. (2013). Hepatocellular carcinoma: epidemiology, biology, diagnosis, and therapies. *Revista Da Associacao Medica Brasileira*, *59*(5), 514–524.
- Gonzalez de Castro, D., Clarke, P. a, Al-Lazikani, B., & Workman, P. (2013). Personalized cancer medicine: molecular diagnostics, predictive biomarkers, and drug resistance. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, *93*(3), 252–9. 7
- Gonzalez, V. M., Fuertes, M. A., Alonso, C., & Perez, J. M. (2001). Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Molecular Pharmacology*, *59*(4), 657–63.
- Goodman, Z. D. (2007). Neoplasms of the liver. *Modern Pathology*, *20 Suppl 1*, S49–60.
- Gottesman, M. M., Pastan, I., & Ambudkar, S. V. (1996). P-glycoprotein and multidrug resistance. *Current opinion in genetics & development*, *6*(5):610-7.
- Gottesman, M. M., Fojo, T., & Bates, S. E. (2002). Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nature Reviews. Cancer*, *2*(1), 48–58.
- Granado-Serrano, A. B., Martín, M. Á., Bravo, L., Goya, L., & Ramos, S. (2012). Quercetin attenuates TNF-induced inflammation in hepatic cells by inhibiting the NF-κB pathway. *Nutrition and Cancer*, *64*(4), 588–98.
- Groheux, D., Giacchetti, S., Moretti, J. L., Porcher, R., Espié, M., Lehmann-Che, J., de Roquancourt, A., Hamy, A. S., Cuvier, C., Vercellino, L., & Hindié, E. (2011). Correlation of high 18F-FDG uptake to clinical, pathological and biological prognostic factors in breast cancer. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, *38*(3), 426–35.

- Grudé, P., Conti, F., Mennecier, D., Louvel, A., Houssin, D., Weill, B., & Calmus, Y. (2002). MDR1 gene expression in hepatocellular carcinoma and the peritumoral liver of patients with and without cirrhosis. *Cancer Letters*, 186(1), 107–13.
- Guan, Y., He, Q., & La, Z. (2006). Roles of p53 in Carcinogenesis , Diagnosis and Treatment of Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Cancer Molecules*, 2(5): 191-197.
- Gunassekaran, G. R., Priya, D. K. D., Gayathri, R., & Sakthisekaran, D. (2011). In vitro and in vivo studies on antitumor effects of gossypol on human stomach adenocarcinoma (AGS) cell line and MNNG induced experimental gastric cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 411(4), 661–6.
- Haghiac, M., & Walle, T. (2005). Quercetin induces necrosis and apoptosis in SCC-9 oral cancer cells. *Nutrition and Cancer*, 53(2), 220–31.
- Hedley, D. W., & Chow, S. (1994). Evaluation of methods for measuring cellular glutathione content using flow cytometry. *Cytometry*, 15(4), 349–58.
- Hedley, D. W., & Chow, S. (1994). Evaluation of Methods for Measuring Cellular Glutathione Content Using Flow Cytometry'. *Cytometry*, 358, 349–358.
- Heist, R. S., Fain, J., Chinnasami, B., Khan, W., Molina, J. R., Sequist, L. V, Temel, J. S., Fidias, P., Brainerd, V., Leopold, L., & Lynch, T. J. (2010). Phase I / II Study of AT-101 with Topotecan in Relapsed and Refractory Small Cell Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 5(10), 1637–1643.
- Hendrikse, N., Franssen, E., van der Graaf, WTA, Meijer, C., Piers, D., Vaalburg, W., & Vries, E. (1998). 99mTc-sestamibi is a substrate for P-glycoprotein and the multidrug resistance-associated protein. *British Journal of Cancer*, 77(1 998), 353–358.
- Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407(6805), 770–6.
- Hilgard, P., Gane, E., Blanc, J., Oliveira, A. C. De, Santoro, A., Raoul, J., ... Bruix, J. (2008). Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma. *The New England Journal of Medicine*, 359, 378–90.
- Horie, S., Endo, K., Kawasaki, H., & Terada, T. (2000). Overexpression of MDM2 protein in intrahepatic cholangiocarcinoma: relationship with p53 overexpression, Ki-67 labeling, and clinicopathological features. *Virchows Archiv* , 437(1), 25–30.
- Hospital, S., Centre, L. T., Hospital, B. Y., & Army, L. (2007). Establishment of hepatocellular carcinoma multidrug resistant, 120(30170925), 703–707.
- Hou, D. X., Uto, T., Tong, X., Takeshita, T., Tanigawa, S., Imamura, I., Ose, T., & Fujii, M. (2004). Involvement of reactive oxygen species-independent mitochondrial pathway in gossypol-induced apoptosis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 428(2), 179–87.
- Hsiao, W. T., Tsai, M. D., Jow, G. M., Tien, L. T., & Lee, Y. J. (2012). Involvement of Smac, p53, and caspase pathways in induction of apoptosis by gossypol in human retinoblastoma cells. *Molecular Vision*, 18, 2033–42.

- Hsu, P. P., & Sabatini, D. M. (2008). Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell*, 134(5), 703–7.
- Huang, Y. W., Wang, L. S., Chang, H. L., Ye, W., Dowd, M. K., Wan, P. J., & Lin, Y. C. (2006). Molecular mechanisms of (-)-gossypol-induced apoptosis in human prostate cancer cells. *Anticancer Research*, 26(3A), 1925–33.
- Huber, H. J., Dussmann, H., Kilbride, S. M., Rehm, M., & Prehn, J. H. M. (2011). Glucose metabolism determines resistance of cancer cells to bioenergetic crisis after cytochrome-c release. *Molecular Systems Biology*, 7(470), 470.
- Huether, A., Höpfner, M., Baradari, V., Schuppan, D., & Scherübl, H. (2007). Sorafenib alone or as combination therapy for growth control of cholangiocarcinoma. *Biochemical Pharmacology*, 73(9), 1308–17.
- Hussain, S. P., Schwank, J., Staib, F., Wang, X. W., & Harris, C. C. (2007). TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer. *Oncogene*, 26(15), 2166–76.
- Ibrahim, N., Yu, Y., Walsh, W. R., & Yang, J. L. (2012). Molecular targeted therapies for cancer: sorafenib mono-therapy and its combination with other therapies (review). *Oncology Reports*, 27(5), 1303–11.
- Isshiki, K., Nakao, A., Ito, M., Hamaguchi, M., & Takagi, H. (1993). P-glycoprotein expression in hepatocellular carcinoma. *Journal of Surgical Oncology*, 52(1), 21–25.
- Itsubo, M., Ishikawa, T., Toda, G., & Tanaka, M. (1994). Immunohistochemical study of expression and cellular localization of the multidrug resistance gene product P-glycoprotein in primary liver carcinoma. *Cancer*, 73(2), 298–303.
- Izquierdo, M. A., Scheffer, G. L., Schroeijers, A. B., de Jong, M. C., & Scheper, R. J. (1998). Vault-related resistance to anticancer drugs determined by the expression of the major vault protein LRP. *Cytotechnology*, 27(1-3), 137–48.
- Jadvar, H., Alavi, A., & Gambhir, S. S. (2009). 18F-FDG uptake in lung, breast, and colon cancers: molecular biology correlates and disease characterization. *Journal of Nuclear Medicine*, 50(11), 1820–7.
- Jain, R., Fischer, S., Serra, S., & Chetty, R. (2010). The use of Cytokeratin 19 (CK19) immunohistochemistry in lesions of the pancreas, gastrointestinal tract, and liver. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 18(1), 9–15.
- Jakubowicz-gil, J., Langner, E., & Dorota, B. (2013). Apoptosis induction in human glioblastoma multiforme T98G cells upon temozolomide and quercetin treatment. *Tumor Biology*, 34(4):2367-78.
- Jans, J., van Dijk, J. H., van Schelven, S., van der Groep, P., Willems, S. H., Jonges, T. N., van Diest, P. J., & Bosch, J. L. (2010). Expression and localization of hypoxia proteins in prostate cancer: prognostic implications after radical prostatectomy. *Urology*, 75(4), 786–92.

- Janus, F., Albrechtsen, N., Dornreiter, I., Wiesmüller, L., Grosse, F., & Deppert, W. (1999). The dual role model for p53 in maintaining genomic integrity. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 55(1), 12–27.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., & Forman, D. (2011). Global Cancer Statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*, 61(2), 69–90.
- Jezek, P., Plecítá-Hlavatá, L., Smolková, K., & Rossignol, R. (2010). Distinctions and similarities of cell bioenergetics and the role of mitochondria in hypoxia, cancer, and embryonic development. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42(5), 604–22.
- Jia, L. Q., Osada, M., Ishioka, C., Gamo, M., Ikawa, S., Suzuki, T., Shimodaira, H., Niitani, T., Kudo, T., Akiyama, M., Kimura, N., Matsuo, M., Mizusawa, H., Tanaka, N., Koyama, H., Namba, M., Kanamaru, R., & Kuroki, T. (1997). Screening the p53 status of human cell lines using a yeast functional assay. *Molecular Carcinogenesis*, 19(4), 243–53.
- Jiang, J., Sugimoto, Y., Liu, S., Chang, H., Park, K., Kulp, S. K., & Lin, Y. C. (2004). The Inhibitory Effects of Gossypol on Human Prostate Cancer Cells-PC3 are Associated with Transforming Growth Factor Beta 1 (TGF , 1) Signal Transduction Pathway. *Anticancer Research*, 100, 91–100.
- Johnson, M. K., & Loo, G. (2000). Effects of epigallocatechin gallate and quercetin on oxidative damage to cellular DNA. *Mutation Research*, 211–218.
- Johnson, P. J. (2000). Systemic chemotherapy of liver tumors. *Seminars in Surgical Oncology*, 19(2), 116–24.
- Jung, J. H., Lee, J. O., Kim, J. H., Lee, S. K., You, G. Y., Park, S. H., Park, J. M., Kim, E. K., Suh, P. G., An, J. K., & Kim, H. S. (2010). Quercetin suppresses HeLa cell viability via AMPK-induced HSP70 and EGFR down-regulation. *Journal of Cellular Physiology*, 223(2), 408–14.
- Kable, E. P., & Parsons, P. G. (1988). Potency, selectivity and cell cycle dependence of catechols in human tumour cells in vitro. *Biochemical Pharmacology*, 37(9), 1711–5.
- Kaino, M. (1997). Alterations in the tumor suppressor genes p53, RB, p16/MTS1, and p15/MTS2 in human pancreatic cancer and hepatoma cell lines. *Journal of Gastroenterology*, 32, 40–46.
- Kalia, M. (2013). Personalized oncology: recent advances and future challenges. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 62 Suppl 1, S11–4.
- Kang, M. H., & Reynolds, C. P. (2009). Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. *Clinical Cancer Research*, 15(4), 1126–32.
- Kapiszewska, M., Visioli, F., & Cierniak, A. (2005). The protective ability of the mediterranean plant extracts against the oxidative DNA damage. The role of the radical oxygen species and the polyphenol content. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 56, 183–197.
- Karaca, B., Atmaca, H., Bozkurt, E., Kisim, A., Uzunoglu, S., Karabulut, B., Sezgin, C., Sanli, U. A., & Uslu, R. (2013). Combination of AT-101/cisplatin overcomes chemoresistance

- by inducing apoptosis and modulating epigenetics in human ovarian cancer cells. *Molecular Biology Reports*, 40(6), 3925–33.
- Kardeh, S., Ashkani-Esfahani, S., & Alizadeh, A. M. (2014). Paradoxical action of reactive oxygen species in creation and therapy of Cancer. *European Journal of Pharmacology*, 1–19.
- Karim, S., Adams, D. H., & Lalor, P. F. (2012). Hepatic expression and cellular distribution of the glucose transporter family. *World Journal of Gastroenterology*, 18(46), 6771–81.
- Kasahara, M., & Hinkle, P. C. (1977). Reconstitution and purification of the D-glucose transporter from human erythrocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 252(20), 7384–90.
- Kastan, M. B., Canman, C. E., & Leonard, C. J. (1995). P53, cell cycle control and apoptosis: implications for cancer. *Cancer Metastasis Reviews*, 14(1), 3–15. R
- Keniry, M. A. X. A., Townsend, J., Fred, W., & Cowan, H. (1990). Biochemical Correlates Properties of Gossypol of the Antitumor Enantiomers and Antimitochondrial. *Molecular Pharmacology*, 37, 840–847.
- Kent, C. R., Eady, J. J., Ross, G. M., & Steel, G. G. (1995). The comet moment as a measure of DNA damage in the comet assay. *International Journal of Radiation Biology*, 67(6), 655–60.
- Kuivila, H. G., Beumel Jr, O. F. (1957). Reduction of ketones with diphenyltin dihydride. A new type of hydride reduction. *Journal of the American Chemical Society*, 83(1), 3798–3799.
- Khan, S. A., Thomas, H. C., Toledano, M. B., Cox, I. J., & Taylor-Robinson, S. D. (2005). p53 Mutations in human cholangiocarcinoma: a review. *Liver International*, 25(4), 704–16.
- Kim, G. T., Lee, S. H., Kim, J. Il, & Kim, Y. M. (2014). Quercetin regulates the sestrin 2-AMPK-p38 MAPK signaling pathway and induces apoptosis by increasing the generation of intracellular ROS in a p53-independent manner. *International Journal of Molecular Medicine*, 33(4), 863–9.
- Kim, H., Moon, J. Y., Ahn, K. S., & Cho, S. K. (2013). Quercetin induces mitochondrial mediated apoptosis and protective autophagy in human glioblastoma U373MG cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, 596496. doi:10.1155/2013/596496
- Kim, Y. H., Lee, D. H., Jeong, J. H., Guo, Z. S., & Lee, Y. J. (2008). Quercetin augments TRAIL-induced apoptotic death: involvement of the ERK signal transduction pathway. *Biochemical Pharmacology*, 75(10), 1946–58.
- Kitada, S., Leone, M., Sareth, S., Zhai, D., Reed, J. C., & Pellecchia, M. (2003). Discovery, characterization, and structure-activity relationships studies of proapoptotic polyphenols targeting B-cell lymphocyte/leukemia-2 proteins. *Journal of Medicinal Chemistry*, 46(20), 4259–64.

- Ko, C. H., Shen, S. C., Yang, L. Y., Lin, C. W., & Chen, Y. C. (2007). Gossypol reduction of tumor growth through ROS-dependent mitochondria pathway in human colorectal carcinoma cells. *International Journal of Cancer*, 121(8), 1670–9.
- Köberle, B., Tomicic, M. T., Usanova, S., & Kaina, B. (2010). Cisplatin resistance: preclinical findings and clinical implications. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1806(2), 172–82.
- Kondoh, H. (2008). Cellular life span and the Warburg effect. *Experimental Cell Research*, 314(9), 1923–8.
- Kovacic, P. (2003). Mechanism of drug and toxic actions of gossypol: focus on reactive oxygen species and electron transfer. *Current Medicinal Chemistry*, 10(24), 2711–8.
- Kruh, G. D., & Belinsky, M. G. (2003). The MRP family of drug efflux pumps. *Oncogene*, 22(47), 7537–52.
- Kudo, M., Naito, Z., Yokoyama, M., & Asano, G. (1999). Effects of quercetin and sunphenon on responses of cancer cells to heat shock damage. *Experimental and Molecular Pathology*, 66(1), 66–75.
- Kukongviriyapan, V., Phromsopha, N., Tassaneeyakul, W., Kukongviriyapan, U., Sripa, B., Hahnvajanawong, V., & Bhudhisawasdi, V. (2006). Inhibitory effects of polyphenolic compounds on human arylamine N-acetyltransferase 1 and 2. *Xenobiotica; the Fate of Foreign Compounds in Biological Systems*, 36(1), 15–28.
- Lan, B., Kwee, S., & Wong, L. (2013). Positron Emission Tomography (PET) in Hepatobiliary and Pancreatic Malignancies: a Review. *American journal of surgery*, 204(2), 232–241.
- Landriscina, M., Maddalena, F., Laudiero, G., & Esposito, F. (2009). Adaptation to oxidative stress, chemoresistance, and cell survival. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11(11), 2701–16.
- Laughton, M., Halliwell, B., Evans, P., & Houlst, J. (1989). Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin. *Biochemical pharmacology*, 38(17), 2859–2865.
- Lee, C. H. (2010). Multi-Drug Resistance in Cancer. *Methods in Molecular Biology*, 596(325–40).
- Lee, D.H., Szczepanski, M., & Lee, Y. J. (2012). Role of BAX in quercetin-induced apoptosis in human prostate cancer cells. *Biochemical Pharmacology*, 75(12), 2345–2355.
- Lee, J. Il, Lee, J. W., Kim, J. M., Kim, J. K., Chung, H. J., & Kim, Y. S. (2012). Prognosis of hepatocellular carcinoma expressing cytokeratin 19: comparison with other liver cancers. *World Journal of Gastroenterology*, 18(34), 4751–7.
- Lee, J. D., Yang, W. I., Park, Y. N., Kim, K. S., Choi, J. S., Yun, M., ... Park, H. (2005). Different Glucose Uptake and Glycolytic Mechanisms Between Hepatocellular Carcinoma and Intrahepatic Mass-Forming Uptake. *The Journal of Nuclear Medicine*.
- Lee, T., Lau, T., & Ng, I. (2002). Doxorubicin-induced apoptosis and chemosensitivity in hepatoma cell lines. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 49(1), 78–86.

- Lei, X., Chen, Y., Du, G., Yu, W., Wang, X., Qu, H., Xia, B., He, H., Mao, J., Zong, W., Liao, X., Mehrpour, M., Hao, X., & Chen, Q. (2006). Gossypol induces Bax/Bak-independent activation of apoptosis and cytochrome c release via a conformational change in Bcl-2. *Federation of American Societies for Experimental Biology journal*, 20(12), 2147–9.
- Lencioni, R., Chen, X. P., Dagher, L., & Venook, A. P. (2010). Treatment of intermediate/advanced hepatocellular carcinoma in the clinic: how can outcomes be improved? *The Oncologist*, 15 Suppl 4, 42–52.
- Leslie, E. M., Deeley, R. G., & Cole, S. P. C. (2005). Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 204(3), 216–37.
- Lestini, B. J., Goldsmith, K. C., Fluchel, M. N., Liu, X., Chen, N. L., Goyal, B., Pawel, B. R., & Hogarty, M. D. (2009). Mcl1 downregulation sensitizes neuroblastoma to cytotoxic chemotherapy and small molecule Bcl2-family antagonists. *Cancer biology & therapy*, 8(16), 1587–1595.
- Li, A. S., Bandy, B., Tsang, S. S., & Davison, A. J. (2000). DNA-breaking versus DNA-protecting activity of four phenolic compounds in vitro. *Free Radical Research*, 33(5), 551–66.
- Li, C. J., & Elsasser, T. H. (2005). Butyrate-induced apoptosis and cell cycle arrest in bovine kidney epithelial cells : Involvement of caspase and proteasome pathways. *Journal of Animal Science*, 85, 89–97.
- Li, S., Yang, X., Wang, P., & Ran, X. (2013). The effects of GLUT1 on the survival of head and neck squamous cell carcinoma. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 32(3), 624–34.
- Li, Y., Schellhorn, H. E., & Szent-gyorgyi, A. (2007). New Developments and Novel Therapeutic Perspectives for Vitamin C. *The Journal of Nutrition*, 137(10):2171-84.
- Li, Z., Jiang, W., Zhu, Z., Zhu, X., Zhou, J., Liu, Z., & Yang, D. (2008). Synergistic cytotoxicity of Bcl-xL inhibitor gossypol and chemotherapeutic agents in non-Hodgkin ' s lymphoma cells. *Cancer Biology & Therapy*, 7(1):51-60.
- Lian, J., Ni, Z., Dai, X., Su, C., Smith, A. R., Xu, L., & He, F. (2012). Sorafenib sensitizes (-)-gossypol-induced growth suppression in androgen-independent prostate cancer cells via Mcl-1 inhibition and Bak activation. *Molecular Cancer Therapeutics*, 11(2), 416–26.
- Liang, Y., Liu, J., & Feng, Z. (2013). The regulation of cellular metabolism by tumor suppressor p53. *Cell & Bioscience*, 3(1), 9.
- Ligueros, M., Jeoung, D., Tang, B., Hochhauser, D., Reidenberg, M. M., & Sonenberg, M. (1997). Gossypol inhibition of mitosis, cyclin D1 and Rb protein in human mammary cancer cells and cyclin-D1 transfected human fibrosarcoma cells. *British Journal of Cancer*, 76(1), 21–8.
- Lim, C., Wai, D., Lee, K. H., & Tan, K. C. (2010). Current and emerging treatments for cholangiocarcinoma. *International Journal of Hepatology*, 1(4), 25–35.

- Linke, S. P., Clarkin, K. C., Leonardo, A. Di, Tsou, A., & Wahl, G. M. (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):934-47.
- Liu, K., Yen, C., Wu, R. S., Yang, J., Lu, H., Lu, K., Lo, C., Chen, H. Y., Tang, N. Y., Wu, C., & Chung J. G. (2012). The Roles of Endoplasmic Reticulum Stress and Mitochondrial Apoptotic Signaling Pathway in Quercetin-Mediated Cell Death of Human Prostate Cancer PC-3 Cells. *Environmental Toxicology*, 29(4):428-39.
- Liu, Z., Ballinger, J. R., Rauth, A. M., Bendayan, R., & Wu, X. Y. (2003). Delivery of an anticancer drug and a chemosensitizer to murine breast sarcoma by intratumoral injection of sulfopropyl dextran microspheres. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 55(8), 1063-73.
- Llovet, J. M. (2005). Updated treatment approach to hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastroenterology*, 40(3), 225-35.
- Long, D., & Repata, A. (1981). Cisplatin: chemistry, distribution and biotransformation. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 2(1), 1-16.
- Longley, D. B., Harkin, D. P., & Johnston, P. G. (2003). 5-Fluorouracil: Mechanisms of Action and Clinical Strategies. *Nature Reviews Cancer*, 3(5), 330-8.
- Ma, S., Jiao, B., Liu, X., Yi, H., Kong, D., Gao, L., Zhao, G., Yang, Y., & Liu, X. (2010). Approach to radiation therapy in hepatocellular carcinoma. *Cancer Treatment Reviews*, 36(2), 157-63.
- Macheda, M. L., Rogers, S., & Best, J. D. (2005). Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *Journal of Cellular Physiology*, 202(3), 654-62.
- Martin, H.-J., Kornmann, F., & Fuhrmann, G. F. (2003). The inhibitory effects of flavonoids and antiestrogens on the Glut1 glucose transporter in human erythrocytes. *Chemico-Biological Interactions*, 146(3), 225-235.
- Mathupala, S., Ko, Y., & Pedersen, P. (2006). Hexokinase II: Cancer's double-edged sword acting as both facilitator and gatekeeper of malignancy when bound to mitochondria. *Oncogene*, 25(34), 4777-4786.
- Mazzanti, R., Gramantieri, L., & Bolondi, L. (2008). Hepatocellular carcinoma: epidemiology and clinical aspects. *Molecular Aspects of Medicine*, 29(1-2), 130-43.
- Mego, M. (2002). Telomerase inhibitors in anticancer therapy: gossypol as a potential telomerase inhibitor. *Bratislavské Lekárske Listy*, 103(10), 378-81.
- Meng Y, Tang W, Dai Y, Wu X, Liu M, Ji Q, Ji M, Pienta K, Lawrence T, X. L. (2008). Natural BH3-mimetic (-)-gossypol chemosensitizes human prostate cancer via Bcl-xL inhibition accompanied by increase of Puma and Noxa. *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(7):2192-202.
- Messiha, F. S. (1991). Effect of Gossypol on Kinetics of Mouse Liver Alcohol and Aldehyde Dehydrogenase. *General pharmacology*, 22(4), 573-576.

- Minamimoto, R., Uemura, H., Sano, F., Terao, H., Nagashima, Y., Yamanaka, S., Shizukuishi, K., Tateishi, U., Kubota, Y., & Inoue, T. (2011). The potential of FDG-PET/CT for detecting prostate cancer in patients with an elevated serum PSA level. *Annals of Nuclear Medicine*, 25(1), 21–7.
- Minderman, H., Loughlin, K. L. O., Pendyala, L., & Baer, M. R. (2004). VX-710 (Biricodar) Increases Drug Retention and Enhances Chemosensitivity in Resistant Cells Overexpressing P-Glycoprotein , Multidrug Resistance Protein , and Breast Cancer Resistance Protein VX-710 (Biricodar) Increases Drug Retention and Enhances C. *Clinical Cancer Research*, 10(12), 1826–1834.
- Moldéus, P., Högberg, J., & Orrenius, S. (1978). Isolation and use of liver cells. *Methods in Enzymology*, 52, 60–71.
- Moon, D., Kim, M., Choi, Y., Lee, H., Kim, N., & Kim, G. (2008). Gossypol supresses telomerase activity in human leukemia cells via regulating hTERT. *FEBS Letters*, 582, 3367–3373.
- Moreira, L., Araújo, I., Costa, T., Correia-Branco, A., Faria, A., Martel, F., & Keating, E. (2013). Quercetin and epigallocatechin gallate inhibit glucose uptake and metabolism by breast cancer cells by an estrogen receptor-independent mechanism. *Experimental Cell Research*, 319(12), 1784–95.
- Murphy, K. M., Ranganathan, V., & Farnsworth, M. L. (2000). Bcl-2 inhibits Bax translocation from cytosol to mitochondria during drug-induced apoptosis of human tumor cells. *Cell Death and Differentiation*, 7(1):102-11.
- Musonda, C. A., & Chipman, J. K. (1998). Quercetin inhibits hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced NF-kappaB DNA binding activity and DNA damage in HepG2 cells. *Carcinogenesis*, 19(9), 1583–9.
- Nakabayashi, H., Taketa, K., Miyani, K., Yamane, T., & Sato, J.. (1982). Growth of Human Hepatoma Cell Lines with Differentiated Functions in Chemically Defined Medium. *Cancer Research*, 42, 3858–3863.
- Nakajima, E. C., & Van Houten, B. (2013). Metabolic symbiosis in cancer: refocusing the Warburg lens. *Molecular Carcinogenesis*, 52(5), 329–37.
- Nakamura, M., Ikeda, M., Okinaga, S., & Arai, K. (1988). Metabolism of Round Spermatids in the Rat: Effect of Gossypol on the Glucose Transport Stoffwechsel der runden Spermatiden bei der Ratte: Der EinfluD von Gossypol auf den Glukose-Transport. *Andrologia*, 20(5).
- Neuveut, C., Wei, Y., & Buendia, M. A. (2010). Mechanisms of HBV-related hepatocarcinogenesis. *Journal of Hepatology*, 52(4), 594–604.
- Ng IO, Liu CL, Fan ST, N. M. (2000). Expression of P-Glycoprotein in Hepatocellular Carcinoma. A Determinant of Chemotherapy Response. *American journal of clinical pathology*, 113(3):355-63.
- Noel, M. S., & Hezel, A. F. (2013). New and emerging treatment options for biliary tract cancer. *OncoTargets and Therapy*, 6, 1545–1552.

- Noguchi, Y., Saito, a, Miyagi, Y., Yamanaka, S., Marat, D., Doi, C., Yoshikawa, T., Tsuburaya, A., Ito, T., & Satoh, S. (2000). Suppression of facilitative glucose transporter 1 mRNA can suppress tumor growth. *Cancer Letters*, 154(2), 175–82.
- Nomura, M., Takahashi, T., Nagata, N., Tsutsumi, K., Kobayashi, S., Akiba, T., Yokogawa, K., Moritani, S., & Miyamoto, K. (2008). Inhibitory mechanisms of flavonoids on insulin-stimulated glucose uptake in MC3T3-G2/PA6 adipose cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 31(7), 1403–9.
- Norbury, C. J., & Zhivotovsky, B. (2004). DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene*, 23(16), 2797–808.
- Nöthlings, U., Murphy, S. P., Wilkens, L. R., Henderson, B. E., & Kolonel, L. N. (2007). Flavonols and pancreatic cancer risk: the multiethnic cohort study. *American Journal of Epidemiology*, 166(8), 924–31.
- Ostling, K. J. (1984). MICRDELECTKOPHORETIC STUDY OF RADIATION-INDUCED DNA DAMAGES IN INDIVIDUAL MAMMALIAN CELLS. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123(1), 291–298.
- Ojeda, P., Valenzuela, X., Ortega, M., Sa, C., Ojeda, L., Castro, M., Cárcamo, J. G., Rauch, M. C., Concha, I. I., Rivas, C. I., Vera, J. C., & Reyes, A. M. (2009). Endofacial competitive inhibition of the glucose transporter 1 activity by gossypol. *American journal of physiology. Cell physiology*, 86–93.
- Okaro, A. C., Deery, A. R., Hutchins, R. R., & Davidson, B. R. (2001). The expression of antiapoptotic proteins Bcl-2, Bcl-X(L), and Mcl-1 in benign, dysplastic, and malignant biliary epithelium. *Journal of Clinical Pathology*, 54(12), 927–32.
- Olive, P. L., & Banáth, J. P. (2006). The comet assay : a method to measure DNA damage in individual cells. *Cancer Research*, 1(1), 23–29.
- Oliver, C. L., Miranda, M. B., Shangary, S., Land, S., Wang, S., & Johnson, D. E. (2005). (-) - Gossypol acts directly on the mitochondria to overcome Bcl-2- and Bcl-X L -mediated apoptosis resistance Bcl-2- and Bcl-X L -mediated apoptosis resistance. *Molecular cancer therapeutics*, 4(1):23-31.
- On, E., Order, M., & Permeability, L. (1986). MEMBRANE STRUCTURAL / FUNCTIONAL PERTURBATIONS INDUCED BY GOSSYPOL AND. *Biochemical Pharmacology*, 35(19), 3293–3300.
- Ozaki, T., & Nakagawara, A. (2005). p73, a sophisticated p53 family member in the cancer world. *Cancer Science*, 96(11), 729–37.
- Pang, X., Wu, Y., Wu, Y., Lu, B., Chen, J., Wang, J., Yi, Z., Qu, W., & Liu, M. (2011). (-)-Gossypol suppresses the growth of human prostate cancer xenografts via modulating VEGF signaling-mediated angiogenesis. *Molecular Cancer Therapeutics*, 10(5), 795–805. doi:10.1158/1535-7163.MCT-10-0936
- Park, J. B. (1999). Flavonoids are potential inhibitors of glucose uptake in U937 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 260(2), 568–74.

- Paudyal, B., Paudyal, P., Oriuchi, N., Tsushima, Y., Nakajima, T., & Endo, K. (2008). Clinical implication of glucose transport and metabolism evaluated by 18 F-FDG PET in hepatocellular carcinoma. *International Journal of Oncology*, 1047–1054.
- Pelicano, H., Martin, D. S., Xu, R.-H., & Huang, P. (2006). Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene*, 25(34), 4633–46.
- Pérez, A., Ojeda, P., Ojeda, L., Salas, M., Rivas, C. I., Vera, J. C., & Reyes, A. M. (2011). Hexose transporter GLUT1 harbors several distinct regulatory binding sites for flavones and typhostins. *Biochemistry*, 50(41), 8834–45.
- Pérez, A., Ojeda, P., Valenzuela, X., Ortega, M., Sánchez, C., Ojeda, L., Castro, M., Cárcamo, J. G., Rauch, M. C., Concha, I. I., Rivas, C. I., Vera, J. C., & Reyes, A. M. (2009). Endofacial competitive inhibition of the glucose transporter 1 activity by gossypol. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 297(1), C86–93. doi:10.1152/ajpcell.00501.2008
- Petros, A. M., Olejniczak, E. T., & Fesik, S. W. (2004). Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Mutagenesis*, 1644, 83 – 94.
- Pignochino, Y., Sarotto, I., Peraldo-Neia, C., Penachioni, J. Y., Cavalloni, G., Migliardi, G., Casorzo, L., Chiorino, G., Risio, M., Bardelli, A., Aglietta, M., & Leone, F. (2010). Targeting EGFR/HER2 pathways enhances the antiproliferative effect of gemcitabine in biliary tract and gallbladder carcinomas. *BMC Cancer*, 10(1), 631.
- Pinter, M., Sieghart, W., Reisinger, M., Wrba, F., & Peck-Radosavljevic, M. (2011). Sorafenib in unresectable intrahepatic cholangiocellular carcinoma: a case report. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 123(1-2), 61–4.
- Piwnica-worms, D., Chiu, M. L., Budding, M., Complex, O., Chiã, M. L., Kronauge, J. F., Kramer, R. A., & Croop, J. M. (1993). Functional imaging of multidrug-resistant P-glycoprotein with an organotechnetium complex. *Cancer Research*, 53, 977–984.
- Piwnica-Worms, D., Kronauge, J. F., & Chiu, M. L. (1990). Uptake and retention of hexakis (2-methoxyisobutyl isonitrile) technetium(I) in cultured chick myocardial cells. Mitochondrial and plasma membrane potential dependence. *Circulation*, 82(5), 1826–1838.
- Poznak, C. Van, Seidman, A. D., Reidenberg, M. M., Moasser, M. M., Sklarin, N., Zee, K. Van, Borgen, P., Gollub, M., Bacotti, D., Yao, T. J., Bloch, R., Ligueros, M., Sonenberg, M., & Hudis, C. (2001). Oral gossypol in the treatment of patients with refractory metastatic breast cancer: A phase I / II clinical trial. *Breast Cancer Research and Treatment*, 755(66), 239–248.
- Qiu, J., Levin, L. R., Buck, J., & Reidenberg, M. M. (2002). Different pathways of cell killing by gossypol enantiomers. *Experimental Biology and Medicine*, 227(6), 398–401.
- Quintana, P., Peyster, A., Klatzke, S., & Park, H. (2000). Gossypol-induced DNA breaks in rat lymphocytes are secondary to cytotoxicity. *Toxicology Letters*, 117, 85–94.
- Rabkin, Z., Israel, O., & Keidar, Z. (2010). Do hyperglycemia and diabetes affect the incidence of false-negative 18F-FDG PET/CT studies in patients evaluated for

- infection or inflammation and cancer? A Comparative analysis. *Journal of Nuclear Medicine*, 51(7), 1015–20.
- Rafehi, H., Orłowski, C., Georgiadis, G. T., Ververis, K., El-osta, A., & Karagiannis, T. C. (2011). Clonogenic Assay : Adherent Cells. *Journal of visualized experiments*, (49). pii: 2573. doi: 10.3791/2573.
- Rajagopalan, K., & DeBerardinis, R. (2012). Role of GLutamine in Cancer - Therapeutic and Imaging Implications. *Journal of nuclear medicine*, 52(7), 1005–1008.
- Ramos, A. A., Lima, C. F., Pereira, M. L., Fernandes-Ferreira, M., & Pereira-Wilson, C. (2008). Antigenotoxic effects of quercetin, rutin and ursolic acid on HepG2 cells: evaluation by the comet assay. *Toxicology Letters*, 177(1), 66–73.
- Raoul, J. L. (2008). Natural history of hepatocellular carcinoma and current treatment options. *Seminars in Nuclear Medicine*, 38(2), S13–8.
- Raskopf, E., Dzienisowicz, C., Hilbert, T., Rabe, C., Leifeld, L., Wernert, N., Sauerbruch, T., Prieto, J., Qian, C., Caselmann, W. H., & Schmitz, V. (2005). Effective angiostatic treatment in a murine metastatic and orthotopic hepatoma model. *Hepatology*, 41(6), 1233–40.
- Rastogi, S., Banerjee, S., Chellappan, S., & Simon, G. R. (2007). Glut-1 antibodies induce growth arrest and apoptosis in human cancer cell lines. *Cancer Letters*, 257(2), 244–51.
- Ready, N., Karaseva, N. A., Orlov, S. V., Luft, A. V., Popovych, O., Holmlund, J. T., Wood, B. A., & Leopold, L. (2011). Double-Blind, Placebo-Controlled, Randomized Phase 2 Study of the Proapoptotic Agent AT-101 Plus Docetaxel, in Second-Line Non-small Cell Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 6(4), 781–785.
- Reiser, M., Neumann, I., Schmiegel, W., Wu, P. C., & Lau, J. Y. (2000). Induction of cell proliferation arrest and apoptosis in hepatoma cells through adenoviral-mediated transfer of p53 gene. *Journal of Hepatology*, 32(5), 771–82.
- Rekha GK, S. N. (1997). Inhibition of Human Class 3 Aldehyde Dehydrogenase, and Sensitization of Tumor Cells that Express Significant Amounts of this Enzyme to Oxazaphosphorines, by the Naturally Occuring Compound Gossypol. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 133–146.
- Riedl, C. C., Akhurst, T., Larson, S., Stanziale, S. F., 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(5), 771–5.
- Rieger, A. M., Nelson, K. L., Konowalchuk, J. D., & Barreda, D. R. (2011). Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *Journal of Visualized Experiments*, (50), 37–40.
- Rodríguez-enríquez, S., Marín-hernández, A., Gallardo-pérez, J. C., Carreño-fuentes, L., & Moreno-sánchez, R. (2009). Targeting of cancer energy metabolism. *Molecular nutrition & food research*, 53(1):29-48

- Roos, W. P., & Kaina, B. (2006). DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends in molecular medicine*, 12(9):440-50.
- Roy Choudhury, S., Karmakar, S., Banik, N. L., & Ray, S. K. (2010). Synergistic efficacy of sorafenib and genistein in growth inhibition by down regulating angiogenic and survival factors and increasing apoptosis through upregulation of p53 and p21 in malignant neuroblastoma cells having N-Myc amplification or non-amplified. *Investigational New Drugs*, 28(6), 812–24.
- Russo, M., Spagnuolo, C., Tedesco, I., Bilotto, S., & Russo, G. L. (2012). The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: facts and fancies. *Biochemical Pharmacology*, 83(1), 6–15.
- Russo, M., Spagnuolo, C., Volpe, S., Tedesco, I., Bilotto, S., & Russo, G. L. (2013). ABT-737 resistance in B-cells isolated from chronic lymphocytic leukemia patients and leukemia cell lines is overcome by the pleiotropic kinase inhibitor quercetin through Mcl-1 down-regulation. *Biochemical Pharmacology*, 85(7), 927–36.
- Saijo, S., Kudo, T., Suzuki, M., Katayose, Y., Shinoda, M., Muto, T., Fukuhara, K., Suzuki, T., & Matsuno, S. (1995). Establishment of a New Extrahepatic Bile Duct Carcinoma Cell Line, TFK-1. *The Tohoku journal of experimental medicine*, 177(1):61-71.
- Sakaguchi, K., Herrera, J. E., Saito, S., Miki, T., Bustin, M., Vassilev, A., Anderson, C. W., & Appella, E. (1998). DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes & Development*, 12(18), 2831–2841.
- Saraswathy, M., & Gong, S. (2013). Different strategies to overcome multidrug resistance in cancer. *Biotechnology Advances*, 31(8), 1397–1407.
- Schattenberg, J. M., Schuchmann, M., & Galle, P. R. (2011). Cell death and hepatocarcinogenesis: Dysregulation of apoptosis signaling pathways. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 26 Suppl 1, 213–9.
- Schoder, H., & Larson, S. (2004). Positron emission tomography for prostate, bladder, and renal cancer. *Seminars in Nuclear Medicine*, 34(4), 274–292.
- Scholzen, T., & Gerdes, J. (2000). The Ki-67 Protein: From the Known and. *Journal of Cellular Physiology*, 322(August 1999), 311–322.
- Schütte, K., Bornschein, J., & Malfertheiner, P. (2009). Hepatocellular carcinoma--epidemiological trends and risk factors. *Digestive Diseases*, 27(2), 80–92.
- Schwartzberg-bar-yoseph, F., Armoni, M., & Karnieli, E. (2004). The Tumor Suppressor p53 Down-Regulates Glucose Transporters GLUT1 and GLUT4 Gene Expression The Tumor Suppressor p53 Down-Regulates Glucose Transporters GLUT1 and GLUT4 Gene Expression. *Cancer Research*, 2627–2633.
- Seewoo, V., Yang, W., Du, H., Wang, J., Lin, A., Shen, B., Peng, C., Li, H., & Qiu, W. (2012). The different induction mechanisms of growth arrest DNA damage inducible gene 45 β in human hepatoma cell lines. *Chemotherapy*, 58(2), 165–74.

- Senggunprai, L., Kukongviriyapan, V., Prawan, A., & Kukongviriyapan, U. (2013). Quercetin and EGCG Exhibit Chemopreventive Effects in Cholangiocarcinoma Cells via Suppression of JAK/STAT Signaling Pathway. *Phytotherapy Research*, 28(6):841-8.
- Seo, H., Ju, J., Jang, K., & Shin, I. (2011). Induction of apoptotic cell death by phytoestrogens by up-regulating the levels of phospho-p53 and p21 in normal and malignant estrogen receptor α - negative breast cells. *Nutrition Research*, 31(2), 139-146.
- 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(2 Pt 1), 427-33.
- Seo, S., Hatano, E., Higashi, T., Nakajima, A., Nakamoto, Y., Tada, M., Tamaki, N., Iwaisako, K., Mori, A., Doi, R., Ikai, I., & Uemoto, S. (2008). Fluorine-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography predicts lymph node metastasis, P-glycoprotein expression, and recurrence after resection in mass-forming intrahepatic cholangiocarcinoma. *Surgery*, 143(6), 769-77.
- 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 18 F-fluorodeoxyglucose accumulation in hepatocellular carcinoma in vivo and in vitro. *International Journal of Oncology*, 1303-1312.
- Seufi, A. M., Ibrahim, S. S., Elmaghraby, T. K., & Hafez, E. E. (2009). Preventive effect of the flavonoid, quercetin, on hepatic cancer in rats via oxidant/antioxidant activity: molecular and histological evidences. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 11;28:80.
- Sharma, B., Martin, A., & Zerizer, I. (2013). Positron Emission Tomography-Computed Tomography in Liver Imaging. *Seminars in Ultrasound, CT and MRI*, 34(1), 66-80.
- Shen, D. W., Lu, Y. G., Chin, K. V., Pastan, I., & Gottesman, M. M. (1991). Human hepatocellular carcinoma cell lines exhibit multidrug resistance unrelated to MRD1 gene expression. *Journal of Cell Science*, 98 (Pt 3), 317-22.
- Shen, J., Samul, R., Silva, R. L., Akiyama, H., Liu, H., Saishin, Y., Hackett, S. F., Zinnen, S., Kossen, K., Fosnaugh, K., Vargeese, C., Gomez, A., Bouhana, K., Aitchison, R., Pavco, P., & Campochiaro, P. A. (2006). Suppression of ocular neovascularization with siRNA targeting VEGF receptor 1. *Gene Therapy*, 13(3), 225-34.
- Shi, M., Wang, F.-S., & Wu, Z.Z. (2003). Synergetic anticancer effect of combined quercetin and recombinant adenoviral vector expressing human wild-type p53, GM-CSF and B7-1 genes on hepatocellular carcinoma cells in vitro. *World Journal of Gastroenterology*, 9(1), 73-8.
- Shimanishi, M., Ogi, K., Sogabe, Y., Kaneko, T., Dehari, H., Miyazaki, A., & Hiratsuka, H. (2013). Silencing of GLUT-1 inhibits sensitization of oral cancer cells to cisplatin during hypoxia. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 42(5), 382-8.
- Singh, N. P., McCoy, T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. (1988). Technique for Quantitation Damage in Individual of Low Levels of DNA Cells '. *Experimental Cell Research*, 175, 184-191.

- Smith, T. A. D. (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, T. A. D., Sharma, R. I., Thompson, A. M., & Paulin, F. E. M. (2006). Tumor 18 F-FDG Incorporation Is Enhanced by Attenuation of P53 Function in Breast Cancer Cells In Vitro. *The Journal of Nuclear Medicine*, 47, 1525–1530.
- Soini, Y., Virkajärvi, N., Raunio, H., & Pääkkö, P. (1996). Expression of P-glycoprotein in hepatocellular carcinoma: a potential marker of prognosis. *Journal of Clinical Pathology*, 49(6), 470–3.
- Soussi, T., & Lozano, G. (2005). P53 Mutation Heterogeneity in Cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 331(3), 834–42.
- Stavrovskaya, A. A. (2000). Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells. *Biochemistry. Biokhimiia*, 65(1), 95–106.
- Stein, R. C., Joseph, A. E. A., Matlin, S. A., Cunninghaml, D. C., Ford, H. T., & Coombesl, R. C. (1992). A preliminary clinical study of gossypol in advanced human cancer. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 30(6):480-2.
- Sugiyama, H., Onuki, K., Ishige, K., Baba, N., Ueda, T., Matsuda, S., Takeuchi, K., Onodera, M., Nakanuma, Y., Yamato, M., Yamamoto, M., Hyodo, I., & Shoda, J. (2011). Potent in vitro and in vivo antitumor activity of sorafenib against human intrahepatic cholangiocarcinoma cells. *Journal of Gastroenterology*, 46(6), 779–89.
- Suzawa, N., Ito, M., Qiao, S., Uchida, K., Takao, M., Yamada, T., Takeda, K., & Murashima, S. (2011). Assessment of factors influencing FDG uptake in non-small cell lung cancer on PET/CT by investigating histological differences in expression of glucose transporters 1 and 3 and tumour size. *Lung Cancer*, 72(2), 191–8.
- Takanaga, H., & Frommer, W. B. (2010). Facilitative plasma membrane transporters function during ER transit. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 24(8), 2849–58.
- Tan, J., Wang, B., & Zhu, L. (2009). Regulation of Survivin and Bcl-2 in HepG2 Cell Apoptosis Induced by Quercetin. *Chemistry & Biodiversity*, 6, 1101–1110.
- Tanno, S., Yanagawa, N., Habiro, A., Koizumi, K., Nakano, Y., Osanai, M., Mizukami, Y., Okumura, T., Testa, J. R., & Kohgo, Y. (2004). Serine/Threonine Kinase AKT is Frequently Activated in Human Bile Duct Cancer and is Associated with Increased Radioresistance. *Cancer Research*, 64, 3486–3490.
- Tepsiri, N., Chaturat, L., Sriipa, B., Namwat, W., Wongkham, S., Bhudhisawasdi, V., & Tassaneeyakul, W. (2005). Drug sensitivity and drug resistance profiles of human intrahepatic cholangiocarcinoma cell lines. *World Journal of Gastroenterology*, 11(18), 2748–53.
- Thongprasert, S. (2005). The role of chemotherapy in cholangiocarcinoma. *Annals of Oncology*, 16(Supplement 2), 93–96.

- Tibor, Z., Tóth, Á., Mikecz, P., Fodor, Z., & Szabó, G. (2010). Pgp inhibition by UIC2 antibody can be followed in vitro by using. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *41*, 665–669.
- Tokino, T., & Nakamura, Y. (2000). The role of p53-target genes in human cancer. *Critical Reviews in Oncology/hematology*, *33*(1), 1–6.
- Tralhao, J. G., Roudier, J., Morosan, S., Giannini, C., Tu, H., Goulenok, C., Zavala, F., Joulin, V., Kremsdorf, D., & Bréchet C. (2002). Paracrine in vivo inhibitory effects of hepatitis B virus X protein (HBx) on liver cell proliferation: an alternative mechanism of HBx-related pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(10), 6991–6.
- Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology*, *552*(Pt 2), 335–44.
- Uzoigwe, J., & Sauter, E. R. (2012). Cancer prevention and treatment using combination therapy with plant and animal-derived compounds. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, *5*(6):701-9.
- Mazzaferro, V., Regalia, E., Doci, R., Andreola, S., Pulvirenti, A., Bozzetti, F., Montalto, F., Ammatuna, M., Morabito, A., & Gennari, L. (1996). Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *The New England Journal of Medicine*, *334*(11), 693–699.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *39*(1), 44–84.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, *160*(1), 1–40.
- Van Engeland, M., Nieland, L. J., Ramaekers, F. C., Schutte, B., & Reutelingsperger, C. P. (1998). Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*, *31*(1), 1–9.
- Van Poznak, C., Seidman, a D., Reidenberg, M. M., Moasser, M. M., Sklarin, N., Van Zee, K., Borgen, P., Gollub, M., Bacotti, D., Yao, T. J., Bloch, R., Ligueros, M., Sonenberg, M., Norton, L., & Hudis, C. (2001). Oral gossypol in the treatment of patients with refractory metastatic breast cancer: a phase I/II clinical trial. *Breast Cancer Research and Treatment*, *66*(3), 239–48.
- Van Zanden, J. J., van der Woude, H., Vaessen, J., Usta, M., Wortelboer, H. M., Cnubben, N. H. P., & Rietjens, I. M. C. M. (2007). The effect of quercetin phase II metabolism on its MRP1 and MRP2 inhibiting potential. *Biochemical Pharmacology*, *74*(2), 345–51.
- Vander Borgh, S., Komuta, M., Libbrecht, L., Katoonizadeh, A., Aerts, R., Dymarkowski, S., Verslype, C., Nevens, F., & Roskams, T. (2008). Expression of multidrug resistance-associated protein 1 in hepatocellular carcinoma is associated with a more aggressive tumour phenotype and may reflect a progenitor cell origin. *Liver International*, *28*(10), 1370–80.

- Vander Heiden, M. G., & Thompson, C. B. (1999). Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nature Cell Biology*, 1(8), E209–16.
- Vargas, A. J., Sittadjody, S., Thangasamy, T., Mendoza, E. E., Limesand, K. H., & Burd, R. (2011). Exploiting tyrosinase expression and activity in melanocytic tumors: quercetin and the central role of p53. *Integrative Cancer Therapies*, 10(4), 328–40.
- Venook, A. P., Papandreou, C., Furuse, J., & de Guevara, L. L. (2010). The incidence and epidemiology of hepatocellular carcinoma: a global and regional perspective. *The Oncologist*, 15 Suppl 4, 5–13.
- Vera, J. C., Reyes, a M., Velásquez, F. V, Rivas, C. I., Zhang, R. H., Strobel, P., Núñez-Alarcón, J., & Golde, D. W. (2001). Direct inhibition of the hexose transporter GLUT1 by tyrosine kinase inhibitors. *Biochemistry*, 40(3), 777–90.
- Vidya Priyadarsini, R., Senthil Murugan, R., Maitreyi, S., Ramalingam, K., Karunagaran, D., & Nagini, S. (2010). The flavonoid quercetin induces cell cycle arrest and mitochondria-mediated apoptosis in human cervical cancer (HeLa) cells through p53 induction and NF- κ B inhibition. *European Journal of Pharmacology*, 649(1-3), 84–91.
- Vij, K., & Wang, H. L. (2008). Aberrant expression of alpha-fetoprotein in intrahepatic cholangiocarcinoma: an exceptional occurrence. *International Journal of Surgical Pathology*, 16(2), 194–8.
- Villanueva, A., Llovet, J. L. (2011). Targeted Therapies for Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*, 140(5), 1410–1426.
- Volate, S. R., Davenport, D. M., Muga, S. J., & Wargovich, M. J. (2005). Modulation of aberrant crypt foci and apoptosis by dietary herbal supplements (quercetin, curcumin, silymarin, ginseng and rutin). *Carcinogenesis*, 26(8), 1450–6.
- Von der Crone, S., Deppe, C., Barthel, a, Sasson, S., Joost, H. G., & Schürmann, a. (2000). Glucose deprivation induces Akt-dependent synthesis and incorporation of GLUT1, but not of GLUT4, into the plasma membrane of 3T3-L1 adipocytes. *European Journal of Cell Biology*, 79(12), 943–9.
- Wang, G., Wang, J. J., Yang, G. Y., Du, S. M., Zeng, N., Li, D. S., Li, R. M., Chen, J. Y., Feng, J. B., Yuan, S. H., & Ye, F. (2012). Effects of quercetin nanoliposomes on C6 glioma cells through induction of type III programmed cell death. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 271–80.
- Wang, G., Zhang, J., Liu, L., Sharma, S., & Dong, Q. (2012). Quercetin potentiates doxorubicin mediated antitumor effects against liver cancer through p53/Bcl-xl. *PloS One*, 7(12), e51764.
- Wang, J., Jin, L., Li, X., Deng, H., Chen, Y., Lian, Q., Ge, R., & Deng, H. (2013). Gossypol induces apoptosis in ovarian cancer cells through oxidative stress. *Molecular bioSystems*, 9(6), 1489–97.
- Wang, J., Wang, X., Xie, S., Yan, Z., Li, Z., Li, Y., Wang, L., & Jiao, F. (2011). P53 Status and Its Prognostic Role in Extrahepatic Bile Duct Cancer: a Meta-Analysis of Published Studies. *Digestive Diseases and Sciences*, 56(3), 655–62.

- Wang, J. Y. (2001). DNA damage and apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 8(11), 1047–8.
- Wang, K., Liu, R., Li, J., Mao, J., Lei, Y., Wu, J., Zeng, J., Zhang, T., Wu, H., Chen, L., Huang, C., & Wei, Y. (2011). Quercetin induces protective autophagy in gastric cancer cells. *Autophagy*, 7(9), 966–978.
- Wang, X. W., Hussain, S. P., Huo, T.-I., Wu, C.-G., Forgues, M., Hofseth, L. J., Brechot, C., Harris, C. C. (2002). Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Toxicology*, 181-182, 43–7.
- Wang, X., Wang, J., Wong, S. C., Chow, L. S., Nicholls, J. M., Wong, Y. C., Liu, Y., Kwong, D. L., Sham, J. S., & Tsa, S. W. (2000). Cytotoxic effect of gossypol on colon carcinoma cells. *Life Sciences*, 67(22), 2663–71.
- Wang, Y., & Rao, P. N. (1984). Effect of Gossypol on DNA Synthesis and Cell Cycle Progression of Mammalian Cells in Vitro Effect of Gossypol on DMA Synthesis and Cell Cycle Progression of Mammalian Cells in Wtro1. *Cancer Research*, 44, 35–38.
- Widnell, C. C. (1995). Control of glucose transport by GLUT1: regulated secretion in an unexpected environment. *Bioscience Reports*, 15(6), 427–43.
- Wilhelm, S. M., Adnane, L., Newell, P., Villanueva, A., Llovet, J. M., & Lynch, M. (2008). Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(10), 3129–40.
- Wong, F. Y., Liem, N., Xie, C., Yan, F. L., Wong, W. C., Wang, L., & Yong, W.-P. (2012). Combination therapy with gossypol reveals synergism against gemcitabine resistance in cancer cells with high BCL-2 expression. *PloS One*, 7(12), e50786.
- Wörns, M. a, & Galle, P. R. (2010). Future perspectives in hepatocellular carcinoma. *Digestive and Liver Disease : Official Journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*, 42 Suppl 3, S302–9.
- Wörns, M. A., Weinmann, A., Schuchmann, M., & Galle, P. R. (2009). Systemic therapies in hepatocellular carcinoma. *Digestive Diseases*, 27(2), 175–88.
- Xu, L., Yang, D., Wang, S., Tang, W., Liu, M., Davis, M., Chen, J., Rae, J. M., Lawrence, T., & Lippman, M. E. (2005). (-) -Gossypol enhances response to radiation therapy and results in tumor regression of human prostate cancer. *Molecular cancer therapeutics*, 197–205.
- Yamada, K., Brink, I., & Engelhardt, R. (2005). Factors influencing [F-18] 2-fluoro-2-deoxy-D-glucose (F-18 FDG) accumulation in melanoma cells: is FDG a substrate of multidrug resistance (MDR)? *The Journal of Dermatology*, 32(5), 335–45.
- Yamaguchi, M., & Weitzmann, M. N. (2011). Quercetin, a potent suppressor of NF-κB and Smad activation in osteoblasts. *International Journal of Molecular Medicine*, 28(4), 521–5.
- Yang, J. D., & Roberts, L. R. (2010). Hepatocellular carcinoma: A global view. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 7(8), 448–58.

- Yeh, Y. A., Herenyiova, M., & Weber, G. (1995). Quercetin: synergistic action with carboxyamidotriazole in human breast carcinoma cells. *Life Sciences*, 57(13).
- Yeo, W., Mok, T. S., Zee, B., Leung, T. W. T., Lai, P. B. S., Lau, W. Y., Koh, J., Mo, F. K., Yu, S. C., Chan, A. T., Hui, P., Ma, B., Lam, K. C., Ho, W. M., Wong, H. T., Tang, A., & Johnson, P. J. (2005). A randomized phase III study of doxorubicin versus cisplatin/interferon alpha-2b/doxorubicin/fluorouracil (PIAF) combination chemotherapy for unresectable hepatocellular carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 97(20), 1532–8.
- Young, C. D., Lewis, A. S., Rudolph, M. C., Ruehle, M. D., Jackman, M. R., Yun, U. J., Ilkun, O., Pereira, R., Abel, E. D., & Anderson, S. M. (2011). Modulation of glucose transporter 1 (GLUT1) expression levels alters mouse mammary tumor cell growth in vitro and in vivo. *PLoS One*, 6(8), e23205.
- Yu, C., Bruzek, L. M., Meng, X. W., Gores, G. J., Carter, C. a, Kaufmann, S. H., & Adjei, A. A. (2005). The role of Mcl-1 downregulation in the proapoptotic activity of the multikinase inhibitor BAY 43-9006. *Oncogene*, 24(46), 6861–9.
- Yu, M. C., & Yuan, J.-M. (2004). Environmental factors and risk for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 127(5), S72–S78.
- Yuan, Y., Tang, A. J., Castoreno, A. B., Kuo, S. Y., Wang, Q., Kuballa, P., Xavier, R., Shamji, A. F., Schreiber, S. L., & Wagner, B. K. (2013). Gossypol and an HMT G9a inhibitor act in synergy to induce cell death in pancreatic cancer cells. *Cell Death & Disease*, 4(6), e690.
- Zahreddine, H., & Borden, K. L. B. (2013). Mechanisms and insights into drug resistance in cancer. *Frontiers in Pharmacology*, 4(March), 28.
- Zamin, L. L., Filippi-Chiela, E. C., Dillenburg-Pilla, P., Horn, F., Salbego, C., & Lenz, G. (2009). Resveratrol and quercetin cooperate to induce senescence-like growth arrest in C6 rat glioma cells. *Cancer Science*, 100(9), 1655–62.
- Zauli, G., Celeghini, C., Melloni, E., Voltan, R., Ongari, M., Tiribelli, M., di lasio, M. G., Lanza, F., & Secchiero, P. (2012). The sorafenib plus nutlin-3 combination promotes synergistic cytotoxicity in acute myeloid leukemic cells irrespectively of FLT3 and p53 status. *Haematologica*, 97(11), 1722–30.
- Zen, Y., Fujii, T., Yoshikawa, S., Takamura, H., Tani, T., Ohta, T., & Nakanuma, Y. (2007). Histological and culture studies with respect to ABCG2 expression support the existence of a cancer cell hierarchy in human hepatocellular carcinoma. *The American Journal of Pathology*, 170(5), 1750–62.
- Zhang, J., Yi, T., Liu, J., Zhao, Z., & Chen, H. (2013). Quercetin Induces Apoptosis via the Mitochondrial Pathway in KB and KBv200 Cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61, 2188–2195.
- Zhang, M., Liu, H., Guo, R., Ling, Y., Wu, X., Li, B., Roller, P. P., Wang, S., & Yang, D. (2003). Molecular mechanism of gossypol-induced cell growth inhibition and cell death of HT-29 human colon carcinoma cells. *Biochemical Pharmacology*, 66(1), 93–103.

- Zhao, S., Kuge, Y., Tsukamoto, E., Mochizuki, T., Kato, T., Hikosaka, K., Nakada, K., Hosokawa, M., Kohanawa, M., & Tamaki, N. (2002). Fluorodeoxyglucose uptake and glucose transporter expression in experimental inflammatory lesions and malignant tumours: effects of insulin and glucose loading. *Nuclear Medicine Communications*, 23(6), 545–50.
- Zhen-jiang, Z., Jing-han, C., Long, M., Jia-jun, D., Lin, Z., Ying, L., & Hong-hai, D. (2007). 18F-FDG uptake as a biological factor predicting outcome in patients with resected non-small-cell lung cancer. *Chinese Medical Journal*, 120(2), 125–131.
- Zhu, G.-N., Zuo, L., Zhou, Q., Zhang, S. M., Zhu, H. Q., Gui, S. Y., & Wang, Y. (2004). Loss of heterozygosity on chromosome 10q22-10q23 and 22q11.2-22q12.1 and p53 gene in primary hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, 10(13), 1975–8.
- Zimmerman, R. L., Fogt, F., Burke, M., & Murakata, L. A. (2002). Assessment of Glut-1 expression in cholangiocarcinoma, benign biliary lesions and hepatocellular carcinoma. *Oncology Reports*, 9(4), 689–92.

Parte IV

Anexos

Símbolos, Abreviaturas, Expressões e
Fórmulas Químicas

A	Ausente
ABPF	Agarose de baixo ponto de fusão
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFB1	Aflatoxina B1
AFP	α -fetoproteína
AI	Apoptose inicial
ALDH- 3	<i>Aldehyde dehydrogenase-3</i>
A_{máx}	% de captação máxima
A_{min}	% de retenção mínima
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
APFN	Agarose de ponto de fusão normal
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	ARN mensageiro
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AT/N	Apoptose tardia/necrose
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>
AV	Anexina-V
BAD	<i>Bcl-2-associated death promoter</i>
BAX	<i>Bcl-2 associated X protein</i>
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>
BRCA2	<i>Breast cancer type 2 susceptibility protein</i>
BCLC	<i>Barcelona-Clinic Liver Cancer</i>
BCL-XL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BCL-XS	<i>B-cell lymphoma-extra short</i>
BCL-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BRE	<i>Brain and reproductive organ-expressed protein</i>
BSO	L-butionina-sulfoximina
CAPS	<i>N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid</i>
CA 19-9	<i>Cancer antigen 19-9</i>
CC	Comprimento da cauda
CEA	<i>Carcinoembryonic antigen</i>
Cee	Estado estacionário
CEP	Colangite esclerosante primária
cFLIP	<i>FLICE-like inhibitory protein</i>
CK19	<i>Cytokeratin 19</i>

c-MET	<i>MNNG HOS transforming gene</i>
c-MYC	<i>Myelocytomatosis c</i>
COX-2	<i>Cyclooxygenase 2</i>
CPM	Contagens por minuto
CT	<i>Computed tomography</i>
cyclin D1	<i>G1/S specific cyclin D1</i>
D	Difusa
DCF	2',7'-diclorofluoresceína
DCFH	Diclorodihidrofluoresceína
DCFH2-DA	2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato
DCL-1	<i>Deleted in liver cancer</i>
DHE	Dihidroetidina
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DSMZ	<i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGTA	<i>Ethylene glycol tetraacetic acid</i>
eIF4E	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
F	Focal
FAS	<i>First apoptosis signal</i>
FASL	Fas ligando
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FL	Canal de emissão de fluorescência
FSC	<i>Forward scatter</i>
GLUTs	<i>Glucose transporters</i>
GLUT-1	<i>Glucose transporter-1</i>
Gossipol	1,1',6,6',7,7'-hexahydroxy-5,5'-di-isopropil-3,3'-dimetil-2,2'-binaftaleno 8,8'dicarboxaldeído
GSH	Glutationa
G-6-P	Glicose-6-fosfato
H & E	Hematoxilina e eosina

HG	<i>High glucose</i>
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
IC	Índice de combinação
IC₅₀	Concentração inibitória média
IGF	<i>Insulin like growth factor</i>
IL-6	Interleucina-6
IP	Iodeto de propídeo
JCRB	<i>Japanese Collection of Research Bioresources</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinases</i>
K_m	Constante de Michaelis
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LDH	<i>Lactate dehydrogenase</i>
LG	<i>Low glucose</i>
LRP	<i>Lung resistance-related protein</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MC	Momento da cauda
MCL-1	<i>Induced myeloid leukemia cell differentiation</i>
MDM2	<i>Murine double minute 2</i>
MDR	<i>Multidrug resistance</i>
MEK	<i>MAPK/extracellular signal-related kinase kinase</i>
MELD	<i>Model for End-Stage Liver Disease</i>
MIF	Média de intensidade de fluorescência
MRCP	<i>Magnetic resonance cholangiopancreatography</i>
MRP1	<i>Multidrug resistance-related protein 1</i>
MRP2	<i>Multidrug resistance-associated protein 2</i>
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
N	Necrose
NADH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>
OH•	Radical hidroxilo
ONOO•	Peróxido de nitrito
p-AKT	Proteína cinase B fosforilada
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
PDGFR-β	<i>Platelet-derived growth factor β</i>
PE	<i>Phycoerythrin</i>
PET	<i>Positron emission tomography</i>

PGP	<i>P-glycoprotein</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PKC	<i>Protein kinase C</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tension homolog</i>
PTPα	<i>Protein tyrosine phosphatase-α</i>
PVDF	Polyvinylidene fluoride
P21	Proteína 21
P16	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor</i>
P38	Proteína 38
P44/42	Proteína 44/42 ou ERK1/2
P53	Proteína 53
P73	Proteína 73
Q3'GA	Quercetina 3'-O β -D-glucuronido
Q4'GA	Quercetina 4'-O β -D-glucuronido
Quercetina	[2-phenyl4H-1-benzopyran4-one, 2-phenylchromone]
RAF	<i>Rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
RB	<i>Retinoblastoma protein</i>
RTK	<i>Receptor tyrosine kinase</i>
RIPA	<i>Radio-Immunoprecipitation Assay Buffer</i>
RM	Ressonância Magnética
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RPMI-1640	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium 1640</i>
S	<i>Strong</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulphate</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulphate – poly-acrilamide gel electrophoresis</i>
shRNA	<i>Small hairpin RNA</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SLC	<i>Solute carriers</i>
Smad2	<i>Mothers against decapentaplegic</i>
SOCS-1	<i>Supressor of cytokine signaling 1</i>
Solução A	Solução fixante
Solução B	Solução permeabilizante
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
TACE	<i>Transcatheter arterial chemoembolization</i>
TBST-BSA	<i>Tris-buffered saline tween-20 – bovine serum albumin</i>

TGF-β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TIGAR	<i>TP53 – induced glycolysis and apoptosis regulator</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TP53	<i>Tumor protein 53 gene</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
T_{1/2}	Tempo necessário para que a retenção seja igual a $(100 - A_{\min})/2$
T₅₀	Tempo (minutos) necessário para que a captação seja igual a $A_{\max}/2$
V	Viáveis
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	<i>Vascular endothelial growth factor receptor</i>
VHB	Vírus da Hepatite B
VHC	Vírus da Hepatite C
VIH	Vírus da imunodeficiência humana
W	<i>Weak</i>
wtP53	<i>P53 wild-type</i>
XIAP	<i>X-linked inhibitor-of-apoptosis protein</i>
2-DG	2-Desoxiglucose
¹⁸F-FDG	¹⁸ F-Fluordesoxiglicose
β-catenina	<i>Catenin cadherin-associated</i>
% de ADN	Porcentagem de ADN

Publicações Relacionadas com a Tese

Artigos em revistas com arbitragem científica

1 - Brito, AF; Abrantes, AM; Pinto Costa C; Gomes, R; Mamede, C; Casalta Lopes, J; Gonçalves, AC; Sarmiento-Ribeiro, AB; Tralhão, JG; Botelho, MF. Hepatocellular Carcinoma and Chemotherapy: The Role of p53. *Chemotherapy*, 2012, v. 2012, n. 58, p. 381-386, 2012

2 - Brito AF; Ribeiro M; Gonçalves AC; Sarmiento-Ribeiro AB; Tralhão JG; Botelho MF. Acção anticancerígena da Quercetina no Carcinoma Hepatocelular: o papel do GLUT-1. *Revista da Sociedade Portuguesa de Cirurgia*, 2013, n. 25, p. 23-30, 2013.

3 - Brito, AF.; Mendes, M; Abrantes, AM.; Tralhão, JG.; Botelho, MF. Positron Emission Tomography Diagnostic Imaging in Multidrug-Resistant Hepatocellular Carcinoma: Focus on 2-Deoxy-2-(18F)Fluoro-d-Glucose. *Molecular Diagnosis & Therapy*, 2014. DOI 10.1007/s40291-014-0106-3. (*ambos os autores contribuíram de igual forma para este trabalho).

Abstracts em revistas indexadas com arbitragem científica

1 - Brito AF; Abrantes AM; Costa CP; Mamede AC; Matos CC; Rodrigues MC; Gonçalves AC; Rodrigues A; Sarmiento-Ribeiro AB; Castro-Sousa F; Botelho MF; Tralhão JG. GLUT1 expression in hepatocellular carcinoma: correlation with ¹⁸F-FDG uptake. In: THE INTERNATIONAL LIVER CONGRESS, 2011. Berlim. *Journal of Hepatology*. 2011, v. 54, p. 84.

2 - Brito AF; Abrantes AM; Costa CP; Matos CC; Mamede AC; Gonçalves AC; Rodrigues MC; Rodrigues A; Sarmiento-Ribeiro AB; Tralhão JG; Botelho MF. ¹⁸F-FDG uptake in hepatocellular carcinoma: correlation with GLUT1 and p53 expression. In: EANM'11 - ANNUAL CONGRESS OF THE EUROPEAN ASSOCIATION OF NUCLEAR MEDICINE, 2011. Birmingham. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2011.

3 - Brito AF; Abrantes AM; Costa CP; Gonçalves AC; Sarmiento-Ribeiro AB; Castro-Sousa F; Tralhão JG; Rodrigues A; Botelho MF. GOSSYPOL: A NEW TOOL FOR THE

TREATMENT OF HEPATOCELLULAR CARCINOMA?. In: 13TH WORLD CONGRESS ON GASTROINTESTINAL CANCER, 2011. Barcelona. *Annals of Oncology*. 2011.

4 - Costa CP; Brito AF; Abrantes AM; Mamede AC; Gomes AR; Castro-Sousa F; Tralhão JG; Botelho MF. p53 expression in liver tumors and differential response to chemotherapy. In: 13TH WORLD CONGRESS ON GASTROINTESTINAL CANCER, 2011. Barcelona. *Annals of Oncology*. 2011, v. 22, p. 27-133.

5 - Mendes M; Brito AF; Abrantes AM; Veríssimo F; Gonçalves AC; Sarmiento-Ribeiro AB; Castro-Sousa F; Tralhão JG; Botelho MF. Multidrug resistance in hepatocellular carcinoma: studies with ¹⁸F-FDG and ^{99m}Tc-MIBI. In: WORLD MOLECULAR IMAGING CONGRESS 2012, 2012. Dublin. *Molecular Imaging and Biology*. 2012.

6 - Brito AF; Abrantes AM; Mendes M; Veríssimo F; Castro-Sousa F; Tralhão JG; Botelho MF. Cholangiocarcinoma diagnosis: the role of ¹⁸F-FDG and ¹⁸F-choline. In: WORLD MOLECULAR IMAGING CONGRESS 2012, 2012. Dublin. *Molecular Imaging and Biology*. 2012.

7 - Brito AF; Veríssimo F; Ribeiro M; Abrantes AM; Castro-Sousa F; Tralhão JG; Botelho MF. The role of gossypol, quercetin and cytochalasin-B in hepatocellular carcinoma therapy. In: WORLD MOLECULAR IMAGING CONGRESS 2012, 2012. Dublin. *Molecular Imaging and Biology*. 2012

8 - Brito AF; Veríssimo F; Ribeiro M; Abrantes AM; Tralhão JG; Botelho MF. GOSSYPOL, QUERCETIN AND CYTOCHALASIN-B: NEW OPTIONS IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA THERAPY?. In: ATUALIZAÇÕES EM ONCOLOGIA 2012 – 1º CONGRESSO CIMAGO , 2012. Coimbra. *Acta Médica Portuguesa*. 2012.

9 - Brito AF; Veríssimo F; Ribeiro M; Abrantes AM; Castro-Sousa F; Tralhão JG; Botelho MF. New options in hepatocellular carcinoma therapy: the role of gossypol, quercetin and cytochalasin-B. Studies with ¹⁸F-FDG. In: EANM'12, 2012. Milão. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2012.

10 - Brito AF; Abrantes AM; Mendes M; Veríssimo F; Castro-Sousa F; Tralhão JG; Botelho MF. ¹⁸F-FDG and ¹⁸F-choline: what is the best for cholangiocarcinoma diagnosis. In: EANM'12, 2012. Milão. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2012.

11 - Mendes M; Brito AF; Abrantes AM; Veríssimo F; Gonçalves AC; Sarmiento-Ribeiro AB; Castro-Sousa F; Tralhão JG; Botelho MF. ^{18}F -FDG versus $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI in study of multidrug resistance in hepatocellular carcinoma. In: EANM'12, 2012. Milão. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2012.

12 - Veríssimo F; Ribeiro M; Brito AF; Abrantes AM; Tralhão JG; Botelho MF. New options in Hepatocellular Carcinoma therapy: the role of Quercetin and cytochalasin-B. In: 14TH WORLD CONGRESS ON GASTROINTESTINAL CANCER, 2012. Barcelona. *Annals of Oncology* . 2012.

13 - Brito AF; Abrantes AM; Tralhão JG; Botelho MF. ^{18}F -FDG and Gossypol: studies in Hepatocellular Carcinoma. In: 14TH WORLD CONGRESS ON GASTROINTESTINAL CANCER, 2012. Barcelona. *Annals of Oncology*. 2012.

14 - Mendes M; Brito AF; Abrantes AM; Veríssimo F; Gonçalves AC; Sarmiento-Ribeiro AB; Tralhão JG; Botelho MF. ^{18}F -FDG Uptake Hepatocellular Carcinoma cell lines: correlation with Multidrug Resistance proteins expression. In: 14TH WORLD CONGRESS ON GASTROINTESTINAL CANCER, 2012. Barcelona. *Annals of Oncology*. 2012.

15 - Veríssimo F; Ribeiro M; Brito AF; Abrantes AM; Tralhão JG; Botelho MF. Quercetin and Cytochalasin- B – New Options in Hepatocellular Carcinoma Therapy?. In: 22ND BIENNIAL CONGRESS OF THE EUROPEAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, 2012. Barcelona. *European Journal of Cancer*. 2012, v. 48.

16 - Brito AF; Abrantes AM; Tralhão JG; Botelho MF. The Effect of Gossypol in Hepatocellular Carcinoma – Studies with ^{18}F -FDG. In: 22ND BIENNIAL CONGRESS OF THE EUROPEAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, 2012. Barcelona. *European Journal of Cancer*. 2012, v. 48.

17 - Mendes M; Brito AF; Abrantes AM; Veríssimo F; Gonçalves AC; Sarmiento-Ribeiro AB; Tralhão JG; Botelho MF. Multidrug Resistance in Hepatocellular Carcinoma – Correlation With ^{18}F -FDG Uptake (Preliminary Results). In: 22ND BIENNIAL CONGRESS OF THE EUROPEAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, 2012. Barcelona. *European Journal of Cancer*. 2012, v. 48.

18 - Brito AF; Abrantes AM; Mamede AC; Pires AS; Tralhão JG; Botelho MF. The role of gossypol in the treatment of hepatocellular carcinoma: studies with 18F-FDG. In: TAT 2012 – INTERNATIONAL CONGRESS ON TARGETED ANTICANCER THERAPIES, 2012. Amsterdão. *Annals of Oncology*. 2012, v. 23, p. 29.

19 - Mendes M; Brito AF; Abrantes AM; Veríssimo F; Gradiz R; Gonçalves AC; Sarmiento-Ribeiro AB; Castro-Sousa F; Tralhão JG; Botelho MF. The Role of 18F-FDG and 99mTc-MIBI in Multidrug Resistance Studies in Hepatocellular Carcinoma. In: UEG WEEK 2012, 2012. Amsterdão. *GUT*. 2012.

20 - Brito AF; Ribeiro M; Abrantes AM; Castro-Sousa F; Tralhão JG; Botelho MF. New perspectives on primary liver tumors diagnosis: the role of ¹⁸F-FDG and ¹⁸F-Fluorocholine. In: ACTUALIZAÇÕES EM ONCOLOGIA - 2º CONGRESSO CIMAGO, 2013. Coimbra. *Revista Portuguesa de Pneumologia*. 2013.

21 - Brito AF; Ribeiro M; Abrantes AM; Gonçalves AC; Sarmiento-Ribeiro AB; Castro-Sousa F; Tralhão JG; Botelho MF. QUERCETIN: AN OPTION IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA THERAPY?. In: ACTUALIZAÇÕES EM ONCOLOGIA - 2º CONGRESSO CIMAGO, 2013. Coimbra. *Revista Portuguesa de Pneumologia*. 2013.

22 - Brito AF; Mendes M; Ribeiro M; Abrantes AM; Gonçalves AC; Sarmiento-Ribeiro AB; Castro-Sousa F; Tralhão JG; Botelho MF. THE ROLE OF NUCLEAR MEDICINE IN THE STUDY OF MULTIDRUG RESISTANCE IN HEPATOCELULAR CARCINOMA. In: ACTUALIZAÇÕES EM ONCOLOGIA - 2º CONGRESSO CIMAGO, 2013. Coimbra. *Revista Portuguesa de Pneumologia*. 2013.

23 - Brito AF; Abrantes AM; Ribeiro M; Gonçalves AC; Sarmiento-Ribeiro AB; Castro-Sousa F; Tralhão JG; Botelho MF. NEW PERSPECTIVES ON HEPATOCELLULAR CARCINOMA TREATMENT: THE ROLE OF GOSSYPOL. In: ACTUALIZAÇÕES EM ONCOLOGIA - 2º CONGRESSO CIMAGO, 2013. Coimbra. *Revista Portuguesa de Pneumologia*. 2013.

24 - Ribeiro M; Brito AF; Abrantes AM; Casalta-Lopes JE; Gonçalves AC; Sarmiento-Ribeiro AB; Tralhão JG; Botelho MF. New options in primary liver tumors: the role of quercetin. In: THE EUROPEAN CANCER CONGRESS 2013, 2013. Amsterdam. *European Journal of Cancer Supplements*. 2013.

25 - Brito AF; Ribeiro M; Abrantes AM; Casalta-Lopes JE; Tralhão JG; Botelho MF. Cholangiocarcinoma diagnosis and therapy: in vitro studies contribution'. In: THE EUROPEAN CANCER CONGRESS, 2013. Amsterdam. *European Journal of Cancer Supplements*. 2013.

26 - Brito AF; Ribeiro M; Nunes MJ; Abrantes AM; Casalta-Lopes JE; Tralhão JG; Botelho MF. Hepatocellular carcinoma and chemotherapy: the role of GLUT-1 antagonists. In: THE EUROPEAN CANCER CONGRESS, 2013. Amesterdam. In *European Journal of Cancer Supplements*. 2013.

27 - Brito AF; Abrantes AM; Ribeiro M; Casalta-Lopes JE; Gonçalves AC; Sarmiento-Ribeiro AB; Tralhão JG; Botelho MF. Gossypol: an option in Cholangiocarcinoma therapy?. In: THE EUROPEAN CANCER CONGRESS, 2013. Amsterdam. *Europena Journal of Cancer Supplements*. 2014.

28 - Brito AF; Mendes M; Ribeiro M; Abrantes AM; Casalta-Lopes JE; Gonçalves AC; Sarmiento-Ribeiro AB; Tralhão JG; Botelho MF. Nuclear Medicine in the study of multidrug resistance in Hepatocellular Carcinoma: studies with ^{18}F -FDG and $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI. In: THE EUROPEAN CANCER CONGRESS, 2013. Amsterdam. In *European Journal of Cancer Supplement*. 2013.

29 - Ribeiro M; Brito AF; Abrantes AM; Gonçalves AC; Sarmiento-Ribeiro AB; Castro-Sousa F; Tralhão JG; Botelho MF. Quercetin: an option in primary liver tumors therapy?. In: EANM'13, 2013. Lyon. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2013.

30 - Brito AF; Mendes M; Ribeiro M; Abrantes AM; Gonçalves AC; Sarmiento-Ribeiro AB; Castro-Sousa F; Tralhão JG; Botelho MF. ^{18}F -FDG an alternative to $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI in the study of multidrug resistance in hepatocellular carcinoma?. In: EANM'13, 2013. Lyon. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2013.

31 - Brito AF; Abrantes AM; Laranjo M; Gonçalves AC; Sarmiento-Ribeiro AB; Castro-Sousa F; Tralhão JG; Botelho MF. GLUT1 INHIBITION AS A THERAPEUTIC APPROACH IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA. In: ATUALIZAÇÕES EM ONCOLOGIA 2014; 28ª REUNIÃO - 3º CONGRESSO DO CIMAGO, 2014. Coimbra. *Revista Portuguesa de Pneumologia*. 2014, v. 20, p. P35-P35.

32 - Brito AF; Abrantes AM; Laranjo M; Gonçalves AC; Sarmiento-Ribeiro AB; Castro-Sousa F; Tralhão JG; Botelho MF. GLUT-1 inhibition: a new therapeutic approach against hepatocellular carcinoma?. In: EACR'23; 23RD BIENNIAL CONGRESS OF THE EUROPEAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, 2014. Munich. *European Journal of Cancer supplements*. 2014.

33 - Brito AF; Abrantes AM; Gonçalves AC; Sarmiento-Ribeiro AB; Tralhão JG; Botelho MF. Sorafenib and ¹⁸F-Fluorocholine: new options in cholangiocarcinoma therapy and diagnosis?. In: EACR'23; 23RD BIENNIAL CONGRESS OF THE EUROPEAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, 2014. Munich. *European Journal of Cancer supplements*. 2014.

Comunicações orais

1 - Brito AF; Abrantes AM; Costa CP; Matos CC; Mamede AC; Tralhão JG; Botelho MF. Papel tumorigénico do transportador de Glicose 1 no Carcinoma Hepatocelular. IV Jornadas sobre tecnologia e saúde, 2011.

2 - Tralhão JG; Brito AF; Abrantes AM; Costa CP; Mamede AC; Gonçalves AC; Matos CC; Rodrigues MC; Sarmiento-Ribeiro AB; Rodrigues A; Botelho MF; Castro-Sousa F. ¹⁸F-FDG, GLUTs e Carcinoma Hepatocelular: da biologia molecular à prática clínica. XXXI Congresso Nacional de Cirurgia. 2011.

3 - Tralhão JG; Costa CP; Brito AF; Abrantes AM; Gomes AR; Mamede AC; Botelho MF; Castro-Sousa F. Associação da expressão de p53 em tumores do fígado e resposta diferencial à quimioterapia. XXXI Congresso Nacional de Cirurgia. 2011.

4 - Brito AF; Abrantes AM; Martins R; Costa CP; Mamede AC; Rodrigues MC; Rodrigues A; Gonçalves AC; Sarmiento-Ribeiro AB; Botelho MF; Castro-Sousa F; Tralhão JG. Perfil de captação de ¹⁸F-FDG em Carcinoma Hepatocelular: correlação com a expressão de GLUT's. 14ª Reunião anual da Associação Portuguesa para o estudo do Fígado. 2011.

5 - Brito AF; Abrantes AM; Matos CC; Gonçalves AC; Sarmiento-Ribeiro AB; Tralhão JG; Botelho MF. CAPTAÇÃO DE ¹⁸F-FDG EM LINHAS CELULARES DE CARCINOMA HEPATOCELULAR: CORRELAÇÃO COM A EXPRESSÃO DE GLUT-1 E GLUT-3. XIII Congresso Nacional de Medicina Nuclear. 2011.

6 - Veríssimo F; Brito AF; Abrantes AM; Tralhão JG; Botelho MF. GLUT-1 COMO ALVO TERAPÊUTICO NO CARCINOMA HEPATOCELULAR: PAPEL DA CITOCALASINA-B. XIII Congresso Nacional de Medicina Nuclear. 2011.

7 - Ribeiro M; Brito AF; Abrantes AM; Gonçalves AC; Sarmiento-Ribeiro AB; Tralhão JG; Botelho MF. ACCÃO DA QUERCETINA NO CARCINOMA HEPATOCELULAR – ESTUDOS COM ¹⁸F-FDG. XIII Congresso Nacional de Medicina Nuclear. 2011.

8 - Tralhão JG; Brito AF; Abrantes AM; Botelho MF; Castro-Sousa F. NOVAS ABORDAGENS NO TRATAMENTO DO CARCINOMA HEPATOCELULAR: QUAL O INTERESSE DO GOSSIPOL?. XXXII Congresso Nacional de Cirurgia. 2012.

9 - Tralhão JG; Ribeiro M; Brito AF; Abrantes AM; Gonçalves AC; Sarmiento-Ribeiro AB; Botelho MF; Castro-Sousa F. Acção anti-cancerígena da Quercetina em Carcinoma Hepatocelular. XXXII Congresso Nacional de Cirurgia. 2012.

10 - Brito AF; Abrantes AM; Gonçalves AC; Sarmiento-Ribeiro AB; Botelho MF; Tralhão JG. O papel do Gossipol no tratamento do Carcinoma Hepatocelular: estudos in vitro. 15ª Reunião anual da Associação Portuguesa para o estudo do Fígado. 2012.

11 - Brito AF; Veríssimo F; Abrantes AM; Gonçalves AC; Sarmiento-Ribeiro AB; Botelho MF; Tralhão JG; Castro-Sousa F. Carcinoma Hepatocelular, GLUT1 e Citocalasina-B: um curioso triângulo. XXXIII Congresso Nacional de Cirurgia. 2013.

12 - Brito AF; Abrantes AM; Ribeiro M; Gonçalves AC; Sarmiento-Ribeiro AB; Botelho MF; Tralhão JG; Castro-Sousa F. Gossipol: uma opção terapêutica para o Carcinoma Hepatocelular?. XXXIII Congresso Nacional de Cirurgia. 2013.

13 - Brito AF; Ribeiro M; Abrantes AM; Botelho MF; Tralhão JG; Castro-Sousa F. Diagnóstico dos tumores primários do fígado: o papel do ¹⁸F-FDG e da ¹⁸F-Fluorocolina. XXXIII Congresso Nacional de Cirurgia. 2013.

14 - Brito AF; Mendes M; Ribeiro M; Abrantes AM; Gonçalves AC; Sarmiento-Ribeiro AB; Botelho MF; Tralhão JG; Castro-Sousa F. Resistência multifármacos no Carcinoma Hepatocelular: o papel da Medicina Nuclear. XXXIII Congresso Nacional de Cirurgia. 2013.

15 - Brito AF; Ribeiro M; Abrantes AM; Botelho MF; Tralhão JG; Castro-Sousa F. Quimioterapia no Colangiocarcinoma: será o sorafenib uma alternativa?. XXXIII CONGRESSO NACIONAL DE CIRURGIA. 2013.

16 - Ribeiro M; Brito AF; Abrantes AM; Gonçalves AC; Sarmiento-Ribeiro AB; Botelho MF; Tralhão JG; Castro-Sousa F. QUERCETINA: UMA OPÇÃO NO TRATAMENTO DE CARCINOMA HEPATOCELULAR?. 16ª Reunião Anual da Associação Portuguesa Para o Estudo do Fígado. 2013.

17 - Brito AF; Ribeiro M; Abrantes AM; Botelho MF; Tralhão JG; Castro-Sousa F. Diagnóstico e terapêutica em Colangiocarcinoma: contribuição de estudos in vitro. 16ª Reunião Anual da Associação Portuguesa Para o Estudo do Fígado. 2013.

18 - Brito AF; Mendes M; Ribeiro M; Abrantes AM; Gonçalves AC; Sarmiento-Ribeiro AB; Botelho MF; Tralhão JG; Castro-Sousa F. O papel da Medicina Nuclear no estudo da resistência multifármacos em Carcinoma Hepatocelular. 16ª Reunião Anual da Associação Portuguesa Para o Estudo do Fígado. 2013.

19 - Brito AF; Mendes M; Ribeiro M; Abrantes AM; Gonçalves AC; Sarmiento-Ribeiro AB; Castro-Sousa F; Tralhão JG; Botelho MF. THE ROLE OF NUCLEAR MEDICINE IN THE STUDY OF MULTIDRUG RESISTANCE IN HEPATOCELULAR CARCINOMA. Atualizações em Oncologia 2013 27ª Reunião - 2º Congresso do CIMAGO. 2013.

20 - Brito AF; Abrantes AM; Ribeiro M; Gonçalves AC; Sarmiento-Ribeiro AB; Tralhão JG; Botelho MF; Castro-Sousa F. Gossipol: uma opção no tratamento de Colangiocarcinoma?. XXXIV Congresso Nacional de Cirurgia. 2014.

Comunicações sob a forma de poster

1 - Brito AF; Abrantes AM; Costa CP; Matos CC; Rodrigues MC; Gonçalves AC; Tralhão JG; Botelho MF. ¹⁸F-FDG UPTAKE IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA CELL LINES; IMPACT ON THE DIAGNOSIS AND PROGNOSIS IN THIS MALIGNANCE. In: II ANNUAL MEETING OF IBILI, 2010.

2 - Tralhão JG; Brito AF; Abrantes AM; Costa CP; Mamede AC; Gonçalves AC; Matos CC; Rodrigues MC; Sarmiento-Ribeiro AB; Rodrigues A; Botelho MF; Castro-Sousa F.

¹⁸F-FDG, GLUTs e Carcinoma Hepatocelular: da biologia molecular à prática clínica. In: XXXI CONGRESSO NACIONAL DE CIRURGIA, 2011.

3 - Costa CP; Brito AF; Martins R; Abrantes AM; Gomes AR; Mamede AC; Botelho MF; Castro-Sousa F; Tralhão JG. Carcinoma Hepatocelular e p53: resposta diferencial à quimioterapia. In: 14ª REUNIÃO DA ASSOCIAÇÃO PORTUGUESA PARA O ESTUDO DO FÍGADO, 2011.

4 - Brito AF; Abrantes AM; Costa CP; Castro-Sousa F; Tralhão JG; Botelho MF. New types of treatment in hepatocellular carcinoma: role of gossypol. In: XX PORTO CANCER MEETING, 2011. Porto. Livro de resumos do XX Porto Cancer Meeting. 2011.

5 - Costa CP; Brito AF; Abrantes AM; Mamede AC; Gomes AR; Tralhão JG; Botelho MF. p53 expression and Bax/Bcl-2 activation in liver tumors cell line in response to chemotherapy. In: XX PORTO CANCER MEETING, 2011.

6 - Brito AF; Abrantes AM; Costa CP; Mamede AC; Matos CC; Rodrigues MC; Rodrigues A; Gonçalves AC; Tralhão JG; Botelho MF. GLUT1 expression in Hepatocellular Carcinoma: correlation with ¹⁸F-FDG uptake. In: 1ST PF2MUC, 2011.

7 - Brito AF; Abrantes AM; Tralhão JG; Botelho MF. GOSSYPOL, ¹⁸F-FDG AND HEPATOCELLULAR CARCINOMA, A CURIOUS CONNECTION. In: 3RD ANNUAL MEETING OF IBILI, 2011. Coimbra. Livro de resumos do 3rd Annual Meeting of IBILI. 2011.

8 - Brito AF; Ribeiro M; Abrantes AM; Gonçalves AC; Sarmiento-Ribeiro AB; Botelho MF; Tralhão JG. O papel da quercetina no tratamento do carcinoma hepatocelular: Estudos com ¹⁸F-FDG. In: 15ª REUNIÃO ANUAL DA ASSOCIAÇÃO PORTUGUESA PARA O ESTUDO DO FÍGADO, 2012.

9 - Brito AF; Veríssimo F; Abrantes AM; Mendes M; Botelho MF; Tralhão JG. Glut-1 e Citocalasina-B: aliados na terapêutica do Carcinoma Hepatocelular. In: 15ª REUNIÃO ANUAL DA ASSOCIAÇÃO PORTUGUESA PARA O ESTUDO DO FÍGADO, 2012.

10 - Brito AF; Mendes M; Abrantes AM; Veríssimo F; Gonçalves AC; Sarmiento-Ribeiro AB; Botelho MF; Tralhão JG. Resistência Multifármacos em Carcinoma

Hepatocelular: Correlação com a captação de ^{18}F -FDG. In: 15^a REUNIÃO ANUAL DA ASSOCIAÇÃO PORTUGUESA PARA O ESTUDO DO FÍGADO, 2012.

11 - Brito AF; Abrantes AM; Mendes M; Veríssimo F; Castro-Sousa F; Tralhão JG; Botelho MF. What is the best for cholangiocarcinoma diagnosis: ^{18}F -FDG or ^{18}F choline. In: 17TH COIMBRA NUCLEAR MEDICINE MEETING, 2012.

12 - Veríssimo F; Ribeiro M; Brito AF; Abrantes AM; Ferreira, S.; Tralhão JG; Botelho MF. Quercetin and cytochalasin-B: New options in Hepatocellular Carcinoma therapy?. In: XX PORTO CANCER MEETING, 2012.

13 - Ribeiro M; Brito AF; Abrantes AM; Castro-Sousa F; Tralhão JG; Botelho MF. ^{18}F -FDG or ^{18}F -choline for diagnosis of primary liver tumors. In: IV ANNUAL MEETING OF IBILI, 2012.

14 - Brito AF; Mendes M; Abrantes AM; Ribeiro M; Gonçalves AC; Sarmiento-Ribeiro AB; Castro-Sousa F; Tralhão JG; Botelho MF. Multidrug Resistance in Hepatocellular Carcinoma: in vitro studies with ^{18}F -FDG and $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI. In: IV ANNUAL MEETING OF IBILI, 2012.

15 - Brito AF; Veríssimo F; Ribeiro M; Abrantes AM; Tralhão JG; Botelho MF. Gossypol, quercetin and cytochalasin-B: new options in Hepatocellular Carcinoma therapy. In: 2ND PF2MUC SYMPOSIUM, 2012.

16 - Brito AF; Mendes M; Abrantes AM; Ribeiro M; Veríssimo F; Gonçalves AC; Sarmiento-Ribeiro AB; Castro-Sousa F; Tralhão JG; Botelho MF. Multidrug Resistance in Hepatocellular Carcinoma: in vitro studies with ^{18}F -FDG and $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI. In: ONE DAY SYMPOSIUM SPONSORED BY EACR, 2012.

17 - Tralhão JG; Brito AF; Abrantes AM; Martins R; Botelho MF; Castro-Sousa F. ^{18}F -FDG uptake in hepatocellular carcinoma: correlation with GLUT1 and p53 expression. In: AMERICAN COLLEGE OF SURGEONS ANNUAL CLINICAL CONGRESS, 2012. Chicago.

18 - Brito AF; Tralhão JG; Fernandes AI; Abrantes AM; Ribeiro M; Martins R; Sofia C; Castro-Sousa F; Botelho MF. O papel do ^{18}F -FDG e da ^{18}F -Fluorocolina no diagnóstico de tumores primários do fígado. In: SEMANA DIGESTIVA 2013, 2013.

19 - Brito AF; Mendes M; Ribeiro M; Abrantes AM; Gonçalves AC; Sarmiento-Ribeiro AB; Botelho MF; Tralhão JG; Castro-Sousa F. Study of Multidrug Resistance in Hepatocellular Carcinoma: the role of Nuclear Medicine. In: AMERICAN COLLEGE OF SURGEONS ANNUAL CLINICAL CONGRESS, 2013.

20 - Ribeiro M; Brito AF; Abrantes AM; Gonçalves AC; Sarmiento-Ribeiro AB; Botelho MF; Tralhão JG; Castro-Sousa F. Hepatocellular carcinoma and quercetin: a curious relationship. In: AMERICAN COLLEGE OF SURGEONS ANNUAL CLINICAL CONGRESS, 2013.

21 - Brito AF; Mendes M; Ribeiro M; Abrantes AM; Gonçalves AC; Sarmiento-Ribeiro AB; Tralhão JG; Botelho MF. 18F-FDG an alternative to 99mTc-MIBI in the study of Multidrug Resistance in Hepatocellular Carcinoma.. In: 4TH PF2MUC SYMPOSIUM, 2013.

22 - Brito AF; Ribeiro M; Abrantes AM; Castro-Sousa F; Tralhão JG; Botelho MF. Diagnosis of primary liver tumors: the role of ¹⁸F-FDG and ¹⁸F-Fluorocholine.. In: EASL SPECIAL CONFERENCE: HCC SUMMIT, 2014. Geneva.

23 - Brito AF; Abrantes AM; Ribeiro M; Gonçalves AC; Sarmiento-Ribeiro AB; Castro-Sousa F; Tralhão JG; Botelho MF. Gossypol: an option in Hepatocellular Carcinoma therapy?. In: EASL SPECIAL CONFERENCE: HCC SUMMIT, 2014. Geneva.

24 - Brito AF; Mendes M; Ribeiro M; Abrantes AM; Gonçalves AC; Sarmiento-Ribeiro AB; Castro-Sousa F; Tralhão JG; Botelho MF. Study of multidrug resistance in Hepatocellular Carcinoma: the role of Nuclear Medicine.. In: EASL SPECIAL CONFERENCE: HCC SUMMIT, 2014. Geneva.

25 - Brito AF; Ribeiro M; Abrantes AM; Gonçalves AC; Sarmiento-Ribeiro AB; Castro-Sousa F; Tralhão JG; Botelho MF. Hepatocellular Carcinoma and Quercetin: a curious relationship.. In: EASL SPECIAL CONFERENCE: HCC SUMMIT, 2014. Geneva.

26 - Brito AF; Abrantes AM; Laranjo M; Gonçalves AC; Sarmiento-Ribeiro AB; Castro-Sousa F; Tralhão JG; Botelho MF. Inibição do GLUT-1: uma opção terapêutica em Carcinoma Hepatocelular?. In: SEMANA DIGESTIVA 2014, 2014.

27 - Brito AF; Abrantes AM; Gonçalves AC; Sarmiento-Ribeiro AB; Tralhão JG; Botelho MF. Estratégias anti-BCL-2 no combate ao Colangiocarcinoma: será o gossipol uma opção?. In: SEMANA DIGESTIVA 2014, 2014.

28 - Brito AF; Abrantes AM; Laranjo M; Gonçalves AC; Sarmiento-Ribeiro AB; Castro-Sousa F; Tralhão JG; Botelho MF. NEW THERAPEUTIC OPTIONS FOR HEPATOCELLULAR CARCINOMA. WHAT IS THE ROLE OF GLUT-1?. In: AMERICAN COLLEGE OF SURGEONS ANNUAL CLINICAL CONGRESS, 2014.

Hepatocellular Carcinoma and Chemotherapy: The Role of p53

A.F. Brito^{a, b} A.M. Abrantes^{a, b} C. Pinto-Costa^a A.R. Gomes^a A.C. Mamede^{a, b, e}
J. Casalta-Lopes^a A.C. Gonçalves^{b, c} A.B. Sarmiento-Ribeiro^{b, c} J.G. Tralhão^{a, b, d}
M.F. Botelho^{a, b}

^aBiophysics Unit, IBILI – Faculty of Medicine, ^bCenter of Investigation on Environmental, Genetics and Oncobiology – CIMAGO, Faculty of Medicine, ^cBiochemistry Department, Faculty of Sciences and Technology, University of Coimbra, and ^dSurgical Department, Surgery A, HUC, Coimbra, and ^eCICS-UBI, Health Sciences Research Centre, Faculty of Health Sciences, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal

Key Words

Hepatocellular carcinoma · p53 · Cisplatin · Doxorubicin · 5-Fluorouracil

Abstract

Background: Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common primary neoplasm of the liver. A major proportion of HCCs also present mutation of the gene that encodes p53, which confers chemoresistance. The main goal of this work is to investigate the effect of cisplatin, doxorubicin and 5-fluorouracil (5-FU) in three human HCC cell lines which differ in p53 expression. **Methods:** HepG2 (expressing normal p53), HuH7 (expressing mutated p53) and Hep3B2.1-7 (not expressing p53) cell lines were cultivated in the presence of cisplatin, doxorubicin and 5-FU. Cell proliferation was evaluated by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay (MTT assay). The type of cell death and Bax and Bcl2 activation were assessed by flow cytometry. **Results:** It was found that for all of the cell lines studied, the agent that gave the most satisfactory results was doxorubicin. 5-FU demonstrated no activity in these cell lines. **Conclusions:** For all the cell lines studied, doxorubicin was the most satisfactory agent. In HepG2 and HuH7 cell lines, it can activate Bax with statistical significance.

Copyright © 2012 S. Karger AG, Basel

Introduction

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common primary liver cancer. The main cause of liver carcinogenesis is attributed to the cirrhotic liver, associated both with the chronic ingestion of alcohol and hepatitis B virus and hepatitis C virus infections, and it is normally associated with chronic liver disease [1–3].

HCC is classified as a highly chemoresistant disease. The most active agents in HCC therapy are doxorubicin and cisplatin; however, systemic doxorubicin as the most widely used agent in clinical practice provides a partial response in only <10% of patients, without improving overall survival. The action of 5-fluorouracil (5-FU) is somewhat controversial, although it is advocated by some authors [4–8]. Therefore, the role of chemotherapy in HCC is mainly palliative. Recent contributions report molecular alterations in HCC that induce an imbalance in the regulation of apoptosis and in the subsequent resistance to chemotherapy. In addition, alterations in the expression and/or activation of p53 are frequent in HCC cells, which confer on them resistance to chemotherapeutic drugs [5–11].

The p53 gene is a tumor suppressor which plays an important role in the control of the normal cell cycle and,

thus, is a key factor in apoptosis induction in response to chemotherapy [9, 12, 13]. Mutations in this protein normally result in the inability of p53 to effectively interact and to bind DNA, as well as the inactivation of residual normal forms of the protein expressed in the cells, thus preventing transcriptional activation of genes involved in cell cycle arrest and apoptosis [12–15].

In light of this, the main goal of this work is to investigate the effect of cisplatin, doxorubicin and 5-FU in three human HCC cell lines that differ in p53 expression [8, 14].

Materials and Methods

Cell Culture

The human HCC cell lines HepG2 and Hep3B2.1-7 were obtained from the American Tissue Cell Collection (ATCC), USA. The HuH7 cell line was obtained from the Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB), Japan. HepG2 cells express normal p53, HuH7 cells express a mutated form of p53 and Hep3B2.1-7 cells do not express p53 [16, 17]. Cells were plated in T-75 flasks (Sarstedt, Denmark) containing complete Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma D-5648), 10% fetal bovine serum (Gibco 2010-09), 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Gibco 15140-122), pH 7.4, and incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere.

Cell Proliferation Assay

To evaluate cell proliferation, cells were plated in 24-well multiwell plates (Sarstedt, Denmark) with 25,000 cells in each well. All cells were treated with different concentrations of doxorubicin (12.5 nM to 30 µM), cisplatin (50 nM to 100 µM) and 5-FU (500 nM to 500 µM). Cell proliferation was evaluated 24, 48, 72 and 96 h after drug incubation using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (Sigma M2128) assay according to a method already described [18, 19].

Cell Viability Assay

HepG2, HuH7 and Hep3B2.1-7 human cell lines were treated with three different doses, which corresponded to a dose equal to the half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀), one dose inferior to IC₅₀ and one superior dose, of cisplatin, doxorubicin and 5-FU during 48 h. In order to study cell viability, flow cytometry using annexin V/propidium iodide was performed according to a method described by Casalta-Lopes et al. [18].

Determination of Bax and Bcl2 Expression

Expression of Bcl2 and Bax was determined after incubation with drugs at a concentration corresponding to IC₅₀ for 48 h. Bax and Bcl2 expression was also assessed in control cells. Cells were fixed with 100 µl of fix solution (IntraCell, Immunostep) for 15 min and washed by centrifugation at 1,500 rpm for 5 min. Then, cells were permeabilized and incubated for 15 min with 100 µl of permeabilization solution (IntraCell, Immunostep) and 1 µg of Bax-phycoerythrin (Santa Cruz Biotechnology) and 1 µg of Bcl2-FITC (Pharmingen, BD Biosystems).

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using PASW statistics (v. 18, SPSS Inc., Chicago, Ill., USA). Comparison of cell viability results and the Bax/Bcl-2 ratio was performed using the nonparametric Mann-Whitney test. A significance level of 5% was adopted for all comparisons. Cell proliferation dose-response curves were fitted to a 3-parameter sigmoid equation through computer-assisted curve fitting (OriginPro Lab, version 8).

Results

Proliferation Studies

It was possible to observe that the proliferation inhibition potential of each drug increased gradually with the increase in incubation period for all cell lines (tables 1–3).

From the analysis of results obtained for cisplatin (table 1), it was possible to observe that for 24 h of incubation, this compound had a low inhibitory potential. For cisplatin, the most sensitive cell line for 96 h of incubation was HuH7. Regarding the results obtained for doxorubicin, shown in table 2, it was possible to determine that concentrations needed to achieve IC₅₀ were much lower than those of cisplatin, which suggests a higher sensitivity of all cell lines to doxorubicin. The results for 5-FU (table 3) show that for HuH7 and Hep3B2.1-7 cells, it was not possible to calculate IC₅₀ for small time periods of incubation, suggesting that 5-FU does not have a high antiproliferative potential. However, HepG2 cells showed some proliferative inhibition, mainly when cells were incubated for 96 h with 5-FU, demonstrating differences between the cell lines tested and their susceptibility to this drug.

Cell Viability Studies

Regarding the results obtained with incubation with cisplatin (fig. 1a), it was possible to verify that the HepG2 cell line has a higher tendency to die by necrosis. Interestingly, for HuH7 cells incubated with 3.5 µM cisplatin, around 40% of cells maintained viability ($p < 0.05$), while the rest died mostly by apoptosis ($p < 0.05$; fig. 1d). With regard to the Hep3B2.1-7 cell line (fig. 1g), it was possible to verify that when cells were incubated with 4 µM cisplatin, around 55% of cells remained viable ($p < 0.05$), while 15% died by necrosis ($p < 0.05$) and another 15% by late apoptosis and/or necrosis.

When the cells were incubated with doxorubicin, it was possible to observe that 50% of HepG2 cells remained alive ($p < 0.05$) when incubated with 0.7 µM of this drug (fig. 1b). The rest of the cells died, mainly by apoptosis. With an increase in the concentration, the

Table 1. Relation between the concentrations of cisplatin needed to induce the IC₅₀ for different periods of incubation and respective r² for the three cell lines analyzed (HepG2, HuH7 and Hep3B2.1-7)

Incubation period, h	Cisplatin					
	HepG2		HuH7		Hep3B2.1-7	
	IC ₅₀ , μM	r ²	IC ₅₀ , μM	r ²	IC ₅₀ , μM	r ²
24	26.71	0.95	58.77	0.95	47.17	0.93
48	7.28	0.98	3.09	0.99	3.85	0.98
72	2.04	0.96	1.51	0.99	2.97	0.99
96	1.24	0.90	0.72	0.99	2.27	0.98

Each IC₅₀ and r² was calculated using the program OriginLab Pro, version 8.

Table 2. Relation between the concentrations of doxorubicin needed to induce the IC₅₀ for different periods of incubation and respective r² for the three cell lines analyzed (HepG2, HuH7 and Hep3B2.1-7)

Incubation period, h	Doxorubicin					
	HepG2		HuH7		Hep3B2.1-7	
	IC ₅₀ , μM	r ²	IC ₅₀ , μM	r ²	IC ₅₀ , μM	r ²
24	22.02	0.95	58.40	0.89	5.22	0.89
48	0.68	0.97	0.24	0.92	0.83	0.99
72	0.29	0.97	0.10	0.98	0.43	0.99
96	0.07	0.98	0.10	0.99	0.071	0.97

Each IC₅₀ and r² was calculated using the program OriginLab Pro, version 8.

Table 3. Relation between the concentrations of 5-FU needed to induce the IC₅₀ for different periods of incubation and respective r² for the three cell lines analyzed (HepG2, HuH7 and Hep3B2.1-7)

Incubation period, h	5-FU					
	HepG2		HuH7		Hep3B2.1-7	
	IC ₅₀ , μM	r ²	IC ₅₀ , μM	r ²	IC ₅₀ , μM	r ²
24	>500		>500		>500	
48	205.19	0.98	390.00	0.98	>500	
72	18.98	0.93	166.62	0.94	88.25	0.84
96	12.5	0.91	64.83	0.97	21.67	0.82

Each IC₅₀ and r² was calculated using the program OriginLab Pro, version 8.

most representative death mechanism was late apoptosis and/or necrosis ($p < 0.05$). When the HuH7 cell line was incubated with only 0.05 μM doxorubicin, the percentage of live cells was around 60% ($p < 0.05$), and the majority of the cells died by necrosis ($p < 0.05$; fig. 1e). The viability of Hep3B2.1-7 cells decreased as the concentration of doxorubicin increased (fig. 1h). When cells were incubated with 0.85 μM doxorubicin, only 35% of the cells were viable ($p < 0.05$); the majority of cells died by late apoptosis and/or necrosis and 25% by early apoptosis.

When HepG2 cells were incubated with 2 μM 5-FU, death was not induced (fig. 1c); however, when the concentration was increased to 200 μM, cells exhibited about 15% of death by apoptosis ($p < 0.05$), and for those cells incubated with 500 μM, cell death increased to 25% but without statistical significance. Just as with HepG2 cells, the HuH7 cell line showed resistance to 5-FU (fig. 1f), with the majority of cells remaining alive for all concentrations tested. The Hep3B2.1-7 cell line showed a greater sensitivity to 5-FU (fig. 1i), but for concentrations of 200 and 500 μM, the percentage of viable cells was about 55% ($p < 0.05$).

Bax/Bcl2 Activation

The results of the expression of Bax and Bcl2 in the three cell lines when incubated with the IC₅₀ of each drug during 48 h show that the Bax/Bcl2 ratio was mostly greater than 1 (fig. 2). However, the Bax/Bcl2 ratio in controls was always greater than 1.

When the HepG2 cell line was incubated with both cisplatin and doxorubicin, the Bax/Bcl2 ratio was higher than 1, but only the ratio of cells treated with doxorubicin showed statistical significance ($p < 0.05$). In contrast, when these cells were incubated with 5-FU, the Bax/Bcl2 ratio was lower than the control (less than 1), with statistical significance ($p < 0.05$; fig. 2a).

When the HuH7 cell line was incubated with doxorubicin, there was a statistically significant increase in the Bax/Bcl2 ratio ($p < 0.05$). Conversely, when these cells were incubated with cisplatin and 5-FU, the results showed no significant increase in the Bax/Bcl2 ratio when compared with control results (fig. 2b).

Concerning the studies performed with the Hep3B2.1-7 cell line, we found that incubation with any of the cytotoxic drugs showed no significant differences between the Bax/Bcl2 ratio of treated cells and controls.

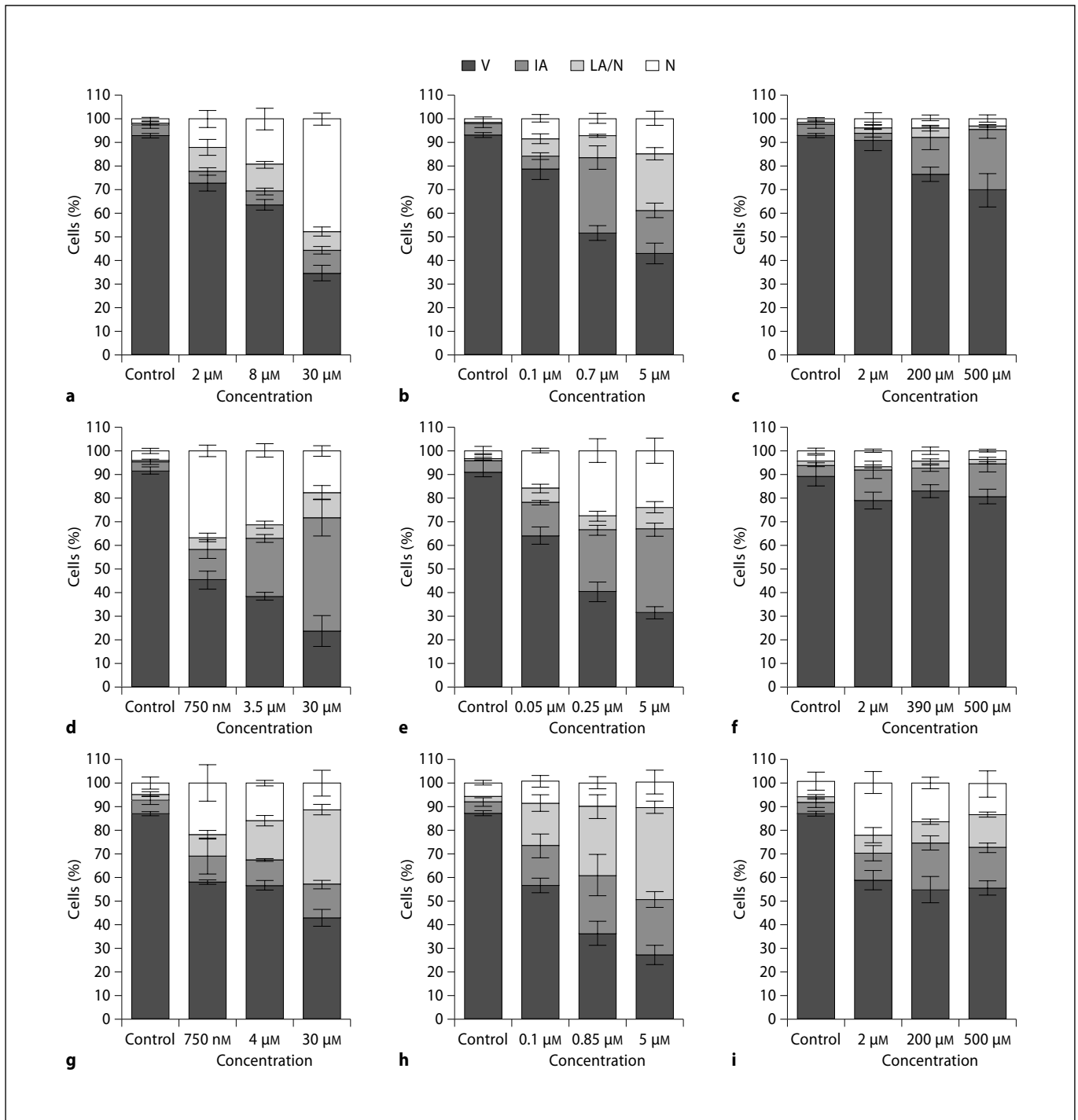


Fig. 1. Analysis of cell viability and different cell death pathways by flow cytometry. HepG2, HuH7 and Hep3B2.1-7 human cell lines were treated with three different doses of cisplatin, doxorubicin and 5-FU during 48 h, corresponding to a dose equal to the IC₅₀, one inferior and one superior dose, and then cell viability and cell death (early apoptosis, late apoptosis and/or necrosis and necrosis) were assessed by flow cytometry using annexin V and propidium iodide as death markers. **a-c** HepG2 cells incubated with cisplatin (**a**), doxorubicin (**b**) and 5-FU (**c**). **d-f** HuH7

cells incubated with cisplatin (**d**), doxorubicin (**e**) and 5-FU (**f**). **g-i** Hep3B2.1-7 cells incubated with cisplatin (**g**), doxorubicin (**h**) and 5-FU (**i**). We carried out a comparison for each cell line, with regard to the percentage of living cells killed by apoptosis, necrosis and necrosis/late apoptosis compared to control with each of the concentrations, using the Mann-Whitney test. The result is statistically significant when $p < 0.05$. V = Viable; IA = initial apoptosis; LA/N = late apoptosis/necrosis; N = necrosis.

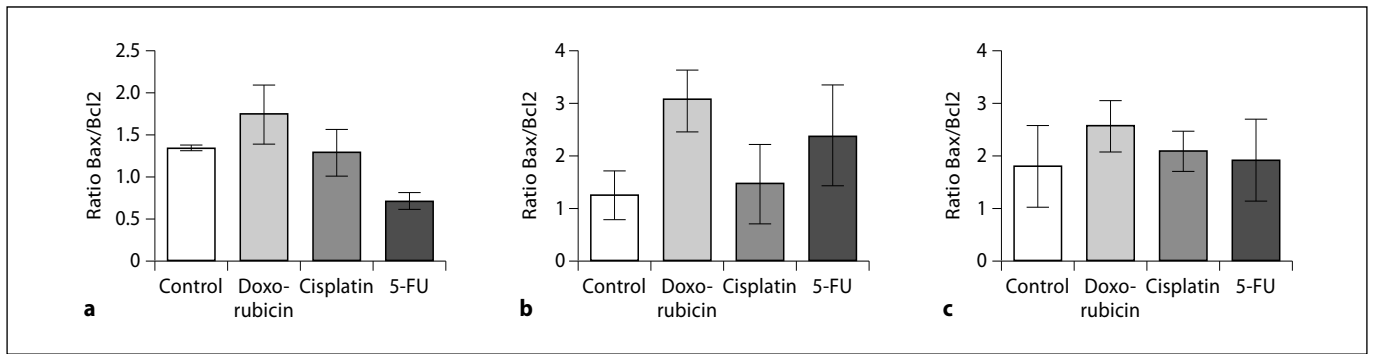


Fig. 2. a–c Ratio of Bax and Bcl2 expression in response to chemotherapeutic agents. Ratio of Bax/Bcl2 activation in response to doxorubicin, cisplatin and 5-FU in the HepG2 cell line (a), HuH7 cell line (b) and Hep3B2.1-7 cell line (c). The expression of Bcl2 and Bax was determined by flow cytometry after incubation for

48 h with drugs at a concentration corresponding to the IC₅₀ for each drug in each cell line. We carried out statistical processing of data using the Mann-Whitney test. Each result is statistically significant when $p < 0.05$.

Discussion

HCC is classified as a highly chemoresistant cancer. Thus, our aim was to verify, *in vitro*, the efficacy of cisplatin, doxorubicin and 5-FU in three human HCC cell lines under study.

Regarding the sensitivity of the cell lines to the cytotoxic agents (tables 1–3), it is possible to conclude that all cell lines showed a higher sensitivity to doxorubicin. With regard to 5-FU, these cell lines showed some resistance to this drug. For long periods of incubation, the cell line that was most sensitive to cisplatin was HuH7, which also showed a high sensitivity to doxorubicin. This cell line has a mutation in the p53 gene that confers overexpression of p53 protein [16]. Overexpression of the tumor suppressor protein might be responsible for the greater cell damage induced by the chemotherapy and, consequently, the increased cell death [20, 21].

Regarding *in vitro* therapy with 5-FU, it is possible to conclude that, in general, the cell lines studied do not show sensitivity to this compound. These results might explain some of the clinical controversies concerning the use of 5-FU in conjugated therapies for HCC [22, 23].

Analyzing cell viability results, with regard to the HepG2 cell line, cisplatin mainly induced necrosis while doxorubicin induced late apoptosis and/or necrosis. This cell line expresses p53 and has the ability to recognize induced cell damage and simultaneously may induce damage repair pathways (fig. 1a). The results obtained by flow cytometry related to the activation of Bax and Bcl2 in response to doxorubicin appear to be consistent with cell viability, since cells preferentially die by apoptosis (fig. 1b),

and the Bax/Bcl2 ratio was higher than that in the control (fig. 1a) for cells incubated with a drug concentration equal to IC₅₀, which suggests that a proapoptotic pathway is being activated.

Concerning the results obtained with the HuH7 cell line, cells incubated with cisplatin present some activation of apoptosis. Once again, this result might be directly dependent on the p53 gene mutation that induces an overexpression of this protein, which seems to maintain its function. When these cells are incubated with doxorubicin, a balance between cell death by apoptosis and by necrosis is established (fig. 1e), but, interestingly, the ratio between the proapoptotic protein Bax and antiapoptotic protein Bcl2 is significantly increased, which indicates a strong activation of the apoptotic cascade (fig. 2b). As predicted, the results for incubation with 5-FU do not show alterations in the Bax/Bcl2 ratio.

For the Hep3B2.1-7 cell line, it is noted that cells treated with cisplatin died mainly by late apoptosis and/or necrosis (fig. 1g), which is similar to results obtained when doxorubicin was used (fig. 1h). However, the cell death induced by 5-FU has low significance. For these cells, none of the therapies increased the Bax/Bcl2 ratio with statistical significance between treated and control cells (fig. 2c). This result can be explained by the absence of p53 expression in these cells and loss of the ability to recognize the cell damage induced and the beginning of programmed cell death [23].

HCC is considered highly resistant to apoptosis. The results obtained with our study are concordant with results presented by other authors, since the main cell death mechanism found was necrosis [10, 24]. However, there

are other molecules such as Bad and Bcl-XL, which can be involved in pathways of apoptosis activation, that should be taken into account. On the other hand, the expression and/or activation of JAK/STAT, PI3K/AKT and RAS/ERKs pathways can be enhanced in many HCC cells, conferring resistance to apoptotic stimuli [10, 24].

Conclusion

From our experimental results, we conclude that p53 is not always a key factor in the response to chemotherapy in HCC, since doxorubicin was the drug that showed better results, independently of p53 expression, and for HepG2 and HuH7 cell lines it can activate Bax with statistical significance. According to our results, 5-FU is not a promising drug in HCC treatment, which may explain

the negative clinical results. There were no satisfactory results when studies were conducted with combinations of drugs, which may indicate that there are no synergistic effects when these three drugs are administered together (data not shown).

Although this type of tumor may be natively chemoresistant, the results obtained were promising, indicating that sometimes the choice of drug to be used should be more careful and can benefit from basic research.

Acknowledgments

We would like to thank the Fundação Calouste Gulbenkian for providing financial support (project 96442). A.F. Brito is a recipient of a Fellowship from the Portuguese Foundation for Science and Technology (SFRH/BD/61378/2009).

References

- 1 Venook AP, Papandreou C, Furuse J, de Guevara LL: The incidence and epidemiology of hepatocellular carcinoma: a global and regional perspective. *Oncologist* 2010;15(suppl 4):5–13.
- 2 Christopeit M, Lenz G, Forstpointner R, Bartelheim K, Kühnbach R, Naujoks K, Schalhorn A: Nine months to progression using fourth-line liposomally encapsulated paclitaxel against hepatocellular carcinoma. *Chemotherapy* 2008;54:309–314.
- 3 Guo C, Li Y, Zhang H, Wang Z, Jin M, Zhang L, An L, Hu G, Liu X, Liu Y, Du H, Sun Z: Enhancement of antiproliferative and proapoptotic effects of cadmium chloride combined with hSmac in hepatocellular carcinoma cells. *Chemotherapy* 2011;57:27–34.
- 4 Giglia JL, Antonia SJ, Berk LB, Bruno S, Desureault S, Finkelstein SE: Systemic therapy for advanced hepatocellular carcinoma: past, present, and future. *Cancer Control* 2010;17:120–129.
- 5 Samuel M, Chow PK, Chan Shih-Yen E, Machin D, Soo KC: Neoadjuvant and adjuvant therapy for surgical resection of hepatocellular carcinoma. *Cochrane Database Syst Rev* 2009;(1):CD001199.
- 6 Olthoff KM, Rosove MH, Shackleton CR, Imagawa DK, Farmer DG, Northcross P, Pakrasi AL, Martin P, Goldstein LI, Shaked A, et al: Adjuvant chemotherapy improves survival after liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Ann Surg* 1995;221:734–741.
- 7 Johnson PJ: Systemic chemotherapy of liver tumors. *Semin Surg Oncol* 2000;19:116–124.
- 8 Forbes A, Williams R: Chemotherapy and radiotherapy of malignant hepatic tumours. *Baillieres Clin Gastroenterol* 1987;1:151–169.
- 9 Gudkov AV, Komarova EA: The role of p53 in determining sensitivity to radiotherapy. *Nat Rev Cancer* 2003;3:117–129.
- 10 Yeo W, Mok TS, Zee B, Leung TW, Lai PB, Lau WY, Koh J, Mo FK, Yu SC, Chan AT, Hui P, Ma B, Lam KC, Ho WM, Wong HT, Tang A, Johnson PJ: A randomized phase III study of doxorubicin versus cisplatin/interferon alpha-2b/doxorubicin/fluorouracil (PIAF) combination chemotherapy for unresectable hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:1532–1538.
- 11 Hussain SP, Schwank J, Staib F, Wang XW, Harris CC: TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer. *Oncogene* 2007;26:2166–2176.
- 12 Ferreira CG, Tolis C, Giaccone G: p53 and chemosensitivity. *Ann Oncol* 1999;10:1011–1021.
- 13 Brady CA, Attardi LD: p53 at a glance. *J Cell Sci* 2010;123:2527–2532.
- 14 Dai C, Gu W: p53 post-translational modification: deregulated in tumorigenesis. *Trends Mol Med* 2010;16:528–536.
- 15 Tapia N, Schöler HR: p53 connects tumorigenesis and reprogramming to pluripotency. *J Exp Med* 2010;207:2045–2048.
- 16 Kaino M: Alterations in the tumor suppressor genes p53, RB, p16/MTS1, and p15/MTS2 in human pancreatic cancer and hepatoma cell lines. *J Gastroenterol* 1997;32:40–46.
- 17 Seewoo V, Yang W, Du H, Wang J, Lin A, Shen B, Peng C, Li H, Qiu W: The different induction mechanisms of growth arrest DNA damage inducible gene 45 β in human hepatoma cell lines. *Chemotherapy* 2012;58:165–174.
- 18 Casalta-Lopes J, Abrantes AM, Laranjo M, Rio J, Gonçalves AC, Oliveiros B, Sarmento-Ribeiro AB, Botelho MF: Efflux pumps modulation in colorectal adenocarcinoma cell lines: the role of nuclear medicine. *J Cancer Ther* 2011;2:408–417.
- 19 Luo KW, Sun JG, Chan JY, Yang L, Wu SH, Fung KP, Liu FY: Anticancer effects of imperatorin isolated from *Angelica dahurica*: induction of apoptosis in HepG2 cells through both death-receptor- and mitochondria-mediated pathways. *Chemotherapy* 2011;57:449–459.
- 20 Goldstein I, Marcel V, Olivier M, Oren M, Rotter V, Hainaut P: Understanding wild-type and mutant p53 activities in human cancer: new landmarks on the way to targeted therapies. *Cancer Gene Ther* 2011;18:2–11.
- 21 Chen GG, Chan UP, Bai LC, Fung KY, Tessier A, To AK, Merchant JL, Lai PB: ZBP-89 reduces the cell death threshold in hepatocellular carcinoma cells by increasing caspase-6 and S phase cell cycle arrest. *Cancer Lett* 2009;283:52–58.
- 22 Coriat R, Mir O, Cessot A, Brezault C, Ropert S, Durand JP, Cacheux W, Chaussade S, Goldwasser F: Feasibility of oxaliplatin, 5-fluorouracil and leucovorin (FOLFOX-4) in cirrhotic or liver transplant patients: experience in a cohort of advanced hepatocellular carcinoma patients. *Invest New Drugs* 2012;30:376–381.
- 23 Longley DB, Harkin DP, Johnston PG: 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 2003;3:330–338.
- 24 Schattenberg JM, Schuchmann M, Galle PR: Cell death and hepatocarcinogenesis: dysregulation of apoptosis signaling pathways. *J Gastroenterol Hepatol* 2011;26(suppl 1):213–219.

Acção anti-cancerígena da Quercetina no Carcinoma Hepatocelular: o papel do GLUT-1

Anticancer effect of Quercetin in Hepatocellular Carcinoma: the role of GLUT-1

*Brito AF^{1,2}; Ribeiro M^{1,3}; Abrantes AM^{1,2}; Gonçalves AC^{1,4};
Sarmiento-Ribeiro AB^{1,4}; Tralhão JG^{1,2,5}; Botelho MF^{1,2}*

¹ Unidade de Biofísica, IBILI, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra; ² Centro de Investigação em Meio Ambiente, Genética e Oncobiologia (CIMAGO), Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra;

³ Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra; ⁴ Biologia Molecular Aplicada, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra ⁵ Serviço de Cirurgia, Cirurgia A, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

SUMÁRIO

O Carcinoma Hepatocelular (CHC) é um dos cancros mais letais, com uma crescente incidência em diversas regiões por todo o mundo. Sem tratamento específico, o prognóstico é muito pobre e a sobrevida diminuta. A terapia mais eficaz consiste no transplante hepático e na ressecção cirúrgica, no entanto, e uma vez que apenas 15% dos doentes são candidatos a tratamento cirúrgico, torna-se urgente a procura de novas opções terapêuticas para este tipo de tumor.

Alguns estudos demonstraram que a expressão do transportador de glucose-1 (GLUT-1) pode estar alterada neste tipo de tumor. Um estudo recente demonstrou que a supressão da expressão de GLUT-1, recorrendo a siRNA (*small interfering RNA*) conseguiu reduzir significativamente a tumorigénese em culturas celulares de CHC, sugerindo que o GLUT-1 pode ser um alvo terapêutico para este tipo de tumor altamente agressivo.

Assim, o objectivo deste trabalho experimental foi avaliar o efeito anti-cancerígeno da quercetina, um possível inibidor do GLUT-1, numa linha celular humana de CHC (HepG2, ATCC), assim como avaliar o seu efeito na captação de ¹⁸F-FDG, um análogo da glucose radiomarcado com Flúor-18.

Com os resultados obtidos verificou-se que a quercetina possui a capacidade de inibir a proliferação da linha celular em estudo e, para além disso, parece ter influência na captação de ¹⁸F-FDG já que conseguiu diminuir a percentagem de captação do radiofármaco nesta linha celular. No entanto, através da técnica de citometria de fluxo verificou-se que as células permanecem viáveis, e que este composto não inibe a expressão proteica do GLUT-1. Estes resultados indicam que a quercetina inibe este transportador de glucose quanto à função, mas não quanto à expressão.

Palavras-chave: *Quercetina, Carcinoma Hepatocelular, GLUT-1*

ABSTRACT

Hepatocellular Carcinoma (HCC) is one of the most fatal cancers, with rising incidence. Without specific treatment, the prognosis is very poor and diminished survival. The most effective therapy is liver transplantation and complete surgical resection, however, since



only 15% of patients are candidates for such therapies, a wide range of patients are subjected to treatment with conventional therapies, and the rate success is greatly diminished.

It is thought that the expression of glucose transporter 1 (GLUT-1) may be altered in HCC. A recent study showed that suppression of GLUT-1 expression, using siRNA (*small interfering RNA*) could significantly reduce tumorigenesis in HCC cell lines, suggesting that GLUT-1 may be a therapeutic target for this highly aggressive tumor.

Thus, this project aims to evaluate the anticancer effect of quercetin, a possible inhibitor of GLUT-1, in a human HCC cell line HepG2, as well as check the effect of this compound on ¹⁸F-FDG (a glucose radiolabelled analogue) uptake in this cell line.

These results shown that quercetin have anti-proliferative effect on HCC cell line studied. This compound also have shown ability to decrease the ¹⁸F-FDG uptake.

However, using flow cytometry it was found that HepG2 cells remain viable after treatment with quercetin, and this compound doesn't inhibit the GLUT-1 protein expression. These results indicate that quercetin inhibits the GLUT-1 function, but doesn't inhibit the expression of this transporter.

Keywords: *Quercetin, Hepatocellular Carcinoma, GLUT-1*

INTRODUÇÃO

O carcinoma hepatocelular (CHC) é um dos tipos de cancro mais letais em todo o mundo. A principal causa da carcinogénese hepática é atribuída à doença hepática crónica secundária associada à ingestão crónica de álcool como com a infecção pelo vírus da Hepatite B (HBV) ou pelo vírus da Hepatite C (HCV), estando estes normalmente relacionados com a doença hepática crónica [1,2]. Existem ainda outros factores que contribuem para a génese do CHC, como a obesidade, a diabetes e a esteatose hepática não-alcoólica [3,4].

O CHC não possui tratamento específico, o prognóstico é muito pobre e a sobrevida diminuta, o que o torna a terceira maior causa de morte por cancro a nível mundial. Entre as opções terapêuticas, o transplante hepático e a ressecção cirúrgica são as terapias mais eficazes, contudo apenas 15% a 20% dos doentes podem beneficiar do tratamento cirúrgico [4-6].

O CHC é classificado como um tumor com elevada quimiorresistência; deste modo, a eficácia da quimioterapia sistémica convencional para este tipo de cancro é reduzida. Embora, a doxorubicina sistémica, seja o agente mais utilizado na prática clínica, permite uma resposta parcial apenas em cerca de 10% dos doentes sem melhorar de forma significativa a sobrevida global [7-12].

A radioterapia também pode ser usada no tratamento do CHC. No entanto, alguns estudos tem demonstrado que a ineficácia da acção da radioterapia deve-se à heterogeneidade dos carcinomas hepatocelulares, nomeadamente na expressão da proteína p53, o que poderá estar na base da resistência/sensibilidade associada à radio e à quimioterapia [6,13-14].

Neste sentido, torna-se necessário investigar novas opções terapêuticas no combate ao CHC. A terapia génica tem vindo a ser estudada exaustivamente como uma nova abordagem para o tratamento do CHC surgindo, o transportador de glucose 1 (GLUT-1) como possível alvo terapêutico para este tipo de tumor extremamente agressivo [15,16]. A sobreexpressão de GLUT-1 associado ao aumento do metabolismo de glucose estão presentes numa ampla variedade de tumores sólidos conferindo-lhes, na maioria das vezes, um mau prognóstico [16-20]. Alguns estudos indicam que o GLUT-1 se encontra sobreexpresso no CHC, promovendo a carcinogénese [16,17]. Para além disso, um estudo de 2009 [17] demonstrou que suprimindo a expressão de GLUT-1, recorrendo a siRNA (*small interfering RNA*) se conseguiu reduzir significativamente a tumorigénese em culturas celulares de CHC; estes resultados sugerem que o GLUT-1 desempenha um papel directo na oncogénese desta neoplasia, podendo ser um novo alvo terapêutico para este tipo de tumor [15-17].



A tomografia por emissão de positrões (PET) com recurso ao análogo radiomarcado da glucose ^{18}F -FDG permite a detecção de processos de glicólise aumentados. O ^{18}F -FDG entra nas células através de transportadores de glucose (GLUTs), principalmente através do GLUT-1 e do GLUT-3. No entanto, ao mesmo tipo histológico de tumor poderão corresponder diferentes captações de ^{18}F -FDG [16,21]. Desta forma, diferentes tumores possuem diferentes captações do radiofármaco, o que poderá estar intimamente relacionado com as diferenças existentes na expressão de GLUT's de cada tumor e com o perfil genético dos mesmos [16, 21].

O efeito anti-tumoral dos flavonóides tem sido estudado, com o intuito de induzir a inibição do crescimento celular e indução de apoptose numa variedade de células oncológicas [22]. Os flavonóides e os isoflavonóides são potentes inibidores do fluxo de glucose [23-25]. Neste sentido, tem vindo a ser estudada a acção destas substâncias como inibidores do GLUT-1. Este transportador de glucose possui três domínios de ligação de ATP, que são essenciais para a sua conformação e afinidade. Deste modo, estes locais de ligação de ATP parecem ser um alvo possível para estratégias farmacológicas, que resultam no bloqueio do GLUT-1. Actualmente, tem-se demonstrado que as flavonas, como a genisteína e a quercetina, inibem as tirosinas cinases da ligação de ATP, sendo capazes também de inibir o GLUT-1 através deste mecanismo [16].

A quercetina é um flavonóide bioactivo ubíquo que inibe a proliferação de células oncológicas. Estudos realizados em culturas celulares mostraram que a quercetina possui actividade contra alguns tipos de células cancerosas [26,27]. Outros estudos recentes sugeriram que a quercetina pode retardar o crescimento destas células e pode ajudar a promover a apoptose [23-25]. Deste modo, a quercetina pode ser considerada um potencial agente terapêutico para células tumorais.

O objectivo deste trabalho consiste na avaliação do efeito anti-cancerígeno da quercetina, verificando o seu efeito como possível inibidor do GLUT-1.

MATERIAIS E MÉTODOS

Culturas celulares

A linha celular de carcinoma hepatocelular (HepG2), obtida na *American Type Culture Collection* (ATCC), foi descongelada e propagada após recepção. A propagação foi feita em culturas aderentes a 37°C em atmosfera com 5% de CO_2 , utilizando para tal o meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium High Glucose* (DMEM) (Sigma) suplementado com $100\mu\text{M}$ de piruvato de sódio (Gibco), 10% de soro bovino fetal (Sigma) e 1% de antibiótico (100U/mL de penicilina e $10\mu\text{g/mL}$ estreptomina) (Gibco). Para os estudos de captação as células foram cultivadas quer em meio com elevado teor de glucose (25mM) quer em baixo teor de glucose (5mM) (Gibco).

Avaliação da proliferação celular

Para este estudo foi necessária uma suspensão celular com 5×10^4 células/mL em meio de cultura distribuída por placas de 24 poços, contendo cada poço $500\mu\text{L}$ da suspensão. Após 24 horas, as células foram incubadas com diferentes concentrações de quercetina que variaram entre 0,1 e 25mM . Depois de 24, 48, 72 e 96 horas a proliferação celular foi avaliada recorrendo ao teste do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium) como descrito em [28]. Os resultados obtidos foram analisados e processados no programa OriginPro 8.0, de modo a calcular a concentração que inibe 50% da proliferação celular (IC_{50}).

Estudos de captação de ^{18}F -FDG

Através dos estudos de captação estudou-se o perfil de captação de ^{18}F -FDG ao longo do tempo, na linha celular HepG2 e na mesma linha incubada previamente com $37,67\mu\text{M}$ de quercetina durante 24 horas. Para a realização dos estudos de captação foi necessário preparar uma suspensão celular com 2×10^6 células/mL. Após a preparação da suspensão celular foi adicionado o ^{18}F -FDG numa actividade igual a $25\mu\text{Ci}$ por cada mL de suspensão celular. Após 5, 30, 60, 90 e 120 minutos de incubação com o radiofár-



maco, foram retiradas amostras de 200µL da suspensão celular para tubos de *ependorf* que continham solução de tampão fosfato salino (PBS) gelado, de modo a reduzir o metabolismo celular. De seguida, as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm durante 60 segundos para completa separação entre o *pellet* e o sobrenadante, tendo este sido recolhido para um tubo devidamente identificado. Seguiu-se uma lavagem do *pellet* com 500µL de PBS gelado, repetindo-se o procedimento de separação do sobrenadante por centrifugação. Deste modo, foi possível calcular a captação do ¹⁸F-FDG por parte das células para cada tempo. Assim, através da contagem de ambas as fracções (*pellets* e sobrenadantes) no contador de poço em contagens por minuto (CPM), quantificou-se a percentagem de captação do ¹⁸F-FDG pelas células e traçou-se uma curva de captação ao longo do tempo de acordo com [28].

Citometria de fluxo

De modo a caracterizar a viabilidade celular, os tipos de morte celular e a expressão membranar e citoplasmática de GLUT-1 recorreu-se à técnica de citometria de fluxo. A análise foi feita utilizando um citómetro FSCSCalibur com seis parâmetros e quatro cores, equipado com um laser de argon de 15nW. Para cada ensaio foram necessários um milhão de células, sendo contabilizados 10000 eventos utilizando o Software Cell Quest (Becton Dickinson) e analisados utilizando o software Paint-a-gate (Becton Dickinson).

a) Viabilidade celular

De modo a avaliar a viabilidade celular e tipos de morte, recorreu-se à dupla marcação com anexina-V/iodeto de propídeo (AV/IP). Uma das principais características da morte celular por apoptose é o facto da fosfatidilserina (que nas células viáveis se encontra no folheto interno da membrana plasmática) translocar do folheto interno para o folheto externo da membrana plasmática e ligar-se à anexina-V. Por outro lado, o iodeto de propídeo que não penetra nas células viáveis, liga-se ao ácido desoxirribonucleico

(ADN) das células em apoptose tardia e em necrose. Neste ensaio, 1×10^6 de células foram incubadas com tampão de ligação, 1µL de anexina-V (KIT Immnotech) e 5µL de iodeto de propídeo (KIT Immnotech). De seguida as células foram excitadas com uma luz de comprimento de onda de 525nm para a anexina-V e 640 nm para o iodeto de propídeo. Deste modo é possível determinar a percentagem de células em apoptose, em apoptose tardia/necrose, em necrose assim como as células viáveis.

Esta marcação foi igualmente realizada com células controlo e com células incubadas durante 48 horas com 5µM, 37,67µM e 100µM de quercetina.

b) Expressão de GLUT-1

De modo a caracterizar a expressão membranar e intracelular de GLUT-1 recorreu-se à citometria de fluxo.

Para cada experiência foram utilizadas um milhão de células. Para a detecção membranar de GLUT-1 as células foram centrifugadas a 300G (Heraeus Multifuge 1 L-R) e posteriormente incubadas durante 15 minutos à temperatura ambiente com 10µL do anticorpo monoclonal anti-human GLUT-1 (flicoeritrina (PE) mouse anti-human GLUT-1, R&D Systems).

Para a detecção intracelular de GLUT-1, as células foram previamente fixadas com o reagente A (Intracell Kit, Immunostep) durante 15 minutos à temperatura ambiente, e após uma lavagem com PBS a 300G durante 5 minutos, as células foram permeabilizadas com o reagente B (Intracell Kit Immunostep) e incubadas com 10µL do anticorpo anteriormente referido.

Estas marcações foram feitas para células controlo e para células incubadas durante 48 horas com 37,67µM de quercetina.

RESULTADOS

Verificou-se que a acção da quercetina na proliferação celular das células HepG2 é dependente do tempo, ou seja, a proliferação celular diminui à me-



didada que se aumenta o tempo de incubação de acordo com a Figura 1 e a Tabela 1.

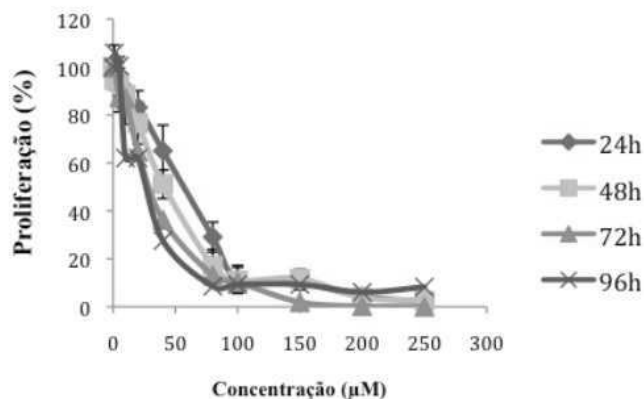


Figura 1 – Curvas dose-resposta da acção da quercetina na proliferação celular da linha celular HepG2 ao longo do tempo. Estudos efectuados após 24, 48, 72 e 96 horas de exposição com diferentes concentrações de quercetina. Os resultados expressam a média \pm desvios-padrão de seis experiências independentes (n=6).

Tempos	IC ₅₀ (µM)	R ²
24h	47,64	0,977
48h	37,67	0,980
72h	32,98	0,989
96h	30,74	0,986

Tabela 1 – Concentração inibitória média (IC₅₀) da quercetina em células HepG2 a diferentes tempos de incubação e respectivos R².

Nas figuras 2 e 3 é possível verificar o perfil de captação de ¹⁸F-FDG pelas células HepG2 ao longo do tempo (células controlo e células incubadas com 37,67µM de quercetina durante 24h). A figura 2 representa os resultados obtidos em células incubadas em meio com elevado teor de glucose (25mM), enquanto a figura 3 representa os resultados obtidos quando as células são incubadas em meio com baixo teor de glucose (5mM). Em ambas as situações, verifica-se que quando as células são incubadas com quercetina a percentagem de captação do radiofármaco é inferior à das células controlo.

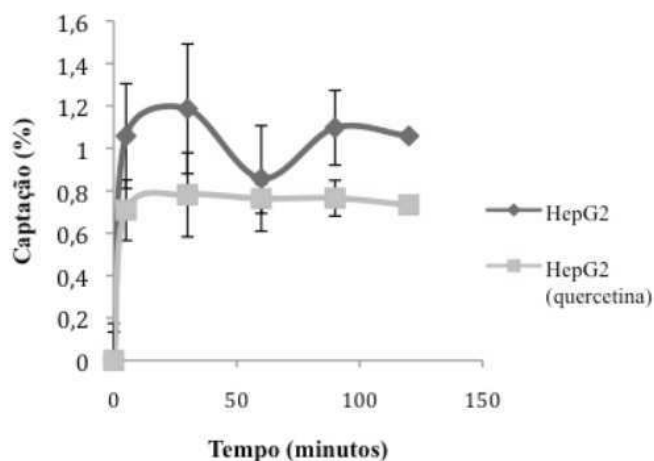


Figura 2 – Gráfico representativo da percentagem de captação de ¹⁸F-FDG em função do tempo, na linha celular HepG2 e na mesma linha celular incubada previamente com 37,67µM de quercetina durante 24 horas. Estudos efectuados em meio de cultura com elevado teor de glucose (25mM). Média \pm desvio-padrão de quatro experiências independentes realizadas em triplicado (n=12).

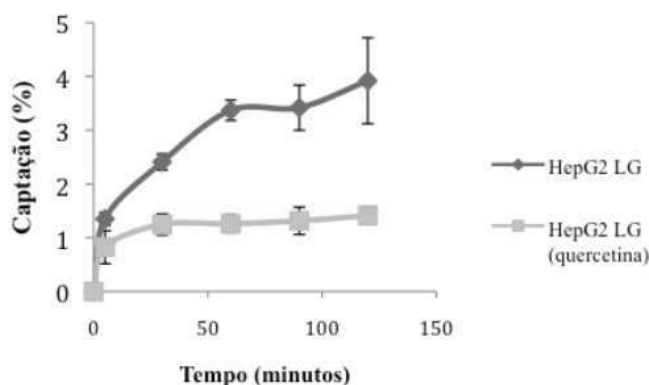


Figura 3 – Gráfico representativo da percentagem de captação de ¹⁸F-FDG em função do tempo, na linha celular HepG2 e na mesma linha incubada previamente com 37,67µM de quercetina durante 24 horas. Estudos efectuados em meio de cultura com baixo teor de glucose (5mM). Média \pm desvio padrão de quatro experiências independentes realizadas em triplicado (n=12).

Na figura 4 podemos observar a expressão membranar e citoplasmática do GLUT-1, em células HepG2 (controlo) e em células HepG2 incubadas previamente com 37,67µM de quercetina, durante 48 horas. Verifica-se que a quercetina não inibe a expressão proteica do GLUT-1, tanto membranar como citoplasmática.



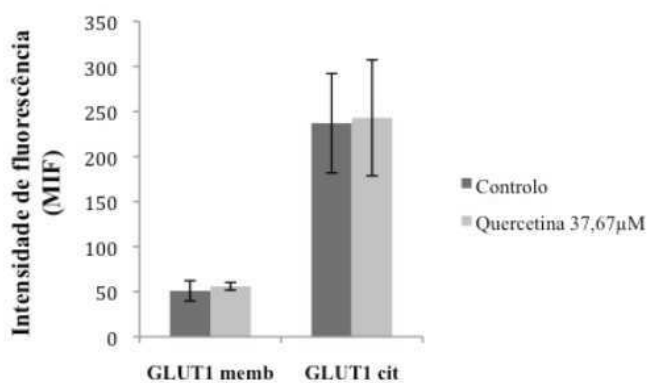


Figura 4 – Gráfico representativo da expressão membranar e citoplasmática de GLUT-1 em células HepG2 (controle) e em células HepG2 incubadas com 37,67µM de quercetina durante 48 horas. Média ± desvio padrão de três experiências independentes (n=3).

Na figura 5, verifica-se que a quercetina possui um efeito de inibição da proliferação celular, mas não efeito citotóxico, uma vez que mesmo quando se incubam as células com uma concentração bastante superior à do IC₅₀, não se observa morte celular para além dos 50%.

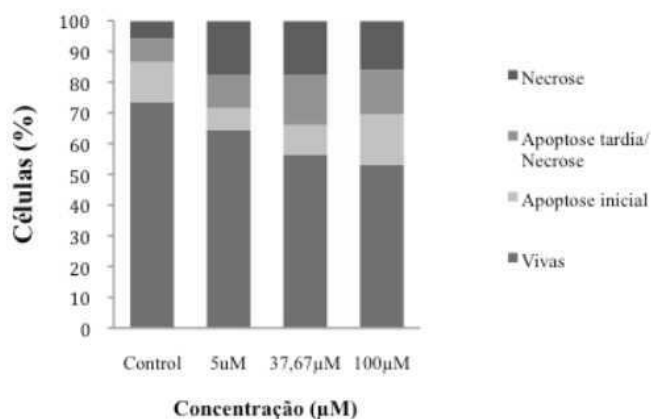


Figura 5 – Gráfico representativo do tipo de morte celular induzida em células HepG2 (controle) e em células HepG2 incubadas durante 48 horas com 5µM, 37,67µM e 100µM de quercetina. Média de três experiências independentes (n=3).

DISCUSSÃO

Os flavonóides, entre eles a quercetina têm vindo a ser sugeridos como potentes agentes anti-cancerígenos [17,26,27]. Um dos mecanismos de acção que é

actualmente atribuído aos flavonóides é a inibição do GLUT-1, que se sabe que no CHC possui um papel directo na oncogénese e não apenas no transporte de glucose [16,17].

Através deste estudo, verificou-se que a quercetina possui um efeito anti-proliferativo na linha celular de CHC HepG2, possuindo este efeito uma dependência temporal. O efeito anti-proliferativo observado por parte da quercetina pode dever-se, em parte, à inibição do GLUT-1 [16,17], existindo porém outros factores que devem ser tidos em conta, nomeadamente a expressão do gene supressor tumoral (TP53), uma vez que se sabe que este gene tem um papel crucial na indução da apoptose e na paragem do ciclo celular [29,30].

No entanto, e apesar de ocorrer uma diminuição da proliferação celular, através dos resultados obtidos por citometria de fluxo, verifica-se que a quercetina não tem um efeito citotóxico, apenas de inibição da proliferação celular. Tal resultado pode estar relacionado com o facto das células HepG2 expressarem uma forma normal da proteína 53 e a quercetina estar deste modo impedir a progressão do ciclo celular [30,31].

A quercetina possui um efeito inibitório na captação de ¹⁸F-FDG, sendo esse efeito mais notório quando as células são propagadas em meio com baixo teor de glucose. Estes resultados estão de acordo com a bibliografia, uma vez que a quercetina é tida como um inibidor competitivo do GLUT-1, afectando deste modo a captação de glucose e seus análogos [17,32].

Ao nível da expressão membranar e citoplasmática do GLUT-1, verifica-se que não existe inibição do GLUT-1 quando incubado com quercetina, o que nos leva a crer que apenas existe inibição da função deste transportador membranar, pois inibe a captação de ¹⁸F-FDG, e não da expressão. Este resultado prende-se com o facto da quercetina ser um inibidor competitivo da glucose, não induzindo deste modo alterações na expressão deste transportador [17,32].



CONCLUSÃO

Com este estudo foi possível observar que a quercetina possui um efeito anti-proliferativo na linha celular de CHC HepG2, não tendo porém efeito citotóxico. Conclui-se também que o composto em estudo é capaz de inibir a captação de ¹⁸F-FDG, sendo este efeito mais notório quando as células são cultivadas em meio com baixo teor de glucose. Verificou-se também que não existe uma inibição do GLUT-1 por parte da quercetina. No entanto, mais estudos são

necessários para esclarecer o efeito deste composto na função do GLUT-1.

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer à Fundação Calouste Gulbenkian pelo apoio financeiro (projecto 96442).

Um agradecimento também à Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) pela atribuição de uma bolsa de Doutoramento Individual a Brito AF (SFRH/BD/61378/2009).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Venook AP, Papandreou C, Furuse J, de Guevara LL: The incidence and epidemiology of hepatocellular carcinoma: a global and regional perspective. *Oncologist*. 2010;15 Suppl 4:5-13.
2. Yang JD, Roberts LR: Hepatocellular carcinoma: A global view. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010;7(8):448-58.
3. Schütte K, Bornschein J, Malfertheiner P: Hepatocellular carcinoma—epidemiological trends and risk factors. *Dig Dis* 2009;27(2):80-92.
4. Wörns MA, Weinmann A, Schuchmann M, Galle PR: Systemic Therapies in Hepatocellular Carcinoma. *Dig Dis* 2009;27:175-188.
5. Bruix J, Sherman M: Management of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology* 2005;42(5):1208-36.
6. Wörns MA, Galle PR: Future perspectives in hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis* 2010;42Suppl 3:S302-9.
7. Cheung TT, Ng KK, Chok KS, Chan SC, Poon RT, Lo CM, Fan ST: Combined resection and radiofrequency ablation for multifocal hepatocellular carcinoma: prognosis and outcomes. *World J Gastroenterol* 2010, 16(24):3056-62.
8. Giglia JL, Antonia SJ, Berk LB, Bruno S, Dessureault S, Finkelstein SE: Systemic therapy for advanced hepatocellular carcinoma: past, present, and future. *Cancer Control* 2010;17(2):120-9.
9. Johnson PJ: Systemic chemotherapy of liver tumors. *Semin Surg Oncol* 2000;19(2):116-24.
10. Forbes A, Williams R: Chemotherapy and radiotherapy of malignant hepatic tumours. *Baillieres Clin Gastroenterol* 1987;1(1):151-69.
11. Yeo W, Mok TS, Zee B, Leung TW, Lai PB, Lau WY, Koh J, Mo FK, Yu SC, Chan AT, Hui P, Ma B, Lam KC, Ho WM, Wong HT, Tang A, Johnson PJ: A randomized phase III study of doxorubicin versus cisplatin/interferon alpha-2b/doxorubicin/fluorouracil (PIAF) combination chemotherapy for unresectable hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2005;97(20):1532-8.
12. Fabregat I: Dysregulation of apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2009;15(5):513-20.
13. Hussain SP, Schwank J, Staib F, Wang XW, Harris CC: TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer. *Oncogene* 2007;26(15):2166-76.
14. Ma S, Jiao B, Liu X, Yi H, Kong D, Gao L, Zhao G, Yang Y, Liu X: Approach to radiation therapy in hepatocellular carcinoma. *Cancer Treat Rev* 2010;36(2):157-63.
15. Cao Y, Fu YL, Yu M, Yue PB, Ge CH, Xu WX, Zhan YQ, Li CY, Li W, Wang XH, Wang ZD, Li YH, Yang XM: Human augments of liver regeneration is important for hepatoma cell viability and resistance to radiation-induced oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2009;47(7):1057-66.
16. Amann T, Maegdefrau U, Hartmann A, Agaimy A, Marienhagen J, Weiss TS, Stoeltzing O, Warnecke C, Schölmerich J, Oefner PJ, Kreutz M, Bosserhoff AK, Hellerbrand C: GLUT1 expression is increased in hepatocellular carcinoma and promotes tumorigenesis. *Am J Pathol*. 2009 Apr;174(4):1544-52. Epub 2009 Mar 12.
17. Amann T, Hellerbrand C: GLUT1 as a therapeutic target in hepatocellular carcinoma. *Expert Opin Ther Targets*. 2009 Dec;13(12):1411-27.
18. Hao LS, Ni Q, Jia GQ, Wang G, Qian K, Liu YJ, Zhang Y, Wu XT: Expression of glucose transporter 1 in human breast carcinoma and its clinical significance. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2009;40:44-7.
19. Rudłowski C, Becker AJ, Schröder W, Rath W, Büttner R, Moser M: GLUT1 messenger RNA and protein induction relates to the malignant transformation of cervical cancer. *Am J Clin Pathol* 2003;120:691-8.
20. Mineta H, Miura K, Takebayashi S, Misawa K, Araki K, Misawa Y, Ueda Y: Prognostic value of glucose transporter 1 expression in patients with hypopharyngeal carcinoma. *Anticancer Res* 2002;22:3489-94.
21. Evans A, Bates V, Troy H, Hewitt S, Holbeck S, Chung YL, Phillips R, Stubbs M, Griffiths J, Airley R: Glut-1 as a therapeutic target: increased chemoresistance and HIF-1-independent link with cell turnover is revealed through COMPARE analysis and metabolomic studies. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008;61:377-93.



22. Jadvar H, Alavi A, Gambhir SS: 18F-FDG uptake in lung, breast, and colon cancers: molecular biology correlates and disease characterization. *J Nucl Med.* 2009 Nov;50(11):1820-7. Epub 2009 Oct 16.
23. Seufi AM, Ibrahim SS, Elmaghraby TK, Hafez EE: Preventive effect of the flavonoid, quercetin, on hepatic cancer in rats via oxidant/antioxidant activity: molecular and histological evidences. *J Exp Clin Cancer Res.* 2009 Jun 11;28:80.
24. Nomura M, Takahashi T, Nagata N, Tsutsumi K, Kobayashi S, Akiba T, Yokogawa K, Moritani S, Miyamoto K: Inhibitory Mechanisms of Flavonoids on Insulin-Stimulated Glucose Uptake in MC3T3-G2/PA6 Adipose Cells. *Biol. Pharm. Bull.* July 2008. 31(7) 1403-1409.
25. Martin, Hans-Jorg, Kornmann, Frank, Fuhrmann, Gunter Fred: The inhibitory effects of flavonoids and antistrogens on the Glut1 glucose transporter in human erythrocytes; *Chemico-Biological Interactions* 146 (2003): 225-235.
26. Kim YH, Lee DH, Jeong JH, Guo ZS, Lee YJ: Quercetin augments TRAIL-induced apoptotic death: involvement of the ERK signal transduction pathway. *Biochem Pharmacol.*; 75 (10): 1946-1958 (2008).
27. Nöthlings U, Murphy SP, Wilkens LR, Henderson BE, Kolonel LN: Flavonols and Pancreatic Cancer Risk. *Am J Epidemiol.* 2007 Oct 15;166(8):924-31.
28. Casalta-Lopes J, Abrantes AM, Laranjo M, Rio J, Gonçalves AC, Oliveiros B, Sarmiento-Ribeiro AB, Botelho MF: Efflux Pumps Modulation in Colorectal Adenocarcinoma Cell Lines: The Role of Nuclear Medicine. *Journal of Cancer Therapy*, 2011, 2, 408-417
29. Vargas AJ, Sittadjody S, Thangasamy T, Mendoza EE, Limesand KH, Burd R: Exploiting tyrosinase expression and activity in melanocytic tumors: quercetin and the central role of p53. *Integr Cancer Ther.* 2011 Dec;10(4):328-40.
30. Reinhardt HC, Schumacher B: The p53 network: cellular and systemic DNA damage responses in aging and cancer. *Trends Genet.* 2012 Mar;28(3):128-36.
31. Kaino M: Alterations in the tumor suppressor genes p53, RB, p16/MTS1, and p15/MTS2 in human pancreatic cancer and hepatoma cell lines. *J Gastroenterol.* 1997 Feb;32(1):40-6.
32. Vera JC, Reyes AM, Velásquez FV, Rivas CI, Zhang RH, Strobel P, Slebe JC, Núñez-Alarcón J, Golde DW: Direct inhibition of the hexose transporter GLUT1 by tyrosine kinase inhibitors. *Biochemistry.* 2001 Jan 23;40(3):777-90.

Correspondência:
 GUILHERME TRALHÃO
 e-mail: jglrt@hotmail.com

Data de recepção do artigo:
 19-10-2012

Data de aceitação do artigo:
 30-5-2013



Brito AF, Ribeiro M, Abrantes AM, Gonçalves AC, Sarmiento-Ribeiro AB, Tralhão JG, Botelho MF

Positron Emission Tomography Diagnostic Imaging in Multidrug-Resistant Hepatocellular Carcinoma: Focus on 2-Deoxy-2-(18F)Fluoro-d-Glucose

Ana F. Brito, Mónica Mendes, Ana M. Abrantes, José G. Tralhão & Maria F. Botelho

Molecular Diagnosis & Therapy

ISSN 1177-1062

Mol Diagn Ther

DOI 10.1007/s40291-014-0106-3



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer International Publishing Switzerland. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".

Positron Emission Tomography Diagnostic Imaging in Multidrug-Resistant Hepatocellular Carcinoma: Focus on 2-Deoxy-2-(¹⁸F)Fluoro-D-Glucose

Ana F. Brito · Mónica Mendes · Ana M. Abrantes · José G. Tralhão · Maria F. Botelho

© Springer International Publishing Switzerland 2014

Abstract Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most lethal cancers worldwide. Surgical resection and liver transplantation are still the best options for treatment. Nevertheless, as the number of patients who may benefit from these therapies is limited, alternative therapies have been developed, including chemotherapy. However, partly due to the expression of multidrug resistance (MDR) proteins, it has been found that HCC is a highly chemoresistant tumor. The major family of MDR proteins is the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily, which includes P-glycoprotein (Pgp) and MDR-associated protein 1 (MRP1). Positron emission tomography using the radiolabeled analog of glucose, 2-deoxy-2-(¹⁸F)fluoro-

D-glucose ([¹⁸F]FDG), has been used in diagnostic imaging of various types of tumors. Clinical studies are inconsistent but experimental studies have shown that [¹⁸F]FDG uptake is associated with tumor grade and is inversely proportional to Pgp expression in HCC. These studies unveil that [¹⁸F]FDG can be a substrate of Pgp, although that relationship remains unclear. This review sums up the relationship between MDR expression in HCC, and [¹⁸F]FDG uptake by tumor cells, showing that this radiopharmaceutical may provide a useful tool for the study of chemoresistance in HCC, and that the use of this marker may contribute to the therapeutic choice on this highly aggressive tumor.

A. F. Brito and M. Mendes contributed equally to this work.

A. F. Brito (✉) · M. Mendes · A. M. Abrantes · J. G. Tralhão · M. F. Botelho
Biophysics Unit, Faculty of Medicine, University of Coimbra, Pólo III, Pólo das Ciências da Saúde, Azinhaga de Santa Comba, Celas, 3000-548 Coimbra, Portugal
e-mail: anabrito816@gmail.com

A. F. Brito · A. M. Abrantes · J. G. Tralhão · M. F. Botelho
Center of Investigation on Environmental, Genetics and Oncobiology (CIMAGO), Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal

A. F. Brito · A. M. Abrantes · M. F. Botelho
Institute for Biomedical Imaging and Life Sciences, Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal

M. Mendes
Faculty of Sciences and Technology, University of Coimbra, Coimbra, Portugal

J. G. Tralhão
Surgical Department A, CHUC, Coimbra, Portugal

Key Points

Multidrug resistance (MDR) is a major obstacle to chemotherapy success in HCC.

2-deoxy-2-(¹⁸F)fluoro-D-glucose ([¹⁸F]FDG) seems to be an MDR protein substrate, particularly the P-glycoprotein substrate.

The use of [¹⁸F]FDG positron emission tomography seems to be a suitable tool in hepatocellular carcinoma MDR detection.

1 Hepatocellular Carcinoma

Hepatocellular carcinoma (HCC) accounts for 90 % of all primary hepatic malignancies and is one of the main causes

of mortality worldwide. According to GLOBOCAN [1–5], an estimated 749,744 new cases and 695,726 deaths occurred in 2008. Since this cancer is uncovered at the advanced stages, the number of diagnosed cases and deaths is very close, leading to a very high mortality rate. The risk of HCC is two to seven times higher in men than in women, rarely occurring before the age of 40 years and reaching a peak at approximately 70 years of age [1–7].

The leading etiologic factors involved in this cancer differ according to geographical location. In developed countries, the main causes are infection with hepatitis C virus (HCV), and excessive alcohol and tobacco consumption. HCV and alcohol are the foremost causes of hepatic cirrhosis, a disease ordinarily related to the HCC emergence in these countries [8, 9]. In developing countries, the main causes of HCC expansion are infections by hepatitis B virus (HBV), HCV, as well as the consumption of aflatoxin B₁ [2]. Nevertheless, the recent development of effective pre-exposure vaccines against HBV and the post-exposure prophylaxis with hepatitis B immunoglobulin have drastically reduced the incidence of HBV infection, especially in developed countries [10–12].

At an early stage of the disease, the most appropriate treatments are known as potentially healing ones, including surgical resection and liver transplantation [13–15]. However, as most patients are diagnosed at advanced stages, they are not suitable for surgical alternatives, being directed to other types of treatments such as chemotherapy. Nevertheless, as a primary treatment modality for HCC, systemic chemotherapy has a very limited effectiveness and this neoplasm is classified as a highly chemoresistant disease. Systemic chemotherapy has response rates of 0–20 %, partly due to the genetic expression of multidrug resistance (MDR) proteins. Consequently, in HCC, chemotherapy plays a mostly palliative role, controlling the effects of the tumor growth and minimizing the symptoms [6, 14–17].

2 Multidrug Resistance Proteins

Most cancers (including HCC), in addition to surgical resection as a first-line therapy, are treated using chemotherapy, but sometimes these therapies are not successful, perhaps due to changes in drug metabolism, interaction with membrane proteins, intracellular sequestering, modifications in the DNA repair mechanisms, evasion of apoptosis mechanisms, efflux pumps expression, changes in the tumor microenvironment and expression of cancer stem cells [18, 19].

Chemotherapy is an effective method for cancer treatment; however, the ability of tumor cells to overcome their action becoming resistant to different drugs (the so-called

MDR process) represents the major barrier to successful treatments [19]. There are two general forms of resistance to anticancer drugs—one is related to the expression of transmembrane transport proteins, while the other has to do with the genetic and epigenetic changes in tumor cells that affect drug sensitivity [19]. One of the most studied mechanisms, known to have a strong contribution to these two forms of MDR, is the presence of efflux pumps, such as proteins belonging to the ATP-binding cassette (ABC) superfamily. Thus, overexpression of MDR efflux pumps (usually called MDR proteins) is a major obstacle to successful chemotherapy in various cancer types, including HCC [18, 20–25].

ABC's superfamily transporters are the ATP-dependent best-known family transporters. The vast majority of these family members are responsible for the transport of a variety of active compounds through biological membranes. P-glycoprotein (Pgp) was the first ABC transporter to be discovered, and 30 years later, a further 15 ABC transporters have been associated with drug resistance. Table 1 summarizes the principal ABC transporters involved in MDR. MDR-associated protein 1 (MRP1), encoded by the *ABCC1* gene, which enabled the discovery of four other proteins (MRP2, MRP3, MRP4 and MRP5) was the second ABC transporter to be isolated. At the present time, there are many other transporters known to be responsible for active drug resistance to many tumors [26, 27].

As previously mentioned, Pgp was the first ABC drug efflux pump to be identified, so it has been intensively studied for more than 35 years and is the one we know most about. Over the years, various Pgp substrates have been identified, including many clinically used drugs, chemotherapeutic agents, cationic organic compounds, natural products, linear and cyclic peptides, lipid-like compounds, amphiphiles, and fluorescent dyes [28, 29]. While Pgp transports neutral molecules or positively charged molecules, MRP1 overexpression is associated with an increase in active transport (ATP-dependent) of molecules conjugated to glutathione (GSH), which are negatively charged molecules [30–32]. Besides GSH, methotrexate, a monoglutamate, is also an MRP1 substrate and contributes to the resistance phenotype conferred by MRP1 [33]. The classes of anticancer drugs that are substrates for MRP1 include anthracyclines, such as doxorubicin and daunorubicin, vinca alkaloids and etoposide. Pumping these drugs out of tumor cells, the MRP1 protein reduces its intracellular concentration, inducing resistance to treatment. Thus, MRP1 conferred MDR in a similar way to Pgp, with similar transport kinetics [34, 35].

In humans, Pgp is encoded by two MDR genes—MDR1 and MDR3. It is known that MDR is associated to MDR1 [29, 36, 37]. Pgp is naturally expressed in some

Table 1 Principal ABC transporters involved in multidrug resistance: tissue distribution, physiological function and substrates

Common name	Systematic name	Tissue distribution	Non-chemotherapy substrates	Chemotherapy substrates	Physiological function	References
Pgp/MDR1	ABCB1	Intestine, liver, kidney, placenta, blood-brain barrier, plasma membrane, lung, testis, adrenal gland	Neutral and cationic compounds, many commonly used drugs	Doxorubicin, daunorubicin, topotecan, etoposide, paclitaxel, docetaxel, vinblastine, vincristine	Fetus and other sensitive tissue protection; major contribution to ADME (absorption, distribution, metabolism, excretion); transport of endogenous molecules and metabolites	[19, 27, 30, 90]
MDR3	ABCB4	Liver	Phosphatidylcholine and some hydrophobic drugs	Paclitaxel, vinblastine	Export of phosphatidylcholine from the apical membrane of hepatocytes into the bile	[19, 90, 91]
BSEP	ABCB11	Liver	Bile salts	Paclitaxel	Secretion of bile acids from hepatocytes into bile	[19, 90, 92]
ABCB6	ABCB6	Mitochondria	Iron	Arsenite	Iron transport	[33, 93, 94, 95]
MRP1	ABCC1	Ubiquitous	Glutathione and other conjugates, organic anions, leukotriene C4	Doxorubicin, epirubicin, etoposide, vincristine, methotrexate	Ubiquitous glutathione S-conjugates (GS-X) pump; immune responses involving cysteinyl leukotrienes	[19, 27, 34]
MRP2	ABCC2	Liver, kidney, intestine, placenta, gut	Similar to MRP1, non-bile salt organic anions	Methotrexate, etoposide, doxorubicin, cisplatin, vincristine, mitoxantrone	Hepatobiliary extrusion of amphipathic anions (Dubin-Johnson syndrome); barrier in gut and placenta	[19, 27, 34, 35]
MRP3	ABCC3	Pancreas, kidney, intestine, liver, adrenal glands	Glucuronate and glutathione conjugates, bile acids	Etoposide, teniposide, methotrexate, cisplatin, vincristine, doxorubicin	Basolateral back-up system for hepatocytes; protect the liver from cholestasis	[19, 26, 34]
MRP4	ABCC4	Prostate, testis, ovary, intestine, pancreas, lung	Nucleotide analogues, organic anions	Methotrexate, thiopurines, 6-mercaptopurine	Mediates the cellular efflux of several endogenous metabolites; signaling pathways involved in differentiation, pain perception, and inflammation	[19, 26, 34]
MRP5	ABCC5	Ubiquitous	Nucleotide analogues, cyclic nucleotides, organic anions	6-mercaptopurine, 6-thioguanine	Involved in the cellular extrusion of the second messengers, Cyclic guanosine monophosphate (cGMP) and cyclic adenosine monophosphate (cAMP)	[19, 26]
MRP6	ABCC6	Liver, kidney	Anionic cyclic peptide	Etoposide	Elastic tissue homeostasis (pseudoxanthoma elasticum)	[19, 26, 34]
MRP7	ABCC10	Liver, heart, kidney	Glutathione conjugates, lipophilic anions	Docetaxel, paclitaxel, vincristine, vinblastine	Protection against toxicity; mediating the transport of [³ H]estradiol 17- β -D-glucuronide (E217bG)	[26, 30, 34]
MRP8	ABCC11	Liver, brain, placenta, breast, testis	Cyclic nucleotides, lipophilic anions, glutathione conjugates	5-Fluorouracil, zalcitabine, para-Methoxyethylamphetamine (PMEA)	Involved in cerumen (earwax) secretion by the ceruminous apocrine glands	[26, 34]

Table 1 continued

Common name	Systematic name	Tissue distribution	Non-chemotherapy substrates	Chemotherapy substrates	Physiological function	References
BCRP	ABCG2	Placenta, intestine, breast, liver, stem cells, kidney, cardiac muscle	Prazosin	Doxorubicin, daunorubicin, mitoxantrone, methotrexate, topotecan, SN-38, NB-506, Edotecarin (J-107088), flavopiridol	Protection of the fetus; hepatobiliary excretion; SP-phenotype against hypoxia; reduction of drug absorption; urinary excretion	[19, 27, 96]
ABCA2	ABCA2	Brain, monocytes, kidney, lung, heart	Steroid derivatives, lipids	Estramustine	Intracellular steroid transport; trafficking of low-density lipoprotein	[19, 33, 93, 97]

normal human tissues, being its physiological function deduced from the tissue distribution [37–39]. In many types of cancers, Pgp overexpression (or MDR1 gene overexpression) is often found in the diagnosis of malignancy. Colon, kidney, liver, and adrenal tumors, among others, show high MDR1 gene expression. Such tumors are closely associated with chemoresistance, such as HCC [23, 40]. Investigation of certain tumor cell differentiation patterns shows that some cases of MDR overexpression might be correlated with some types of cell variation spread, in which Pgp overexpression is quite evident, although this sort of tumor is usually originated in cells with a low expression of this protein. In other words, what happens in such cases is that cells become resistant, thus developing a higher Pgp expression, meaning, in many cases, that Pgp is a marker for a certain type of cellular differentiation [27, 31]. An increasing Pgp expression after cancer treatment is often used to show the role of MDR in treatment failure. Studies in different types of cancers, such as acute myeloid leukemia and HCC [31, 41], show the influence of Pgp protein in resistance to drugs. Immunohistochemical studies attest that 40–80 % of HCC tumors exhibit increased Pgp expression and the response to chemotherapy in this type of tumor is inversely related to this expression [40–44]. A few years ago, Shen et al. [23] tested five human HCC cell lines resistant to a variety of anticancer drugs and, although the results indicate that Pgp expression could not be the main cause of MDR in this type of tumor, they confirmed the important role of this protein in the resistance of HCC cells. Grudé et al. [45] also checked the key role of Pgp in HCC MDR. They verified Pgp overexpression in 85 % of primary liver tumors. Their results show that Pgp expression was higher in HCC than in peritumoral liver tissue and higher in peritumoral cirrhotic liver tissue than in normal tissue. In the cases of cirrhotic liver without HCC, they deduced that Pgp overexpression precedes the development of the tumoral process. Bonin et al. [46] also demonstrated that the expression of some ABC proteins, including Pgp, is increased in HCC, emphasizing its importance in HCC diagnosis and treatment. More recently, in 2010, Sun et al. [47] demonstrated the significance of Pgp overexpression in HCC development. The work carried out showed there is a positive correlation between Pgp messenger RNA (mRNA) and protein expression, indicating an easy prediction of HCC MDR that can make the inhibition of a target of drug resistance possible. In a 2011 article, Huang et al. [48] proved that targeted arterial infusion of verapamil (the earliest known modulator of MDR that reverses MDR by Pgp competitive inhibition) can reverse the MDR in tumor cells in HCC patients and increase the chemotherapy effectiveness. Besides these authors, many

others have been studying the role of Pgp in HCC MDR, confirming the correlation between Pgp expression and MDR in HCC [49, 50]. Wang et al. [50], for example, analyzed whether Pgp and other efflux pumps such as MRP and lung resistance protein (LRP) could affect tumor accumulation and efflux of [^{99m}Tc]-MIBI in liver cancer. In this study they showed that Pgp acts as an efflux pump that extrudes [^{99m}Tc]-MIBI and other drugs from cells and that Pgp expression and enhanced efflux of [^{99m}Tc]-MIBI from these cells are closely connected.

Clinical significance of Pgp has attracted the attention of many researchers and pharmaceutical companies that have tried to produce compounds to inhibit this transporter and consequently reverse the chemoresistance. Some of these compounds, such as verapamil, competitively inhibit Pgp, competing with the substrate for binding and transport. However, these substances were not clinically successful, especially due to the fact that MDR is not only associated with Pgp but is also involved in a complex network of cellular mechanisms [31, 51, 52].

The MRP proteins subfamily is formed by nine proteins, MRP1 included [30–32]. Like Pgp and other ABC transporters, ATP hydrolysis provides the required energy for transportation through MRP1 [34, 35, 52, 53].

A review by Leslie et al. [27] about the role of some ABC proteins in MDR, mentions that although MRP1 is expressed at very low levels in healthy human liver, its expression is induced during severe human liver diseases. Other authors, such as Bonin et al. [46] and Ros et al. [54], have also supported this theory. Bonin et al. [46] showed that MRP1 is significantly and similarly overexpressed in HCC and perineoplastic tissue. In their study, they claim that ABC's protein expression pattern, MRP1 included, may provide important knowledge for the diagnosis and treatment of HCC. According to Vander Borghet et al. [25], MRP1 expression in HCC is associated with a more aggressive tumor phenotype and may reflect a progenitor cell origin, thus showing the role of this protein in HCC and tumor. Wang et al. [55], studying the significance of the MRP1 gene in HCC in 2003, proved the intrinsic relationship with MDR. The MRP1 gene is very important for the prognosis of HCC due to the relationship between the expression of this protein and tumor differentiation and the median survival time of patients.

3 Cancer Imaging and 2-Deoxy-2-(¹⁸F)Fluoro-D-Glucose (¹⁸F]FDG)

Cancer cells are characterized, in general, by a decrease of mitochondrial respiration and oxidative phosphorylation, accompanied by a strong enhancement of glycolysis. This effect is known as the *Warburg Effect* and was first

reported by Otto Warburg [56]. Unlike normal cells that produce energy mostly through the pyruvate oxidation in the mitochondria, cancer cells predominantly produce energy via enhanced glycolysis in the cytosol, even under aerobic conditions. Most cancer cells use glycolysis as a means of energy production regardless of whether they are under normoxic or hypoxic condition. It was originally hypothesized that these metabolic changes reflect damages on mitochondrial oxidative phosphorylation, implying that cancer cells could not respire properly to obtain sufficient ATP [57, 58].

The *Warburg Effect* has been shown in different types of tumors, including HCC [59–62]. However, although aerobic glycolysis is accepted as a mark for cancer metabolism, its relation to tumor progression is still unclear [63]. The glucose uptake increased in tumors is typically associated with a higher expression of glucose transporters (GLUTs), as well as to an expression increase in certain intracellular enzymes, such as hexokinase II, which promotes glycolysis [64].

Positron emission tomography (PET) using 2-deoxy-2-(¹⁸F)fluoro-D-glucose (¹⁸F]FDG) is the most widely method used to study the glucose metabolism of tumor cells in vivo [65]. [¹⁸F]FDG is a radiolabeled glucose analog in which the positron emitter radioactive isotope ¹⁸F replaces the hydroxyl group at the C2 position in the glucose molecule. Similar to glucose, [¹⁸F]FDG is transported across the cell membrane by sodium-independent facilitative GLUTs. Thirteen members of the mammalian facilitative GLUTs family have been identified, and its expression seems to be increased in the majority of cancer cells. Regarding [¹⁸F]FDG, in malignant tumors GLUT1 and GLUT3, and more recently GLUT12, have been associated with the entrance of this radiopharmaceutical in cancer cells, such as HCC [66–68]. In intracellular terms, [¹⁸F]FDG is phosphorylated by hexokinase II to [¹⁸F]FDG-6-phosphate, an identical process to what happens with glucose. However, in contrast to glucose, due to the fluorine atom in position C2, which prevents degradation, [¹⁸F]FDG-6-phosphate is not metabolized in the glycolytic pathway. Since the membrane is impermeable to the phosphorylated [¹⁸F]FDG, the [¹⁸F]FDG-6-phosphate gathers in the metabolically active cells, such as tumor cells [66, 68, 69]. Studies point to a variety of levels of glucose-6-phosphatase activity and GLUTs in HCC, leading to variable [¹⁸F]FDG uptake [69–73]. Amann et al. [70, 71] exposed increased GLUT1 and GLUT3 expression in HCC, suggesting that this contributed to the proliferation and invasiveness of HCC cells. Regarding the use of PET using [¹⁸F]FDG for primary liver tumors, it is known the liver is the major producer of non-dietary glucose, which helps to maintain glucose homeostasis [69]. To authors such as Salem et al. [72] and Sacks et al. [73], although the

sensitivity of [^{18}F]FDG PET has been indicated to be smaller than other imaging methods for HCC diagnosis, it still plays an important role in prognosis, giving insight into the histopathologic nature of the tumor and helping to establish the best treatment plan. Khan et al. [74] also showed that [^{18}F]FDG uptake by HCC is correlated with the level of tumor differentiation. In their study, PET tumor activity level was assessed on a scale of 1–4 compared with normal liver tissue. The PET score (positive or negative PET scans) was compared with abdominal CT scan results and between tumors of different grades and differentiation. They found that well-differentiated tumors have less activity on [^{18}F]FDG PET and correspondingly lower PET scores when comparing with less-differentiated tumors. Consequently, [^{18}F]FDG PET has been considered suitable for HCC diagnosis as well as an aide in CT, mostly in less-differentiated tumors [74]. Lee et al. [75] also confirmed these propositions, stating that well-differentiated HCC cells exhibit an [^{18}F]FDG metabolism similar to that of a standard liver tissue, whereas undifferentiated HCC cells do not. Wolfort et al. [76] showed that [^{18}F]FDG PET seems to be an accurate method for HCC staging, although research in this area is still required.

On the other hand, [^{18}F]FDG PET, combined with computed tomography (CT), may also be useful in the establishment of HCC as a complementary modality to detect local and disseminated metastases, such as lung and bone metastases [69, 74].

4 Multidrug Resistance and [^{18}F]FDG

We have previously discussed the mechanisms leading certain tumors, including HCC, to be chemoresistant. These mechanisms include, among others, overexpression of transport proteins (efflux pumps) which expel anticancer drugs out of cells. Studies show that MDR or, more specifically, ABC transporters activity, can be quantified by image techniques using radiopharmaceuticals, themselves MDR inhibitors or substrates. [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]-MIBI was the first radiotracer known as Pgp substrate. It is also a substrate for MRP1, MRP2 and BCRP and can be used to image their expression in vivo [18, 77]. Some other studies indicated that [^{18}F]FDG can be a substrate of MDR proteins, such as Pgp. Thus, there is a possibility for [^{18}F]FDG PET also being an imaging method for MDR evaluation. It was found that Pgp expression is closely related to the amount of [^{18}F]FDG stored within the cells, indicating that there is an inverse correlation between accumulation of radiopharmaceutical and Pgp levels in cells of different types of tumors [78, 79]. Studies carried out in patients with non-treated lung cancer [75], intrahepatic cholangiocarcinoma [79], and HCC [80] also determined Pgp expression

through immunohistochemical analysis, as negatively correlated with [^{18}F]FDG accumulation.

Studies in vitro have also shown that cells which present an increased MDR expression exhibit a lower [^{18}F]FDG accumulation than cells that do not [81–84]. Lorke et al. [81] found that [^{18}F]FDG incorporation in resistant HT-29 colon carcinoma cells, either in vitro or in severe combined immunodeficiency mice subjected to xenografts was lower when compared with its incorporation in HT-29 sensitive cells. It was also observed that when cells were incubated with Pgp inhibitors, an increase of [^{18}F]FDG accumulation was verified, suggesting that the [^{18}F]FDG is a Pgp substrate. Therefore, [^{18}F]FDG efflux, via Pgp, is responsible for a decrease in the accumulation of this radiotracer in resistant cells. Yamada et al. [83] have also proven that through treatment with Pgp inhibitors in SK 24-MEL-resistant melanoma cell lines the [^{18}F]FDG intracellular levels increase, suggesting that [^{18}F]FDG can be a substrate of this efflux pump.

On the other hand, Pgp is an efflux pump dependent on adenosine triphosphate, which brings a higher energy demand to chemoresistant cells. In addition, MDR is associated with a higher rate of glycolysis [83, 84]. Therefore, it seems possible that [^{18}F]FDG accumulation can be reduced due to changes in glucose transport in resistant tumor cells. Studies also show that the GLUT1 expression is smaller in cells with higher Pgp levels. This result can also lead to a decreased [^{18}F]FDG uptake visible on PET images [81, 82].

Regarding the connection of other MDR proteins with [^{18}F]FDG efflux, little is known. In 2005, Yamada et al. [83] studied the retention of [^{18}F]FDG in two melanoma cell lines, the SK-MEL 23 and the SK-MEL 24. In the same study, the authors found that the cell line of SK-MEL 23 expresses more MRP1 than the SK-MEL 24 line. The same work also used an MRP1 inhibitor, probenecid, having found that the [^{18}F]FDG efflux in SK-MEL 23 cells was significantly reduced in a dose-dependent manner, resulting in an improved retention of [^{18}F]FDG. Although treatment with probenecid has also increased [^{18}F]FDG retention by the SK-MEL 24 cell line, this effect was much less evident, suggesting that [^{18}F]FDG is an MRP1 substrate.

As said before, immunohistochemical studies indicated that 40–80 % of HCC tumors exhibit increased Pgp expression, being the response to chemotherapy inversely related to this same expression [41–44].

In 2009, Seo et al. [84], when comparing the incorporation of [^{18}F]FDG in PLC/PRF/5 HCC cells and in PLC/DOR cells resistant to doxorubicin, found out that [^{18}F]FDG accumulation was lower in doxorubicin-resistant cells because of their higher expression of Pgp. Treatments with Pgp competitive inhibitors (verapamil and

cefarantine) restored [¹⁸F]FDG uptake in PLC/DOR cells, but not in PLC/PRF/5 cells. Seo et al. [80] have performed another study which shows that [¹⁸F]FDG accumulation in HCC cells is also related to tumor differentiation degree. Thus, the [¹⁸F]FDG PET technique does not detect well-differentiated HCCs but is useful for low-differentiated degrees and can be used as an indicator of the degree of HCC differentiation, and also as a good predictor of Pgp expression. However, there are no published data that establish a link between the expression of other MDR proteins and [¹⁸F]FDG efflux in HCC. Nevertheless, as mentioned above, and similarly to what happens in melanoma, this type of tumor often presents higher MRP1 expression levels, which increases the importance of studying the involvement of this transporter on [¹⁸F]FDG efflux in HCC [27, 46, 55, 60].

There are other studies showing the use of [¹⁸F]FDG to evaluate the expression of Pgp. Krasznai et al. [85] raised the possibility of a new strategy for an in vivo detection of Pgp activity through PET imaging technique. They combined a treatment with the UIC2 antibody and Pgp modulators which can completely block the function of Pgp in human ovarian carcinoma cells and can be followed in vitro by using tumor-diagnostic radiotracers, [^{99m}Tc]-MIBI, and [¹⁸F]FDG.

Although this review focuses particularly on the relationship between Pgp and MRP1 overexpression in HCC and on the role of [¹⁸F]FDG in the study of MDR mechanisms, other authors have shown that this correlation is complicated to define. Thus, further research is needed in this area since there are other transporters which contribute to the ATP demand of cells that should be investigated in parallel [86–88]. The results obtained by Shen et al. [88] indicated that the MDR phenotype in human HCC cells cannot be attributed to expression of the MDR1 gene, but there are other mechanisms that may account for the resistance of these cancer cells. Also, Chang et al. [87] showed that [^{99m}Tc]-MIBI is a Pgp substrate and that it is more related to Pgp than MRP. However, they emphasize the fact that it is possible that other membrane transporters are involved in the efflux of radiotracers, confirming the importance of performing more studies in order to understand a better way to evaluate the transport through MDR proteins in cancer cells. Mórián et al. [89] explored whether [^{99m}Tc]-MIBI and [¹⁸F]FDG can be used for in vivo visualization of Pgp-related MDR, and examined the effects of different Pgp modulators (verapamil and cyclosporin A) on the accumulation of these radioligands in tumors with or without Pgp expression. They showed that parallel administration of [^{99m}Tc]-MIBI or [¹⁸F]FDG combined with verapamil treatment seems to be a good candidate as a non-invasive marker for the diagnosis of MDR-related Pgp expression in tumors. Thus, this study

indicates that the use of [¹⁸F]FDG can provide some information about MDR, but only when conjugated with other molecules, which produces some controversy.

5 Conclusion

The use of [¹⁸F]FDG PET seems to be a suitable tool in MDR detection in vivo and subsequent therapy. Therefore, although this technique for the diagnosis of HCC is controversial, in some cases, such as in MDR detection, it appears to be of great value. However, more studies are required to clarify the role of MDR proteins in the kinetics of [¹⁸F]FDG in tumor cells.

Acknowledgments and Disclosures Ana F. Brito would like to thank the Portuguese Foundation for Science and Technology for the award of a PhD scholarship (SFRH/BD/61378/2009).

Ana F. Brito, Mónica Mendes, Ana M. Abrantes, José G. Tralhão and Maria F. Botelho have no conflicts of interest that are directly relevant to the content of this article.

References

- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011;61(2):69–90. doi:10.3322/caac.20107.
- Skelton M, O'Neil B. Targeted therapies for hepatocellular carcinoma. *Clin Adv Hematol Oncol.* 2008;6(3):209–18.
- Brito AF, Abrantes AM, Pinto-Costa C, Gomes AR, Mamede AC, Casalta-Lopes J, et al. Hepatocellular carcinoma and chemotherapy: the role of p53. *Chemotherapy.* 2012;58(5):381–6. doi:10.1159/000343656.
- Ferlay J, Parkin D, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer.* 2010;46(4):765–81. doi:10.1016/j.ejca.2009.12.014.
- GLOBOCAN: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx. Accessed 3 Oct 2013.
- Yang JD, Roberts LR. Hepatocellular carcinoma: a global view. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2010;7(8):448–58. doi:10.1038/nrgastro.2010.100.
- El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology.* 2007;132(7):2557–76.
- Okuda K. Hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2000;32(1 Suppl): 225–37.
- Alves RC, Alves D, Guz B, Matos C, Viana M, Harriz M, et al. Advanced hepatocellular carcinoma: review of targeted molecular drugs. *Ann Hepatol.* 2011;10(1):21–7.
- Ni YH, Chang MH, Huang LM, Chen HL, Hsu HY, Chiu TY, et al. Hepatitis B virus infection in children and adolescents in a hyperendemic area: 15 years after mass hepatitis B vaccination. *Ann Intern Med.* 2001;135(9):796–800.
- Harpaz R, McMahon BJ, Margolis HS, Shapiro CN, Havron D, Carpenter G, et al. Elimination of new chronic hepatitis B virus infections: results of the Alaska Immunization Program. *J Infect Dis.* 2000;181(2):413–8.
- Wang XW, Hussain SP, Huo TI, Wu CG, Forgues M, Hofseth LJ, et al. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Toxicology.* 2002;181–182:43–7.

13. Gomaa AI, Khan SA, Leen EL, Waked I, Taylor-Robinson SD. Diagnosis of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2009;15(11):1301–14.
14. El-Serag HB, Marrero JA, Rudolph L, Reddy KR. Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2008;134(6):1752–63. doi:10.1053/j.gastro.2008.02.090.
15. Kuczynski EA, Sargent DJ, Grothey A, Kerbel RS. Drug rechallenge and treatment beyond progression: implications for drug resistance. *Nat Rev Clin Oncol*. 2013;10(10):571–87. doi:10.1038/nrclinonc.2013.158.
16. Mazzanti R, Gramantieri L, Bolondi L. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and clinical aspects. *Mol Aspects Med*. 2008;29(1–2):130–43.
17. Cabrera R, Nelson DR. Review article: the management of hepatocellular carcinoma. *Aliment Pharmacol Ther*. 2010;31(4):461–76. doi:10.1111/j.1365-2036.2009.04200.x.
18. Casalta-Lopes J, Abrantes AM, Laranjo M, Rio J, Gonçalves AC, Oliveiros B, et al. Efflux pumps modulation in colorectal adenocarcinoma cell lines: the role of nuclear medicine. *J Cancer Ther*. 2011;02(03):408–17. doi:10.4236/jct.2011.23056.
19. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(1):48–58.
20. Gillet JP, Gottesman MM. Mechanisms of multidrug resistance in cancer. *Methods Mol Biol*. 2010;596:47–76. doi:10.1007/978-1-60761-416-6_4.
21. Izquierdo MA, Scheffer GL, Schroeijers AB, de Jong MC, Scheper RJ. Vault-related resistance to anticancer drugs determined by the expression of the major vault protein LRP. *Cyto-technology*. 1998;27(1–3):137–48. doi:10.1023/A:1008004502861.
22. Saraswathy M, Gong S. Different strategies to overcome multidrug resistance in cancer. *Biotechnol Adv*. 2013;31(8):1397–407. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.06.004.
23. Shen DW, Lu YG, Chin KV, Pastan I, Gottesman MM. Human hepatocellular carcinoma cell lines exhibit multidrug resistance unrelated to MRD1 gene expression. *J Cell Sci*. 1991;98(Pt 3):317–22.
24. Krishnakumar S, Mallikarjuna K, Desai N, Muthialu A, Venkatesan N, Sundaram A, et al. Multidrug resistant proteins: P-glycoprotein and lung resistance protein expression in retinoblastoma. *Br J Ophthalmol*. 2004;88(12):1521–6.
25. Vander Borgh S, Komuta M, Libbrecht L, Katoonizadeh A, Aerts R, Dymarkowski S, et al. Expression of multidrug resistance-associated protein 1 in hepatocellular carcinoma is associated with a more aggressive tumour phenotype and may reflect a progenitor cell origin. *Liver Int*. 2008;28(10):1370–80. doi:10.1111/j.1478-3231.2008.01889.x.
26. Chen ZS, Tiwari AK. Multidrug resistance proteins (MRPs/ABCCs) in cancer chemotherapy and genetic diseases. *FEBS J*. 2011;278(18):3226–45. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08235.x.
27. Leslie EM, Deeley RG, Cole SP. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005;204(3):216–37.
28. Sharom F. Complex interplay between the P-glycoprotein multidrug efflux pump and the membrane: its role in modulating protein function. *Front Oncol*. 2013;4(41):1–19. doi:10.3389/fonc.2014.00041.
29. Ambudkar SV, Kimchi-Sarfaty C, Sauna ZE, Gottesman MM. P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene*. 2003;22(47):7468–85.
30. Teodori E, Dei S, Scapecchi S, Gualtieri F. The medicinal chemistry of multidrug resistance (MDR) reversing drugs. *Farmacol*. 2002;57(5):385–415.
31. Stavrovskaya AA. Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells. *Biochemistry (Mosc)*. 2000;65(1):95–106.
32. Borst P, Elferink RO. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem*. 2002;71:537–92.
33. Kruh GD, Belinsky MG. The MRP family of drug efflux pumps. *Oncogene*. 2003;22(47):7537–52.
34. Borst P, Evers R, Koel M, Wijnholds J. The multidrug resistance protein family. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1461(2):347–57.
35. Hipfner DR, Deeley RG, Cole SP. Structural, mechanistic and clinical aspects of MRP1. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1461(2):359–76.
36. Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta*. 1976;455(1):152–62.
37. Hennessy M, Spiers JP. A primer on the mechanics of P-glycoprotein the multidrug transporter. *Pharmacol Res*. 2007;55(1):1–15.
38. Gottesman MM, Pastan I, Ambudkar SV. P-glycoprotein and multidrug resistance. *Curr Opin Genet Dev*. 1996;6(5):610–7.
39. Lehne G. P-glycoprotein as a drug target in the treatment of multidrug resistant cancer. *Curr Drug Targets*. 2000;1(1):85–99.
40. Chen YB, Yan ML, Gong JP, Xia RP, Liu LX, Li N, et al. Establishment of hepatocellular carcinoma multidrug resistant monoclonal cell line HepG2/mdr1. *Chin Med J (Engl)*. 2007;120(8):703–7.
41. Ng IO, Liu CL, Fan ST, Ng M. Expression of P-glycoprotein in hepatocellular carcinoma. A determinant of chemotherapy response. *Am J Clin Pathol*. 2000;113(3):355–63.
42. Isshiki K, Nakao A, Ito M, Hamaguchi M, Takagi H. P-glycoprotein expression in hepatocellular carcinoma. *J Surg Oncol*. 1993;52(1):21–5.
43. Soini Y, Virkajarvi N, Raunio H, Pääkkö P. Expression of P-glycoprotein in hepatocellular carcinoma: a potential marker of prognosis. *J Clin Pathol*. 1996;49(6):470–3.
44. Chou YY, Cheng AL, Hsu HC. Expression of P-glycoprotein and p53 in advanced hepatocellular carcinoma treated by single agent chemotherapy: clinical correlation. *J Gastroenterol Hepatol*. 1997;12(8):569–75.
45. Grudé P, Conti F, Menecier D, Louvel A, Houssin D, Weill B, et al. MDR1 gene expression in hepatocellular carcinoma and the peritumoral liver of patients with and without cirrhosis. *Cancer Lett*. 2002;186(1):107–13.
46. Bonin S, Pascolo L, Crocè LS, Stanta G, Tiribelli C. Gene expression of ABC proteins in hepatocellular carcinoma, perineoplastic tissue, and liver diseases. *Mol Med*. 2002;8(6):318–25.
47. Sun Z, Zhao Z, Li G, Dong S, Huang Z, Ye L, et al. Relevance of two genes in the multidrug resistance of hepatocellular carcinoma: in vivo and clinical studies. *Tumori*. 2010;96(1):90–6.
48. Huang J, Duan Q, Fan P, Ji C, Lv Y, Lin X, et al. Clinical evaluation of targeted arterial infusion of verapamil in the interventional chemotherapy of primary hepatocellular carcinoma. *Cell Biochem Biophys*. 2011;59(2):127–32. doi:10.1007/s12013-010-9125-9.
49. Tada K, Iwai M, Ishii Y, Kitagawa Y, Kashiwadani M, Nakashima T, et al. P-glycoprotein expression in hepatocellular carcinoma—from the view of histological differentiation and chemotherapy. *Int Hepatol Commun*. 1995;3:158.
50. Wang H, Chen XP, Qiu FZ. Correlation of expression of multidrug resistance protein and messenger RNA with ^{99m}Tc-methoxyisobutyl isonitrile (MIBI) imaging in patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2004;10(9):1281–5.
51. Palmeira A, Sousa E, Vasconcelos MH, Pinto MM. Three decades of P-gp inhibitors: skimming through several generations and scaffolds. *Curr Med Chem*. 2012;19(13):1946–2025.
52. Szakács G, Homolya L, Sarkadi B, Váradi A. MDR-ABC transporters. *Encyclopedia of Molecular Pharmacology*;2008: p. 748–52.

53. Zahreddine H, Borden KL. Mechanisms and insights into drug resistance in cancer. *Front Pharmacol.* 2013;4:28. doi:10.3389/fphar.2013.00028.
54. Ros JE, Libbrecht L, Geuken M, Jansen PL, Roskams TA. High expression of MDR1, MRP1, and MRP3 in the hepatic progenitor cell compartment and hepatocytes in severe human liver disease. *J Pathol.* 2003;200(5):553–60.
55. Wang BL, Chen XP, Zhai SP, Chen DF. Clinical significance of mrp gene in primary hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2003;2(3):397–403.
56. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science.* 1956;123:309–14.
57. Gasparre G, Porcelli AM, Lenaz G, Romeo G. Relevance of mitochondrial genetics and metabolism in cancer development. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(2). doi:10.1101/cshperspect.a011411.
58. Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A, Saavedra E. Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J.* 2007;274:1393–418.
59. Icard P, Lincet H. A global view of the biochemical pathways involved in the regulation of the metabolism of cancer cells. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1826(2):423–33. doi:10.1016/j.bbcan.2012.07.001.
60. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science.* 2009;324(5930):1029–33. doi:10.1126/science.1160809.
61. Soga T. Cancer metabolism: key players in metabolic reprogramming. *Cancer Sci.* 2013;104(3):275–81. doi:10.1111/cas.12085.
62. Wu W, Zhao S. Metabolic changes in cancer: beyond the Warburg effect. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2013;45(1):18–26. doi:10.1093/abbs/gms104.
63. Hsu PP, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell.* 2008;134(5):703–7. doi:10.1016/j.cell.2008.08.021.
64. Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer.* 2004;4(11):891–9.
65. Lopci E, Fanti S. Molecular imaging in oncology. *Recent Results Cancer Res.* 2013;187:371–400. doi:10.1007/978-3-642-10853-2_13.
66. Plathow C, Weber WA. Tumor cell metabolism imaging. *J Nucl Med.* 2008;49(Suppl 2):43S–63S. doi:10.2967/jnumed.107.045930.
67. Jadvar H, Alavi A, Gambhir SS. ¹⁸F-FDG uptake in lung, breast, and colon cancers: molecular biology correlates and disease characterization. *J Nucl Med.* 2009;50(11):1820–7. doi:10.2967/jnumed.108.054098.
68. De Gaetano AM, Rufini V, Castaldi P, Gatto AM, Filograna L, Giordano A, et al. Clinical applications of (18)F-FDG PET in the management of hepatobiliary and pancreatic tumors. *Abdom Imaging.* 2012;37(6):983–1003. doi:10.1007/s00261-012-9845-y.
69. Raddatz D, Ramadori G. Carbohydrate metabolism and the liver: actual aspects from physiology and disease. *Z Gastroenterol.* 2007;45(1):51–62.
70. Amann T, Maegdefrau U, Hartmann A, Stoeltzing O, Weiss TS, Warnecke C, et al. GLUT1 and GLUT3 expression are increased in hepatocellular carcinoma and promote tumorigenesis. *Z Gastroenterol.* 2009;47:p3_01. doi:10.1055/s-0029-1191858.
71. Amann T, Hellerbrand C. GLUT1 as therapeutic target in hepatocellular carcinoma. *Expert Opin Ther Targets.* 2009;13(12):1411–27. doi:10.1517/14728220903307509.
72. Salem N, MacLennan GT, Kuang Y, Anderson PW, Schomisch SJ, Tochkov IA, et al. Quantitative evaluation of 2-deoxy-2-[¹⁸F]fluoro-D-glucose-positron emission tomography imaging on the woodchuck model of hepatocellular carcinoma with histological correlation. *Mol Imaging Biol.* 2007;9(3):135–43.
73. Sacks A, Peller PJ, Surasi DS, Chatburn L, Mercier G, Subramaniam RM. Value of PET/CT in the management of primary hepatobiliary tumors, part 2. *AJR Am J Roentgenol.* 2011;197(2):W260–5. doi:10.2214/AJR.11.6995.
74. Khan MA, Combs CS, Brunt EM, Lowe VJ, Wolverson MK, Solomon H, et al. Positron emission tomography scanning in the evaluation of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2000;32(5):792–7.
75. Lee JE, Jang JY, Jeong SW, Lee SH, Kim SG, Cha SW, et al. Diagnostic value for extrahepatic metastases of hepatocellular carcinoma in positron emission tomography/computed tomography scan. *World J Gastroenterol.* 2012;18(23):2979–87. doi:10.3748/wjg.v18.i23.2979.
76. Wolfort RM, Papillion PW, Turnage RH, Lillien DL, Ramaswamy MR, Zibari GB. Role of FDG-PET in the evaluation and staging of hepatocellular carcinoma with comparison of tumor size, AFP level, and histologic grade. *Int Surg.* 2010;95(1):67–75.
77. Dizdarevic S, Peters AM. Imaging of multidrug resistance in cancer. *Cancer Imaging.* 2011;11:1–8. doi:10.1102/1470-7330.2011.0001.
78. Higashi K, Ueda Y, Ikeda R, Kodama Y, Guo J, Matsunari I, et al. P-glycoprotein expression is associated with FDG uptake and cell differentiation in patients with untreated lung cancer. *Nucl Med Commun.* 2004;25(1):19–27.
79. Seo S, Hatano E, Higashi T, Nakajima A, Nakamoto Y, Tada M, et al. Fluorine-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography predicts lymph node metastasis, P-glycoprotein expression, and recurrence after resection in mass-forming intrahepatic cholangiocarcinoma. *Surgery.* 2008;143(6):769–77. doi:10.1016/j.surg.2008.01.010.
80. Seo S, Hatano E, Higashi T, Hara T, Tada M, Tamaki N, et al. Fluorine-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography predicts tumor differentiation, P-glycoprotein expression, and outcome after resection in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2007;13(2 Pt 1):427–33.
81. Lorke DE, Krüger M, Buchert R, Bohuslavizki KH, Clausen M, Schumacher U. In vitro and in vivo tracer characteristics of an established multidrug-resistant human colon cancer cell line. *J Nucl Med.* 2001;42(4):646–54.
82. Bentley J, Quinn DM, Pitman RS, Warr JR, Kellett GL. The human KB multidrug-resistant cell line KB-C1 is hypersensitive to inhibitors of glycosylation. *Cancer Lett.* 1997;115(2):221–7.
83. Yamada K, Brink I, Engelhardt R. Factors influencing [¹⁸F] 2-fluoro-2-deoxy-D-glucose (F-18 FDG) accumulation in melanoma cells: is FDG a substrate of multidrug resistance (MDR)? *J Dermatol.* 2005;32(5):335–45.
84. Seo S, Hatano E, Higashi T, Nakajima A, Nakamoto Y, Tada M, et al. P-glycoprotein expression affects 18 F-fluorodeoxyglucose accumulation in hepatocellular carcinoma in vivo and in vitro. *Int J Oncol.* 2009;34(5):1303–12.
85. Krasznai ZT, Tóth A, Mikecz P, Fodor Z, Szabó G, Galuska L, et al. Pgp inhibition by UIC2 antibody can be followed in vitro by using tumor-diagnostic radiotracers, ^{99m}Tc-MIBI and ¹⁸FDG. *Eur J Pharm Sci.* 2010;41(5):665–9. doi:10.1016/j.ejps.2010.09.009.
86. Kannan P, John C, Zoghbi SS, Halldin C, Gottesman MM, Innis RB, et al. Imaging the function of P-glycoprotein with radiotracers: pharmacokinetics and in vivo applications. *Clin Pharmacol Ther.* 2009;86(4):368–77. doi:10.1038/clpt.2009.138.
87. Chang CS, Huang WT, Yang SS, Yeh HZ, Kao CH, Chen GH. Effect of P-glycoprotein and multidrug resistance associated protein gene expression on Tc-99m MIBI imaging in hepatocellular carcinoma. *Nucl Med Biol.* 2003;30(2):111–7.
88. Shen DW, Lu YG, Chin KV, Pastan I, Gottesman MM. Human hepatocellular carcinoma cell lines exhibit multidrug resistance

- unrelated to MRD1 gene expression. *J Cell Sci.* 1991;98(3): 317–22.
89. Márián T, Szabó G, Goda K, Nagy H, Szincsák N, Juhász I, et al. In vivo and in vitro multitracer analyses of P-glycoprotein expression-related multidrug resistance. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2003;30(8):1147–54.
90. Sharom FJ. The P-glycoprotein multidrug transporter. *Essays Biochem.* 2011;50(1):161–78. doi:10.1042/bse0500161.
91. Elferink RP, Paulusma CC. Function and pathophysiological importance of ABCB4 (MDR3 P-glycoprotein). *Pflugers Arch.* 2007;453(5):601–10.
92. Kubitz R, Dröge C, Stindt J, Weissenberger K, Häussinger D. The bile salt export pump (BSEP) in health and disease. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2012;36(6):536–53. doi:10.1016/j.clinre.2012.06.006.
93. Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res.* 2001;11(7): 1156–66.
94. Paterson J, Shukla S, Black C, Tachiwada T, Garfield S, Win-covitch S, et al. Human ABCB6 localizes to both the outer mitochondrial membrane and the plasma membrane. *Biochem-istry.* 2007;46:9443–52.
95. Chavan H, Oruganti M, Krishnamurthy P. The ATP-binding cassette transporter ABCB6 is induced by arsenic and protects against arsenic cytotoxicity. *Toxicol Sci.* 2011;120(2):519–28. doi:10.1093/toxsci/kfr008.
96. Staud F, Pavek P. Breast cancer resistance protein (BCRP/ ABCG2). *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37(4):720–5.
97. Mack J, Townsend D, Beljanski V, Tew K. The ABCA2 trans-porter: intracellular roles in trafficking and metabolism of LDL-derived cholesterol and sterol-related compounds. *Curr Drug Metab.* 2007;8:47–57.

