

Telmo José Dias Gonçalves

Efeito do Butirato no Metabolismo do Cancro Colorretal



2014

Capa

Adaptado de www.nadieta.com/2011/07/blog-post_2310.html

Esta cópia da tese é fornecida na condição de que quem a consulta conhece que os direitos de autor são pertença do autor da tese e que nenhuma citação ou informação obtida a partir dela pode ser publicada sem a referência apropriada.

This copy of the thesis has been supplied in the condition that anyone who consults it is understood to recognize that its copyright rests with its author and that no quotation from the thesis and no information derived from it may be published without proper acknowledgment

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

*“See the animal in his cage that you built
Are you sure what side you're on?
Better not look him too closely in the eye
Are you sure what side of the glass you are on?
See the safety of the life you have built
Everything where it belongs
Feel the hollowness inside of your heart
And it's all...
Right where it belongs*

*What if everything around you
Isn't quite as it seems?
What if all the world you think you know
Is an elaborate dream?
And if you look at your reflection
Is it all you want it to be?
What if you could look right through the cracks?
Would you find yourself...
Find yourself afraid to see?”*

Trent Reznor

Agradecimentos

O espaço limitado desta secção de agradecimentos, seguramente, não me permite agradecer, como devia, a todas as pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para esta dissertação assim como para a minha vida académica. Desta forma, deixo apenas algumas palavras, poucas, mas um sentido e profundo sentimento e agradecimento aos que, ao longo destes anos posso chamar de amigos.

À Professora Doutora Maria Filomena Botelho, diretora da Unidade de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, orientadora desta dissertação, pelo acolhimento no seu grupo, por toda a disponibilidade demonstrada, por todo o apoio prestado, por todo o aconselhamento e por toda a confiança demonstrada.

Ao Professor Doutor João Nuno Moreira, Professor da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, orientador interno desta dissertação, pela total disponibilidade demonstrada e partilha de conhecimento e experiência científica.

Ao Professor Doutor Rui Albuquerque de Carvalho, Professor Auxiliar da Faculdade de Ciências e Tecnologia da universidade de Coimbra muito tenho de agradecer. Apesar de não ter nenhuma ligação formal a este trabalho experimental muito contribui para a sua realização e muito me ensinou durante este ano. Um sincero muito obrigado.

À Professora Doutora Ana Bela Sarmiento Ribeiro, Professora da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, pela sua disponibilidade e apoio indispensável para a elaboração deste trabalho científico, e à Mestre Ana Cristina Gonçalves pela disponibilidade constante e empenho sempre demonstrados, nomeadamente no auxílio prestado aos estudos de citometria de fluxo e pela partilha de conhecimento na interpretação dos resultados.

Gostaria também de agradecer ao Instituto Tecnológico PET Madrid pela cedência de ^{18}F -FDG e à Unidade de Oncologia Translacional do Instituto de Investigações Biomédicas de Madrid pela cedência da linha celular CCD 841 CoN.

À Margarida, por ser mais do que uma chefe, por todo o tempo despendido, pelos ensinamentos, pela compreensão, pelos inúmeros incentivos, por se preocupar e por ser uma pessoa com que sei que possa contar.

À Salomé, por todo o tempo que despendeu comigo, por toda a amizade, pela enorme contribuição para este trabalho, pelos ensinamentos, pela compreensão nos momentos em que mais precisei e por ser a grande pessoa que é e admiro o meu sincero obrigado.

Ao Casalta, pela disponibilidade, pela ajuda no tratamento estatística e pelos bons momentos. À Ana Brito, à Mafalda, à Catarina, ao Fernando, à Siri e à Maria João por todos os bons momentos passados no laboratório e fora dele, e por toda a partida de experiência e conhecimentos.

À Ana Isabel, à Denise, ao Gonçalo, à Kathleen, à Ana Cláudia, à Susann, à Sara, à Filipa e a tantos outros que passaram pelo serviço de Biofísica, por todos os bons momentos e por toda a ajuda prestada.

Ao João, por toda a ajuda e por ter começado o butirato comigo.

Ao Sales, ao Teixo e à Tânia, pelas inúmeras aventuras no laboratório e fora dele, pela nossa pHControl, pelos sorrisos incontáveis e por sermos inseparáveis.

À Nídia, ao Mário, ao Ricardo, à Sara Francisco, ao Pinhal, ao Gonçalo, à Miki, ao Oliveira, à Susana e à Cátia pela grande amizade que se criou ao longo dos nossos percursos académicos., e por estarem sempre presentes nos momentos certos.

A todos os elementos que passaram pelo grupo Des.liga, pelos bons momentos de distração.

A todos os que viveram no t8, por serem uns bons colega de casa e amigos e por toda a compreensão ao longo deste ano.

Ao Michäel, à Daniela, ao Luís, à Marisa, ao Roberto, ao Gabriel, ao André, à Ana, ao Diogo, ao David, ao Hugo, à Andreia e ao Igor pela longa e forte amizade que nos une, por, muitas vezes, apesar da distância estarem sempre perto e pela compreensão neste ano.

À minha mãe, irmão, tios, primos e avó que sempre me apoiaram, obrigado pelo amor, dedicação, confiança, carinho e preocupação continuamente demonstrados.

Índice

I.INTRODUÇÃO.....	I
1.1 Cancro colorretal	3
1.1.1 O cancro do cólon e a dieta.....	5
1.2 O butirato	9
1.2.1 O transporte do butirato	11
1.2.2 O butirato no cancro colorretal	12
1.3 O butirato e o efeito Warburg	15
1.3.1 ¹⁸ F-FDG PET	17
1.3.2 Cancro colorretal e o efeito Warburg	18
1.3.3 O efeito Warburg e o butirato	19
2.OBJETIVOS.....	21
3.MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1 Culturas celulares	27
3.2 Avaliação da citotoxicidade do butirato no cancro do cólon.....	29
3.2.1 Avaliação da proliferação celular pelo ensaio de MTT	29
3.2.2 Citometria de fluxo.....	31
3.2.2.1 Avaliação da viabilidade celular e dos tipos de morte	32
3.2.2.2 Avaliação da expressão de Bax/Bcl-2	33
3.3 O butirato e o metabolismo no cancro do cólon	35
3.3.1 Efeito da variação dos níveis de glicose na proliferação celular pelo ensaio MTT	35
3.3.2 Estudos de captação com ¹⁸ F-FDG	35
3.3.3 Avaliação da expressão do GLUT-1, -3, -5 e -12.....	36
3.3.3.1 Avaliação da expressão membranar	37
3.3.3.2 Avaliação da expressão citoplasmática	38
3.3.4 Estudos metabólicos por Ressonância Magnética Nuclear	39
3.4 Análise estatística	46
4.RESULTADOS.....	49
4.1 Avaliação da citotoxicidade do butirato	51

4.1.1 Avaliação da atividade metabólica pelo ensaio de MTT em condições HG	51
4.1.2 Avaliação da viabilidade celular e dos tipos de morte induzida	54
4.1.3 Avaliação da expressão de BAX e BCL-2.....	57
4.2 O Butirato e o Metabolismo tumoral	58
4.2.1 Avaliação da proliferação celular pelo ensaio de MTT em condições de baixa concentração de glicose (LG)	58
4.2.2 Estudos de Captação de ¹⁸ F-FDG	65
4.2.3 Avaliação da expressão proteica do GLUT-1, -3, -5 e -12.....	69
4.2.4 Estudos metabólicos por Ressonância Magnética Nuclear	74
5.DISSCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	85
6.BIBLIOGRAFIA.....	105

Resumo

O cancro colorretal é um dos cancros mais incidentes e mortais nos países desenvolvidos. Um dos principais fatores que pode levar a uma maior incidência deste tumor é uma dieta rica em carnes vermelhas e gorduras. A dieta, essencialmente as fibras dietéticas, tornam-se cada vez mais um fator fundamental na prevenção deste tipo de cancro. A fermentação das fibras dietéticas por parte das bactérias do cólon leva à produção de SCFAs. Destes, este trabalho destaca o butirato, a principal fonte de energia das células do cólon saudável e de extrema importância para a manutenção da homeostase do cólon. O butirato é um inibidor das HDACs referenciado como indutor de apoptose em células tumorais de cancro do cólon e promotor da diferenciação.

Durante o processo de tumorigénese as células tumorais sofrem várias alterações metabólicas para poderem sustentar as exigências energéticas inerentes à elevada proliferação e intensificam o metabolismo glicolítico por detrimento do metabolismo oxidativo (efeito *Warburg*). Assim, com o incremento do efeito de *Warburg*, as células tumorais de cancro do cólon recorrem preferencialmente à glicose em detrimento do butirato. Contudo, alguns estudos sugerem que o butirato poderá ser competitivo com a glicose, e interferir com algumas alterações inerentes ao metabolismo tumoral.

Assim, pretendeu-se com este trabalho averiguar o papel do butirato na célula tumoral do cólon, em duas vertentes distintas, em que na primeira se estudou a citotoxicidade do butirato e na segunda se avaliou a sua interferência com o efeito *Warburg*.

Na primeira fase de desenvolvimento deste trabalho verificou-se que o butirato apresenta um potencial citotóxico para as três linhas celulares a estudo. Esse potencial foi verificado tanto em termos de atividade metabólica, como viabilidade celular e expressão proteica de BAX e BCL-2.

Na segunda parte do trabalho avaliou-se a competitividade do butirato com o metabolismo glicolítico, verificando-se que este interfere com o metabolismo das linhas celulares C2BBel e WiDr, não se verificando o mesmo para a linha celular LS1034.

Nas linhas celulares C2BBel e WiDr, o butirato promoveu uma diminuição na captação de ^{18}F -FDG na condição LG, sendo essa diminuição acompanhada na linha celular WiDr por uma diminuição de expressão ao nível membranar do GLUT-3. Na linha celular LS1034 verificou-se um ligeiro aumento da captação de ^{18}F -DG e curiosamente, uma diminuição na expressão do GLUT-5.

Os resultados referentes ao ^{18}F -FDG foram corroborados pela produção de lactato avaliada pela técnica de RMN. Por esta técnica foi também possível comprovar um estímulo do metabolismo oxidativo nas linhas celulares C2BBel e WiDr, assim como o consumo de butirato por parte das três linhas celulares, apesar do seu fenótipo tumoral. Na linha celularLS1034 o mesmo não foi verificado, possivelmente devido à citotoxicidade do SCFA para estas células.

Assim, os resultados obtidos sugerem que o butirato (obtido da dieta) pode atenuar e interferir com o efeito *Warburg*, diminuindo a agressividade do tumor. Este facto verifica-se especialmente com níveis baixos de glicose, condição que melhor mimetiza a situação clínica.

Abstract

Colorectal cancer is one of the most common and deadly cancers in developed countries. One of the major risk factors that can lead to a higher incidence of this tumor is a diet rich in red meat and fats. Diet, essentially dietary fibers, become an increasingly critical factor in preventing this type of cancer. The fermentation of dietary fibers by colon's bacteria leads to the production of SCFAs. This work highlights on butyrate, the main energy source of colonocytes and a nutrient with preponderance on the maintenance of colon homeostasis. Butyrate is a HDACs inhibitor referenced as an inducer of apoptosis and promoter of differentiation in tumor colon cells.

During tumorigenic process, tumor cells develop metabolic alterations to support the energetic requirements provoked by the higher proliferation. Thus, tumor cells intensify glycolytic metabolism and decrease the oxidative metabolism (*Warburg effect*). Thereby, with a intensified *Warburg effect*, colon cancer cells use glucose rather than butyrate as energy source. However, some studies suggest that butyrate may compete with glucose and interfere with some of the metabolic alterations acquired by tumors.

Thus, it was intended with this work to ascertain the role of butyrate in colon tumor cell in two different ways; firstly it was studied the butyrate cytotoxic effect and secondly it was evaluated its interference with the *Warburg effect*.

In the first phase of the development work it was found that butyrate induces a cytotoxic effect on the three cell lines under study. This potential was verified both in terms of metabolic activity, such as cell viability and protein expression of BAX and BCL-2.

In the second part of this work it was evaluated the competitiveness of butyrate with glycolytic metabolism, being proved that it can interfere with the metabolism of C2BBel and WiDr cell lines, with the exception of LS1034 cell line.

In C2BBel and WiDr cell lines, butyrate promoted a reduction on ^{18}F -FDG uptake by a decreased membranar expression of GLUT-3. In LS1034 cell line it was verified a slight increase of ^{18}F -FDG uptake and, curiously a decrease in GLUT-5 expression.

The results of ^{18}F -DG uptake were corroborated with the results obtained for lactate production evaluated by NMR. By this technique it was also possible to prove an inducement of oxidative metabolism in C2BBel and WiDr cell lines, as well as butyrate consumption by the three colon cancer cell lines, despite its tumor phenotype. In LS1034 cell line the same results were not observed, possibly because of the cytotoxicity of the SCFA to these cells.

In conclusion, the results obtained suggest that butyrate (obtained from the diet) interferes and in some cases attenuate with *Warburg* effect, decreasing tumor aggressiveness. This fact is verified essentially with low glucose content, the condition that better mimics the clinical situation.

Lista de Abreviaturas e Acrónimos

^{18}F - Fluor-18

^{18}F -FDG - ^{18}F -Fluordesoxiglicose

ALT - Aminotransferase

APC - *Adenomatous polyposis coli*

ATP - Trifosfato de adenosina

AV - Anexina V

C2 – Carbono 2

c-MYC - *Myelocytomatosis cell oncogene*

CPM – Contagens por minuto

CS - Citrato sintase

DFA - *Decay accelerating factor*

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

DNA - *Deoxyribonucleic acid*

FBS - *Fetal bovine serum*

FDA - *Food and Drug Administration*

FITC - *Fluorescein isothiocyanate*

[U- ^{13}C] glicose - Glicose uniformemente marcada com carbono-13

GLUT – Transportador de glicose

Gp-P - Glicoproteína-P

GSK3 - *Glycogen synthase kinase 3*

HAT - *Histone acetyltransferases*

HCO_3^- - Bicarbonato

HDAC - Deacetilases das histonas

HG - *High glycose*

HNPCC - *Hereditary nonpolyposis colorectal cancer*

IP - Iodeto de propídeo

K-ras - *v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*)

LDH - Lactato desidrogenase

LG - *Low glycose*

MCT1 - *Monocarboxylate transporter 1*

MDR- *Multidrug resistant*

MIF - Média de intensidade de fluorescência

mM - Milimolar

MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol2-il)-2,5-difeniltetrazolium

NADH – *Nicotinamide adenine dinucleotide reduced form*

NADPH – *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form*

PBS – *Phosphate buffer saline*

PC – Piruvato carboxilase

PDH - *Pyruvate dehydrogenase*

PE – *Phycoerythrin*

PET - *Positron emission tomography*

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

RPMI - *Roswell Park Memorial Institute Medium*

SCFA - *Short-chain fatty acid*

SMCT1 - *Sodium-coupled monocarboxylate transporter 1*

Sódio - Na⁺

Tcf/lef - *T-cell factor/Lymphoid enhancer-binding factor*

TGF-β - *Transforming growth factor beta*

TNM - Tumores, nódulos e metástases

VEGF - *Vascular endothelial growth factor*

I.Introdução

1.1 Cancro colorretal

Sabe-se hoje que existem milhares de mutações, translocações, amplificações e deleções que podem estar associadas ao desenvolvimento do cancro (CAIRNS, HARRIS, & MAK, 2011). Este surge quando uma célula normal escapa aos mecanismos habituais de regulação e inicia uma cadeia de eventos, a carcinogénese.

O cancro colorretal é o segundo tipo de cancro mais incidente em Portugal e em grande parte dos países desenvolvidos (FERLAY, *et.al.*, 2012). Esta neoplasia tem um aumento de incidência com a idade, de modo que cerca de 90% dos diagnósticos são em indivíduos com mais de 50 anos. Os casos de doentes mais jovens devem-se maioritariamente aos cancros com determinante genético como o cancro do cólon não-polipoide hereditário, que resulta de uma alteração do gene *HNPCC* (do inglês *hereditary nonpolyposis colorectal cancer*), ou aos doentes que possuem polipose adenomatosa familiar, caracterizada pelo aparecimento de pólipos devido à mutação no gene *APC* (do inglês *adenomatous polyposis coli*) e que posteriormente dá origem a tumores malignos (ENGSTROM, *et. al.*, 2009). A incidência aparece também aumentada para situações de reincidência, histórico familiar de cancro colorretal positivo ou existência de outras doenças intestinais que provoquem inflamação do intestino, como a doença de Crohn e a colite ulcerosa (POTTER, 1999; TRIANTAFILLIDIS, *et. al.*, 2009).

O cancro do cólon pode surgir tanto do lado esquerdo como do lado direito do intestino grosso, havendo diferenças na expressão génica dependendo do lado onde surge a neoplasia (YAMAUCHI, *et. al.*, 2012). Existem vários tipos de cancro colorretal, entre os quais o adenocarcinoma, o carcinoma de células escamosas, entre outros (POTTER, 1999). O mais comum é claramente o adenocarcinoma que representa cerca de 95% dos casos (FLEMING, *et. al.*, 2012).

O adenocarcinoma desenvolve-se a partir de uma série de estádios histológicos que evoluem desde a célula normal, à formação de pequenos pólipos, que dão origem a pólipos largos com alto grau de displasia e que, por sua vez, originam o cancro. Esta transição de epitélio normal para tumor é provocada por uma série de acontecimentos tanto a nível genético como morfológico (WATSON, 2006).

A morfologia do cólon caracteriza-se pela presença de criptas ao longo do seu epitélio com cerca de 50 células de profundidade. As células no topo da cripta são totalmente

diferenciadas e advêm das células na sua base, com características estaminais e que se vão dividindo originando as células que migram até formar a cripta. Assim, as células progenitoras, tendo em conta a sua localização, ficam protegidas de pressões externas. As células do topo da cripta apresentam diferenciação máxima, com perda da capacidade de se dividirem mas com a possibilidade de poderem iniciar o processo apoptótico, se necessário. Deste modo se garante que qualquer eventual mutação não terá impacto na população de células da cripta do cólon (BRINK & OFFERHAUS, 2007; POTTER, 1999). O problema surge quando ocorrem mutações nas células com características estaminais que são responsáveis pela renovação das células da cripta. Como estas células apresentam elevada proliferação e são progenitoras de uma elevada quantidade de células, as descendentes irão apresentar as mesmas mutações (BRINK & OFFERHAUS, 2007).

Na maioria dos casos, o processo de carcinogénese inicia-se com uma mutação no gene APC. A mutação deste gene impede que se forme um complexo APC/ β -catenina/Axina/GSK3 (do inglês *glycogen synthase kinase 3*), responsável pela fosforilação da β -catenina pela GSK3. Com a não formação do complexo há a estabilização da β -catenina e acumulação desta no citoplasma. A sua acumulação vai levar à ativação do Tcf/lef (do inglês, *T-cell factor/lymphoid enhancer-binding factor*) que, por sua vez, ativa o oncogene c-MYC (do inglês, *myelocytomatosis cell oncogene*) associado à formação de células tumorais (BRINK & OFFERHAUS, 2007; POTTER, 1999).

A proteína APC também é responsável por regular a migração das células por interações com os microtúbulos, pelo bloqueio do ciclo celular e pela regulação da adesão das células por via da ligação β -catenina-E-caderina. Em suma, uma mutação no gene APC promove as condições necessárias para que ocorra a formação de pólipos, gerando desordem na migração, replicação e adesão celular (BRINK & OFFERHAUS, 2007).

Mutações na β -catenina também são frequentes e acabam por induzir os mesmos eventos que uma mutação no gene APC. Durante o processo de carcinogénese, várias mutações e erros vão surgindo noutros genes e moléculas. É comum o surgimento de mutações no gene que codifica a proteína P53, responsável pela regulação da apoptose; mutações no oncogene K-ras (do inglês, *v-Ki-ras2 kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*), no TGF- β (do inglês, *transforming growth factor beta*), entre outros (POTTER, 1999).

Os sinais e sintomas mais frequentes desta patologia são a alteração dos hábitos intestinais, sangue nas fezes, desconforto abdominal generalizado, perda de peso inexplicada, náuseas, vômitos, cansaço constante, entre outros (ASTIN, *et. al.*, 2011).

Para determinar o melhor método de tratamento é necessário fazer um estadiamento com o objectivo de avaliar a extensão da invasão local, grau de invasão dos gânglios linfáticos e da presença de metástases à distância. O sistema TNM (do inglês *tumor, nodules and metastasis*) é o mais usado para o estadiamento, sendo a classificação de Dukes (inclui 4 estadios: A - o tumor encontra-se confinado na mucosa da parede intestinal; B - o tumor expande-se pela parede intestinal, C - o tumor desenvolve metástases proximais; D - o tumor desenvolve metástases à distância) um exemplo de outro sistema usado (ENGSTROM, *et. al.*, 2009). As duas classificações encontram-se comparadas na tabela I, assim como a sequência de estadios, cuja caracterização se baseia no grau de invasão e/ou metastização que vão do estadio I, tumor confinado à parede do intestino, ao estadio IV, metastização à distância (WATSON, 2006).

Após o estadiamento do tumor, o tratamento mais adequado é escolhido. Os tratamentos mais usados atualmente são a cirurgia, a quimioterapia (ex.:cetuximab, irinotecano, 5-fluorouracilo) e a radioterapia, utilizada principalmente quando o tumor se localiza no reto (ENGSTROM, *et. al.*, 2009).

Tabela I -Tabela descritiva do estadiamento do cancro colorrectal segundo as classificações TNM, numérica e de Dukes (ABRANTES, 2013).

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

1.1.1 O cancro do cólon e a dieta

Para os investigadores, as células normais não sofrem mutações com frequência suficiente para possuírem todos os erros genéticos requeridos para obter um fenótipo tumoral durante o período de vida humana. Para que isso aconteça, o genoma da célula deve-se tornar instável (WATSON, 2006). Essa instabilidade pode ser provocada por vários fatores de risco, nomeadamente má alimentação, tabaco, poluição, entre outros (KUSHI, *et. al.*, 2006).

De acordo com a figura I, verifica-se que há uma maior incidência de cancro colorretal nos países desenvolvidos em comparação com os países em vias de desenvolvimento. Sabe-se também que existem diferenças substanciais entre as dietas destes dois conjuntos de países. A dieta nos países desenvolvidos é mais rica em gorduras e carnes vermelhas e pobre em vegetais, fruta e fibra dietética. Por sua vez, nos países em vias de desenvolvimento a dieta é muito rica em fibra dietética e vegetais e pobre em carnes. Tendo em conta estes factos, impõe-se a questão de saber se haverá alguma correlação entre a incidência de cancro do cólon e os hábitos de dieta. Provavelmente, o maior motivo de tamanha diferença será o facto de nos países desenvolvidos a esperança média de vida ser muito superior à dos países em vias de desenvolvimento e, como já foi referido, a idade ser um fator de risco para o desenvolvimento deste tipo de cancro (DONALDSON, 2004).

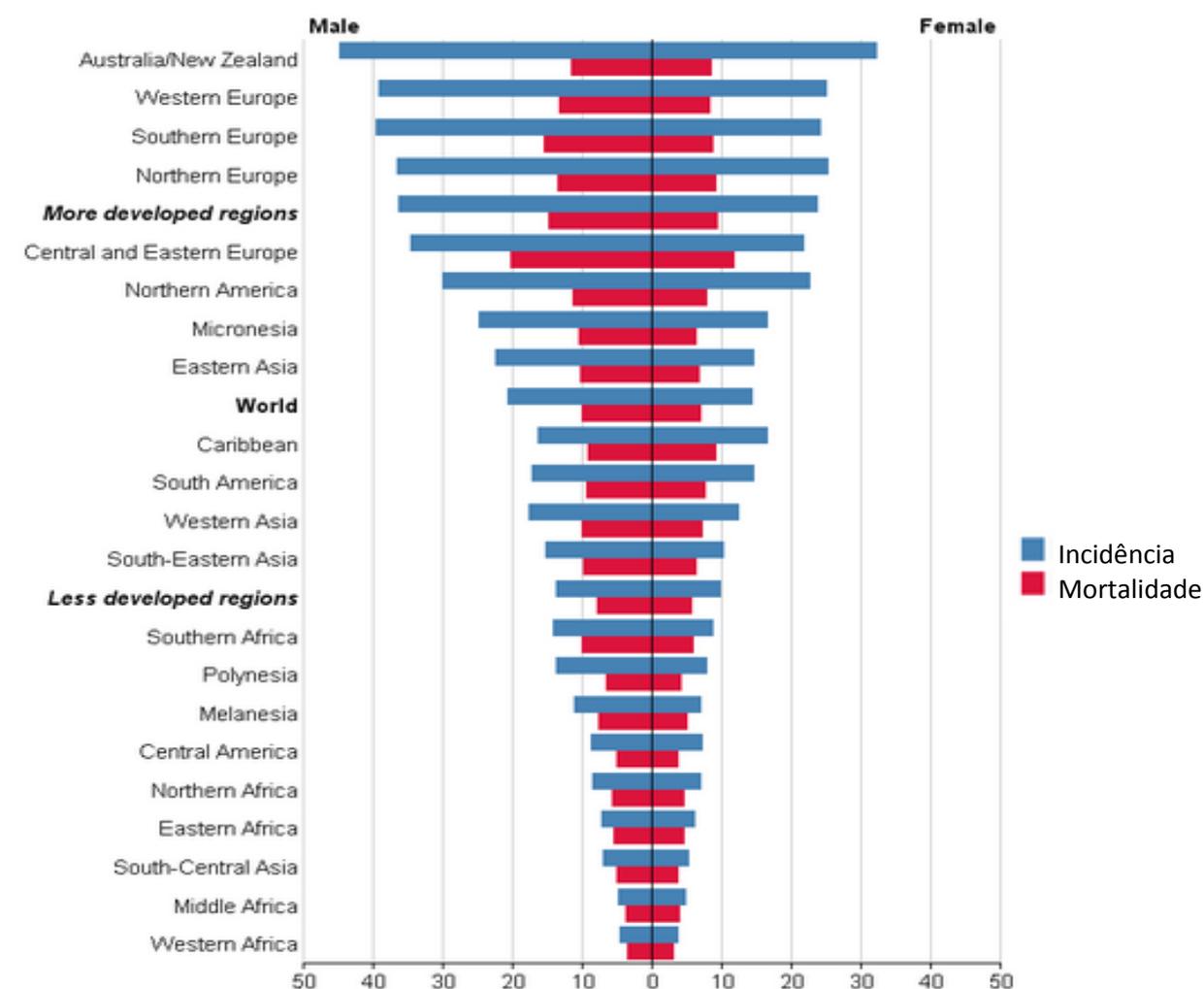


Figura I – Incidência de cancro colorretal no mundo por 100 mil habitantes em 2012 (FERLAY, 2012).

Segundo o World Cancer Research Fund, 30 a 40% dos cânceros podem ser prevenidos adotando um estilo de vida saudável, em que se escolhe uma dieta apropriada, se pratica exercício físico regular e se mantém o peso corporal equilibrado. Se se adicionar o não consumo de tabaco e álcool a prevenção será ainda maior (DONALDSON, 2004).

Para estabelecer uma correlação verdadeira entre a dieta e a incidência de cancro colorretal, e de outros tumores, muitos estudos têm sido feitos (DONALDSON, 2004; ROSE, *et. al.*, 2007; SINGH & FRASER, 1998). Quanto ao consumo de vegetais, a maioria dos estudos aponta que o consumo destes reduz o risco de cancro colorretal e de outros tipos de cancro, enquanto os estudos realizados sobre o consumo de carne vermelha e gorduras indicam que um elevado consumo está associado a um aumento de incidência de cancro colorretal (DONALDSON, 2004; GIOVANNUCCI, *et. al.*, 1994).

Diversos compostos provenientes da dieta, tais como os ácidos gordos ómega 3, os glucosinatos, a vitamina D e a fibra dietética têm sido estudados, com o objetivo de mostrar a sua capacidade anticancerígena (GILL & ROWLAND, 2002; HIJOVA & CHMELAROVA, 2007).

As fibras dietéticas são carboidratos geralmente de origem vegetal que não são digeridos pelo homem, visto que as enzimas humanas não os conseguem hidrolisar. Estas fibras podem dividir-se em duas categorias: as solúveis e as insolúveis. As fibras solúveis dissolvem-se em água e são fermentadas, geralmente no cólon, originando gases ou bioprodutos fisiologicamente ativos. Estas fibras tornam o movimento dos alimentos pelo organismo mais lento, ajudam a reduzir os níveis de colesterol no sangue, o que leva a um menor risco de doenças cardiovasculares, reduzem o risco de diabetes, de hipertensão e de obesidade. As pectinas, as gomas e as mucilagens são constituintes comuns deste tipo de fibras (SAURACALIXTO, 2011). Estas fibras encontram-se geralmente em sementes integrais, como nos feijões e nas ervilhas; em algumas frutas, como na banana, na cereja e na noz; em alguns vegetais, como na cenoura e nos brócolos. Por sua vez, as fibras insolúveis, ou seja, as que não se dissolvem em água, absorvem água durante o seu percurso pelo organismo facilitando o movimento de comida e a defecação e regulam os níveis de açúcar no sangue, podendo reduzir os níveis de glicose e de insulina, o que leva a uma redução do risco de diabetes. A celulose, a cutina e a lignina são constituintes deste tipo de fibras (ANDERSON, *et. al.*, 2009). Estas podem ser encontradas em cereais, como os farelos de trigo e milho; em alguns legumes, como o feijão e as ervilhas; em nozes e em sementes; entre outros. Existem também benefícios associados aos dois tipos de fibra dietética como o aumento do volume dos alimentos sem aumentar o volume calórico, o equilíbrio do pH intestinal e a produção

de ácidos gordos de cadeia curta (SCFA, do inglês *short-chain fatty acid*) por fermentação das fibras no cólon. Os SCFA estão associados a uma redução do risco de cancro colorretal (HIJOVA & CHMELAROVA, 2007).

Os SCFA são ácidos gordos de cadeia curta cuja cauda alifática é constituída por um esqueleto de 2 a 6 carbonos e são produzidos por fermentação de fibra dietética pelas bactérias do cólon. Os SCFA têm sido associados a uma redução de risco de algumas doenças como inflamação do intestino, doenças cardiovasculares e cancro (FLOCH & HONG-CURTISS, 2002; HIJOVA & CHMELAROVA, 2007). Os principais SCFA são o butirato, o propionato e o acetato.

O processo de fermentação de carboidratos que ocorre nas bactérias do cólon envolve uma série de reações metabólicas. A maioria das bactérias usa a via glicolítica para a fermentação mas, dependendo do carboidrato, também podem haver bactérias a usar a via das pentoses. Um dos produtos que se forma, como resultado destas vias, é o piruvato que, dependendo da bactéria, irá formar produtos dos quais se destacam o acetato, o propionato e o butirato (SCFA) (HIJOVA & CHMELAROVA, 2007; MACFARLANE & GIBSON, 1997). O processo de formação dos SCFA pelas bactérias do cólon está sumariado na figura 2.

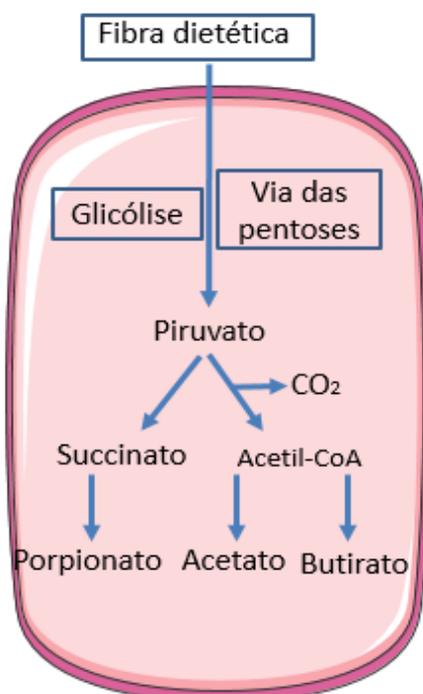


Figura 2 – Esquema representativo da produção de SCFA pelas bactérias presentes no cólon. As vias básicas de produção dos vários SCFA e outros metabolitos pela fermentação de bactérias no lúmen do cólon.

O processo de fermentação ocorre preferencialmente no cólon proximal, sendo os SCFA transportados para o cólon distal pelo trânsito intestinal. A concentração de SCFA ao longo do intestino diminui com a proximidade à zona terminal do cólon, sucedendo o mesmo com a sua absorção. Curiosamente, é a zona terminal do cólon que apresenta mais recorrentemente tumores (TOPPING & CLIFTON, 2001). As razões da concentração de acetato, de propionato e de butirato encontrados ao longo do cólon são 60:20:20 mM, respetivamente (POMARE, *et al.*, 1987).

Depois de produzidos, cerca de 95% dos SCFA, são absorvidos pelas células do cólon sendo os restantes excretados nas fezes (MACFARLANE & GIBSON, 1997; TOPPING & CLIFTON, 2001). A absorção dos SCFA pelas células do cólon é feita maioritariamente por difusão simples (SCFA protonados), sendo que os SCFA ionizados entram nas células por co-transporte de Na⁺ e K⁺ (GONÇALVES *et al.*, 2009). O acetato e o propionato são menos necessários para as células do cólon, acabando por uma parte ser transportada para o fígado pela veia porta (COOK & SELLIN, 1998; POMARE, *et al.*, 1987). De realçar que o SCFA mais importante para a saúde do cólon é o butirato (HAMER, *et al.*, 2008).

1.2 O butirato

O butirato, um dos principais produtos da fermentação na flora intestinal da fibra dietética, é um SCFA com 4 carbonos na sua cauda hidrofílica (figura 3).

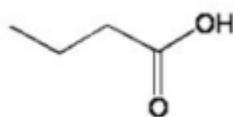


Figura 3 – Estrutura da molécula de butirato (DASHWOOD, *et al.*, 2006).

Este SCFA é uma importante fonte de energia para as células do epitélio do cólon, desempenha um papel importante na manutenção da homeostase deste órgão e promove o crescimento de bactérias consideradas benéficas para o cólon (HAMER, *et al.*, 2008).

A morfologia do cólon, como já foi referido anteriormente, depende de mecanismos de migração e diferenciação. As células do topo das criptas do cólon são diferenciadas e renovadas por células que se originam das células da base, menos diferenciadas, e que por

migração, acabam por chegar ao topo da cripta. O topo das criptas do cólon está sujeito a muitos fatores externos, pelo que é essencial que as células no topo sejam diferenciadas. O butirato promove a diferenciação das células não diferenciadas do cólon, reduzindo assim o risco de surgirem anomalias (COMALADA, *et. al.*, 2006).

A heterogeneidade do cólon leva a que as suas células estejam expostas ao butirato em gradientes diferentes. Como a fermentação do butirato ocorre no epitélio do cólon, as células da base das criptas estão mais expostas do que as do topo, como representado na figura 4. Assim, em certas doenças em que no topo da cripta surgem células não totalmente diferenciadas, a menor exposição ao butirato impede a correção desta anomalia (SENGUPTA, *et al.*, 2006).

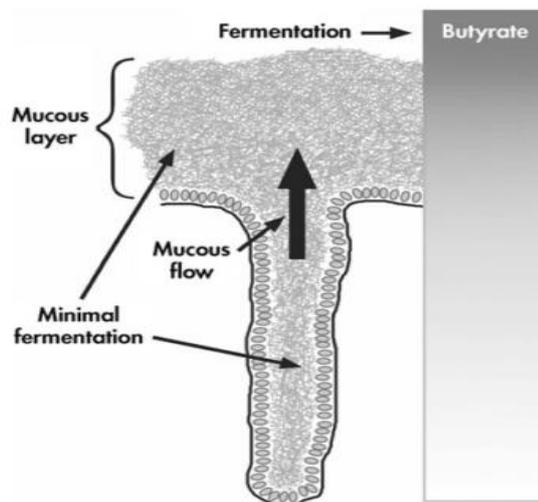


Figura 4 – Representação da heterogeneidade da exposição do epitélio normal do cólon ao butirato. A fermentação é restrita do lúmen o que leva a maiores concentrações do butirato nesta zona (Sengupta *et al.*, 2006).

Do butirato produzido, quase todo é oxidado no cólon, sendo esta afirmação fundamentada pelo facto de a sua concentração na veia porta ser cerca de mil vezes inferior à do cólon. O butirato suporta cerca de 60% das necessidades energéticas das células do epitélio do cólon, pelo que é a sua principal fonte de energia. O butirato, após entrar nas células do cólon, vai dirigir-se à mitocôndria onde vai sofrer β -oxidação, para ser convertido em acetil-CoA para posteriormente, ao entrar no ciclo de Krebs, ser convertido em energia, de acordo com o representado na figura 5 (DONOHOE, *et. al.*, 2012).

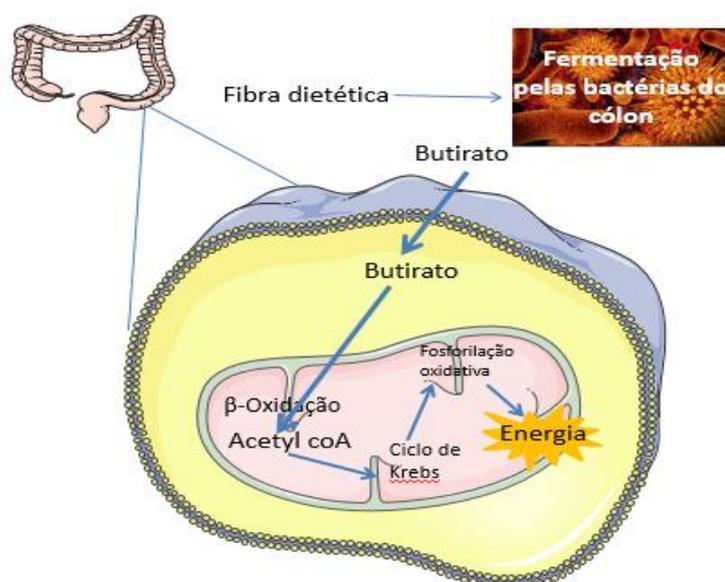


Figura 5- Esquema representativo da oxidação do butirato pelas células do cólon.

1.2.1 Transporte do butirato

O butirato produzido pelas bactérias do cólon é rapidamente absorvido pelas células epiteliais. Esta absorção pode ocorrer por vários mecanismos dependendo do pH. Com valores de pH normais no cólon (entre 6 a 7), cerca de 90% dos SCFA, incluindo o butirato, estão presentes na forma aniônica. Nesta forma o butirato entra por transporte mediado através de transportadores como o SMCT1 (do inglês *sodium-coupled monocarboxylate transporter 1*, também designado SLC5A8), o MCT1 (do inglês *monocarboxylate transporter 1*, também designado SLC16A1) ou por troca com o anião bicarbonato (figura 6), enquanto que na forma catiônica (cerca de 10%) entra nas células do cólon por difusão simples (GONÇALVES *et al.*, 2009). Na forma catiônica a captação de butirato é mais acentuada, aumentando a sua absorção com a diminuição do valor de pH (HADJIAGAPIOU, *et al.*, 2000)

O SMCT1 é um transportador de monocarboxilatos mediado por acoplamento com sódio (Na^+), ou seja, para uma molécula de butirato entrar na célula através deste transportador, um íon Na^+ também tem de atravessar a membrana. O lactato, o piruvato e os corpos cetônicos também são substratos deste transportador (GUPTA, *et al.*, 2006).

O MCT1 é um transportador de monocarboxilatos em que, ao transporte destes é acoplado um próton na mesma direção. Assim, para uma molécula de butirato atravessar a membrana mediada por este transportador, um próton também terá de a atravessar. O

lactato e o piruvato também são substratos deste transportador (GANAPATHY, *et al.*, 2009; KIRAT & KATO, 2006).

O mecanismo de transporte mediado pela troca SCFA/HCO₃⁻ baseia-se na troca de um SCFA, como o butirato, por uma molécula de bicarbonato (HCO₃⁻) em sentidos opostos (GONÇALVES *et al.*, 2009). A figura 6 resume os diferentes transportes associados aos SCFA.

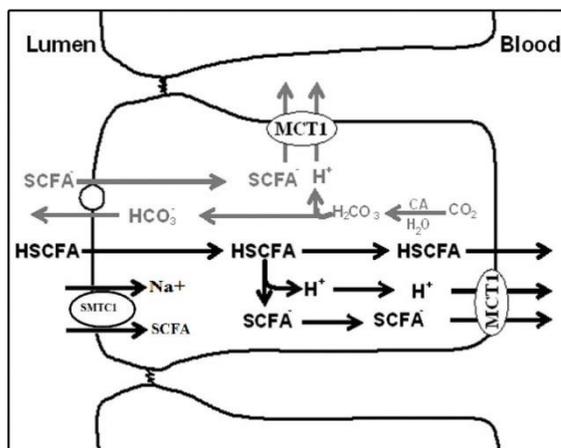


Figura 6 – Esquema representativo dos diferentes transportes dos SCFA: difusão simples; co transporte pelo MCTI, co transporte pelo SMCTI e por troca com HCO₃⁻ (KIRAT & KATO, 2006).

1.2.2 O butirato no cancro colorretal

O Butirato tem mostrado cada vez mais potencial terapêutico em vários tipos de cancro. Vários estudos têm associado o butirato ao cancro da mama (GONÇALVES, *et al.*, 2011), do fígado (JIANG *et al.*, 2012), assim como ao cancro colorretal (HIJOVA & CHMELAROVA, 2007).

Como supracitado, a maioria dos casos de cancro colorretal são diagnosticados no cólon descendente. Este facto, acoplado às reduzidas concentrações de butirato nessa região conduzem à postulação da hipótese de que o butirato poderá desempenhar um papel importante na prevenção/tratamento deste tipo de cancro.

Há alguns estudos que defendem que o butirato pode atuar como agente anticancerígeno nas diferentes fases principais de formação do cancro (SCHARLAU *et al.*, 2009).

O butirato, como fonte de energia dos colócitos, garante a manutenção dos mesmos quando presente em concentrações elevadas (TOPPING & CLIFTON, 2001). Desta forma, o butirato ajuda a evitar a primeira fase de desenvolvimento tumoral, pela indução da

produção de glutatona-s-transferase (enzima de biotransformação que destoxifica muitos agentes carcinogênicos) (SCHARLAU, *et al.*, 2009) e pelo seu efeito anti-inflamatório (HAMER, *et al.*, 2008).

De acordo com os estudos *in vitro*, as linhas celulares tumorais tratadas com butirato sofrem apoptose e inibição de crescimento (WATSON, 2006), o que significa que este composto atua a nível da proliferação celular. O butirato inibe também as deacetilases das histonas (HDAC) e aumenta a expressão de BAK, uma proteína pro-apoptótica (CHIRAKKAL, *et al.*, 2006).

Para além disto, o butirato pode também condicionar a metastização, já que possui um papel na redução da angiogénese por inibição do VEGF (do inglês *vascular endothelial growth factor*) e na redução da migração celular por inibição do DFA (do inglês *decay accelerating factor*) (HAMER, *et al.*, 2008).

Dos efeitos referidos, o mais referido é o de inibidor das HDAC. As histonas são as proteínas sobre as quais o DNA (do inglês *deoxyribonucleic acid*) se enrola, funcionando como matriz. Sem estas, seria impossível que o DNA eucariota permanecesse dentro dos limites da célula. Diferentes histonas unem-se e formam um octâmero ao qual uma parcela de DNA se enrola formando um nucleossoma (unidade básica da cromatina). Quanto maior o número de histonas na cromatina, maior o grau de condensação desta e, por consequência, menor a transcrição de genes, que ocorre após descondensação e alongamento do segmento de DNA a ser transcrito. Assim, as histonas são muito importantes na regulação génica, sofrendo para tal modificações pós-traducionais, por processos de acetilação, metilação, fosforilação entre outras (DOKMANOVIC, *et al.*, 2007; GIANNINI, *et al.*, 2012).

As histonas são normalmente carregadas positivamente devido aos grupos amina presentes nos seus aminoácidos de lisina e arginina. As cargas positivas permitem que haja grande interação e atração com as cargas negativas dos grupos fosfato da estrutura principal de DNA, permitindo assim que o DNA se enrole em volta das histonas e se condense (GLASER, 2007). A acetilação das histonas é o processo que estimula a transcrição e consiste na adição de um grupo acetil aos resíduos de lisina das cadeias laterais dos octâmeros do nucleossoma. O grupo acetil neutraliza as cargas positivas nas histonas e diminui, assim, a atração existente entre estas e o DNA. A adição dos grupos acetil é efetuada pelas acetiltransferases das histonas (HAT, do inglês *histone acetyltransferases*) que, assim, funcionam como coativadores da transcrição, facilitando o acesso a zonas promotoras da transcrição (DAVIE, 2003). A desacetilação das histonas é o processo inverso, em que os grupos acetil são removidos, voltando a ser aumentadas as cargas positivas das histonas.

Assim, é promovida novamente a interação entre o DNA e as histonas e ocorre a condensação deste e a repressão da transcrição. Este processo é mediado pelas desacetilases das histonas (HDAC) (DAVIE, 2003).

O butirato é conhecido por ser um inibidor destas HDAC, impedindo assim que ocorra a repressão da transcrição. Os inibidores das HDAC provocam o acumular de histonas acetiladas, aumentam o grau de diferenciação e, deste modo, diminuem a proliferação celular através do bloqueio do ciclo celular. Assim, cada vez mais se fala do uso destes inibidores para terapia contra certas doenças, nomeadamente o cancro (DOKMANOVIC, *et. al.*, 2007; GIANNINI, *et. al.*, 2012)

A figura 7 resume a ação de um inibidor das desacetilases das histonas.

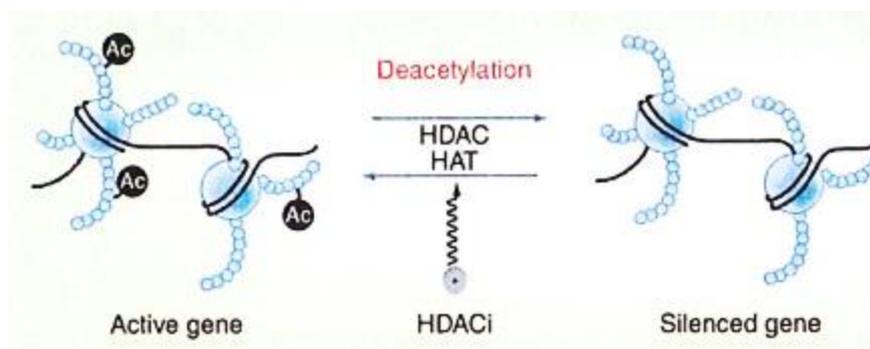


Figura 7 - A ação de um inibidor das HDAC que vai promover a ativação da expressão génica (GIANNINI, *et. al.*, 2012).

Em 2006 a FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou o primeiro inibidor das HDAC como fármaco, o Vorinostat usado para tratar o linfoma cutâneo originado de células T. Pelo menos 12 inibidores das HDAC estão atualmente na fase de ensaios clínicos, como monoterapia ou para terapia combinada com quimioterapia e radioterapia, em doentes com diferentes tipos de cancro (GIANNINI, *et. al.*, 2012).

Os efeitos benéficos do butirato nas células normais juntamente com os seus efeitos nocivos para as células tumorais definem o chamado *paradoxo do butirato*. A grande questão prende-se com os mecanismos que levam o butirato a ter estes efeitos antagónicos que são, no entanto, comuns a muitos dos inibidores das HDAC.

1.3 O efeito Warburg

Em 2011, com o intuito de continuar a providenciar bases sólidas que permitissem ajudar a entender a biologia do cancro, Hanahan e Weinberg adicionaram 4 características dos tumores que estão envolvidas na carcinogénese, às seis características já descritas por eles em 2000. As características iniciais incluíam a habilidade de resistir ou evitar a morte celular; a capacidade de escapar à ação de supressores de crescimento; a replicação infinita (imortalização); a invasão e metastização; a capacidade de obter o seu próprio fornecimento de sangue (angiogénese) e a de manter ativas as vias proliferativas (figura 8A) (HANAHAN & WEINBERG, 2000). A estas características foi acrescida a promoção de inflamação pelo tumor, a capacidade de evitar a destruição imunológica, a instabilidade do genoma e mutações, e a desregulação da energética celular, como representado na figura 8 B (HANAHAN & WEINBERG, 2011).

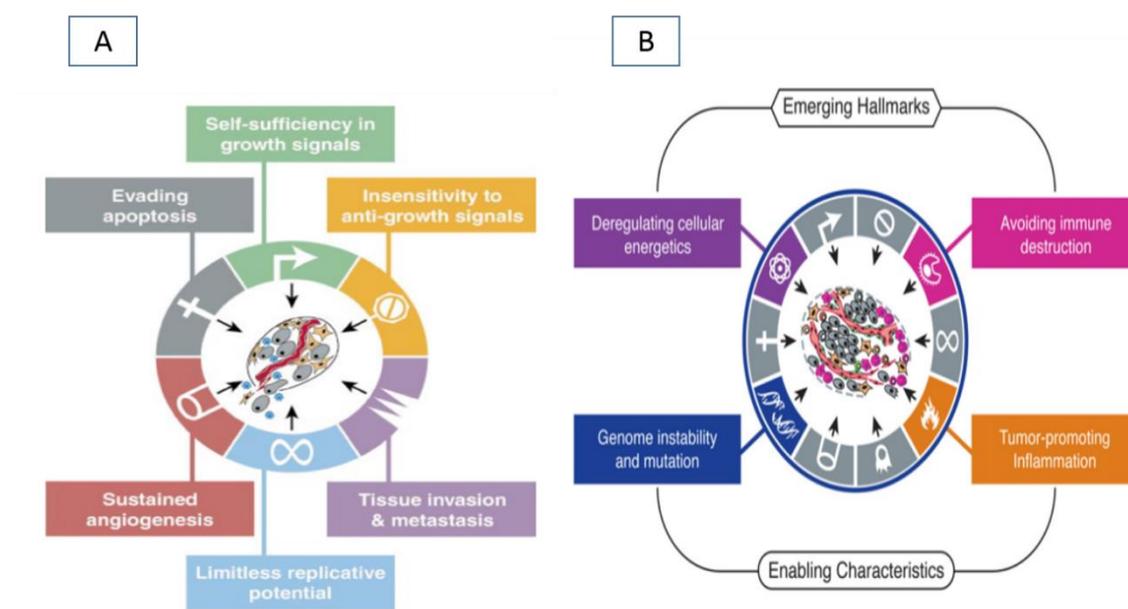


Figura 8– As características emergentes e adquiridas do cancro. A complexidade do processo de desenvolvimento tumoral primeira descrito em 2000 (A) e que depois levou a que Hanahan e Weinberg atualizassem a sua proposta em 2011 (B) (HANAHAN & WEINBERG, 2011).

Para que a proliferação celular seja mais intensa é necessário que as células reprogramem o seu metabolismo energético para terem energia suficiente para o aumento de divisões celulares. Em condições aeróbicas, as células normais processam a glicose pela via da glicólise, convertendo-a em duas moléculas de piruvato através de uma série de reações no citoplasma. O piruvato entra na mitocôndria sendo depois convertido a acetil-CoA pelo

complexo piruvato desidrogenase, e entra por fim no ciclo de Krebs por agregação com um dos metabolitos do ciclo (oxaloacetato). Por fim ocorre a fosforilação oxidativa em que as coenzimas produzidas nos passos anteriores são convertidas a trifosfato de adenosina (ATP) (NESLON, *et. al.*, 2010). Em condições anaeróbicas, a glicólise é favorecida e a atividade mitocondrial (ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa) é muito reduzida. Nestas condições, a glicose é convertida em lactato pela lactato desidrogenase (LDH) no final da glicólise (NESLON, *et. al.*, 2010).

Otto Warburg foi o primeiro a reparar nas anomalias metabólicas das células tumorais (WARBURG, 1956). Verificou que, mesmo em condições aeróbicas, as células se comportam como se estivessem sem a presença de oxigénio ou seja, reprogramavam o seu metabolismo e entravam num estado chamado de “glicólise aeróbica”. O favorecimento da glicólise parece ser um contrassenso, tendo em conta que o rendimento energético é muito menor do que o verificado quando as células realizam a fosforilação oxidativa (cerca de 18 ATP a menos) pois as necessidades energéticas das células tumorais são muito superiores. Mas, se o fluxo de entrada do maior nutriente extracelular (glicose) for elevado o suficiente, a produção de ATP pela glicólise pode exceder o da fosforilação oxidativa (DEBERARDINIS, *et. al.*, 2008). Para aumentar a produção de energia as células tumorais aumentam muito os mecanismos de captação de glicose, em comparação com as normais, estando os transportadores glicolíticos normalmente sobreexpressos.

Warburg concluiu que a glicose era convertida em piruvato numa percentagem de cerca de 90% e que apenas 10% serviam como substrato para piruvato desidrogenase que a converte em acetil-CoA (que como foi já referido entra no ciclo de Krebs) (WARBURG, 1956). Assim, cria-se um problema a nível do ciclo de Krebs, não havendo reabastecimento das *pools* de metabolitos intermediários. Para resolver este problema as células tumorais recorrem a uma anaplerose mais intensa, ou seja reabastecimento dos metabolitos intermédios nas diversas vias metabólicas. No ciclo de Krebs as moléculas mais usadas na anaplerose são a glutamina/glutamato que entram no ciclo pelo alfa-cetoglutarato (DEBERARDINIS, *et. al.*, 2008). Assim, as células tumorais proveêm-se de moléculas essenciais para a sua biossíntese (BRUNENGRABER & ROE, 2006)

O recurso contínuo à via glicolítica permite também que os diversos intermediários desta via sejam usados em processos de biossíntese de nucleosídeos e aminoácidos, o que vai facilitar a produção de macromoléculas e organelos essenciais para as divisões celulares. Permite também que as células tumorais facilmente se adaptem ao estado de hipoxia, característico do microambiente de tumores sólidos (DEBERARDINIS, *et. al.*, 2008).

A figura 9 sumariza a reprogramação metabólica existente nas células tumorais.

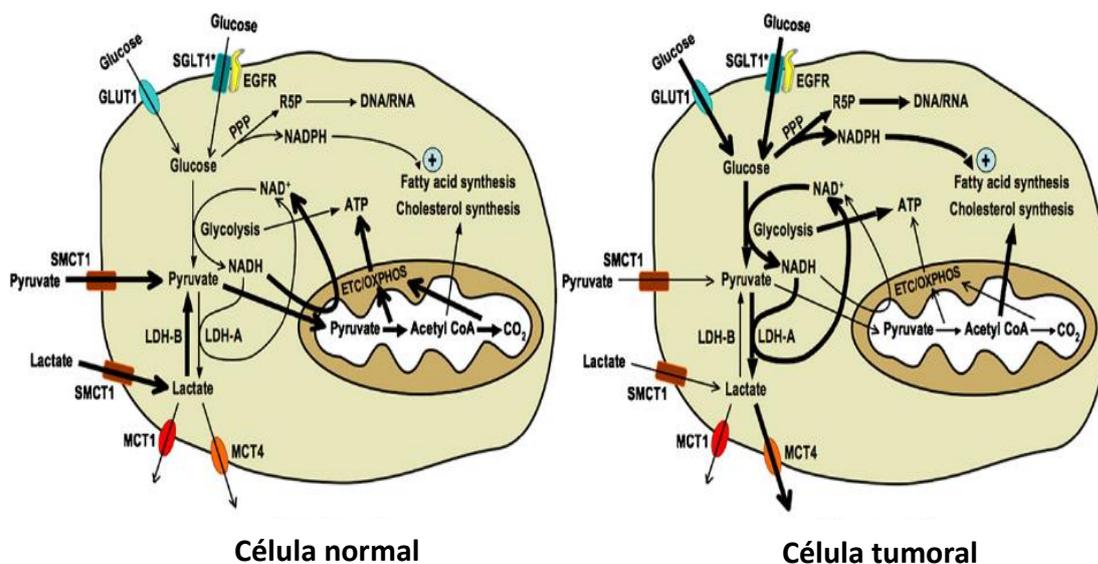


Figura 9 – Transporte e metabolismo da glicose em células normais versus células tumorais assim como a representação esquemática das vias metabólicas mais ativas nestas células (GANAPATHY, et al., 2009).

1.3.1 ^{18}F -FDG-PET

A tomografia por emissão de positrões (PET, do inglês *positron emission tomography*) com recurso a ^{18}F -Fluordesoxiglicose (^{18}F -FDG) surgiu tendo por base o proposto por Otto Warburg. A PET é uma técnica de imagiologia em que um radionuclídeo emite um positrão no momento da sua desintegração, o qual é aniquilado com um eletrão, originando a emissão de dois fótons de 511 keV, os quais são detetados para formar uma imagem (JADVAR, et al., 2009). O ^{18}F -FDG é um radiofármaco muito usado na PET para deteção e/ou estadiamento de diferentes tipos de cancro. Consiste numa molécula de glicose em que o grupo hidroxilo na posição carbono 2 (C2) é substituído pelo isótopo radioativo emissor de positrões, o Flúor-18 (^{18}F). Este isótopo entra nas células principalmente através dos transportadores de glicose (GLUT), GLUT-1 e GLUT-3, mas também, através do GLUT-5 e do GLUT-12. Após a entrada na célula, o ^{18}F -FDG é fosforilado pela hexocinase II num processo em tudo idêntico ao verificado no primeiro passo da glicólise. Contudo, devido às diferenças estruturais da molécula comparativamente com a glicose, a enzima do passo seguinte (glicose-6-fosfato isomerase) não reconhece o ^{18}F -FDG-6-fosfato, não lhe permitindo percorrer os passos seguintes da glicólise. Como se encontra na forma ^{18}F -FDG-6-fosfato, ao qual a membrana celular é impermeável, vai-se acumular no citoplasma (figura 10). Esta

acumulação é muito maior nas células tumorais tendo em conta que a captação do ^{18}F -FDG (similar à da glicose) é superior à das células normais, permitindo a obtenção de imagens que traduzem a intensa atividade glicolítica (KAPOOR, *et. al.*, 2004).

Contudo, o ^{18}F -FDG-PET não constitui uma ferramenta de diagnóstico a aplicar em todos os tipos de cancro, como por exemplo, o cancro do pâncreas e da próstata, tendo em conta que estes não apresentam o metabolismo glicolítico tão exacerbado.

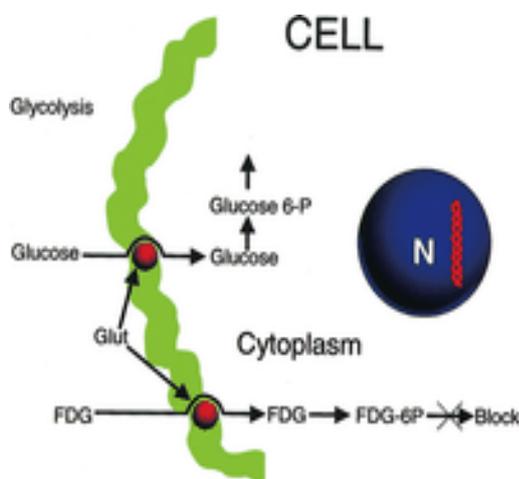


Figura 10 – Captação celular do ^{18}F -FDG. O transporte para o meio intracelular é mediado pelos transportadores de glicose. O ^{18}F -FDG não é oxidado pela célula como acontece com a glicose (KAPOOR, *et al.*, 2004).

1.3.2 Cancro colorretal e o efeito Warburg

O cancro do cólon apresenta um perfil de captação de glicose e de ^{18}F -FDG bastante elevado permitindo que o ^{18}F -FDG-PET seja usado como método de diagnóstico e como ferramenta para estadiamento, reestadiamento, e monitorização da terapia (BENSINGER & CHRISTOFK, 2012). O transportador de glicose GLUT-1 não está presente no epitélio normal do cólon, no entanto, está referenciado como sobreexpresso em alguns tumores do cólon, sendo que está associado ao desenvolvimento e à agressividade do tumor – quanto mais desenvolvido e agressivo for o tumor, maior a presença ou a probabilidade de presença deste transportador de glicose (JADVAR, *et. al.*, 2009). O GLUT-3 é outro transportador de alta afinidade para a glicose, assim como o GLUT-1, referenciado como estando sobreexpresso no cancro do cólon (JADVAR, *et. al.*, 2009). O GLUT-5 é um transportador de frutose que está expresso no intestino delgado mas não no epitélio do cólon. Alguns estudos demonstraram que este está expresso em linhas celulares de cancro do cólon (LI, *et.*

al., 2006). Em relação à isoforma GLUT-12 não existem referências bibliográficas sobre a sua expressão em cancro colorretal (MACHEDA, *et. al.*, 2005), sendo este um transportador apenas descoberto em 2002 e, por isso, menos estudado (ROGERS, *et. al.*, 2002).

Com a reprogramação metabólica a que as células ficam sujeitas, verifica-se também a subexpressão de transportadores de outros nutrientes. No epitélio do cólon normal é recorrente existir uma elevada expressão de MCT1 e SMCT1 (já referidos como transportadores de butirato), contudo, durante o processo de tumorigénese estes transportadores estão subexpressos, chegando a não ser detetados em alguns casos. Estes transportadores também estão associados ao transporte de piruvato e de lactato, sendo que o piruvato, recentemente, também foi apontado como um inibidor das HDAC (GANAPATHY, *et. al.*, 2009; LAMBERT, *et. al.*, 2002; CALDAS, 2009). Com o aumento da expressão dos principais transportadores de glicose e a diminuição da expressão de transportadores de butirato fica claro que, durante o processo de tumorigénese, as células do cólon deixam de recorrer ao butirato como principal fonte de energia e passam a recorrer à glicose como consequência do efeito de Warburg.

1.3.3 O efeito Warburg e o butirato

Para produzir o efeito de inibidor das HDAC a concentração de butirato tem de atingir valores entre 100-350 mM no citosol das células, uma concentração muito elevada e que não se encontra normalmente no cólon. Para que a inibição das HDAC ocorra é então necessário que haja acumulação de butirato na célula. Com a utilização da glicose pelas células tumorais do cólon como principal fonte de energia, devido ao efeito Warburg, o butirato que entra nas mesmas acaba por sofrer essa acumulação necessária, sendo que uma pequena quantidade acaba por ser oxidada (DONOHOE, *et. al.*, 2012).

Assim, a explicação das diferenças encontradas no efeito do butirato em células normais e tumorais (paradoxo do butirato) podem ser explicadas pelo efeito Warburg como representado na figura 11.

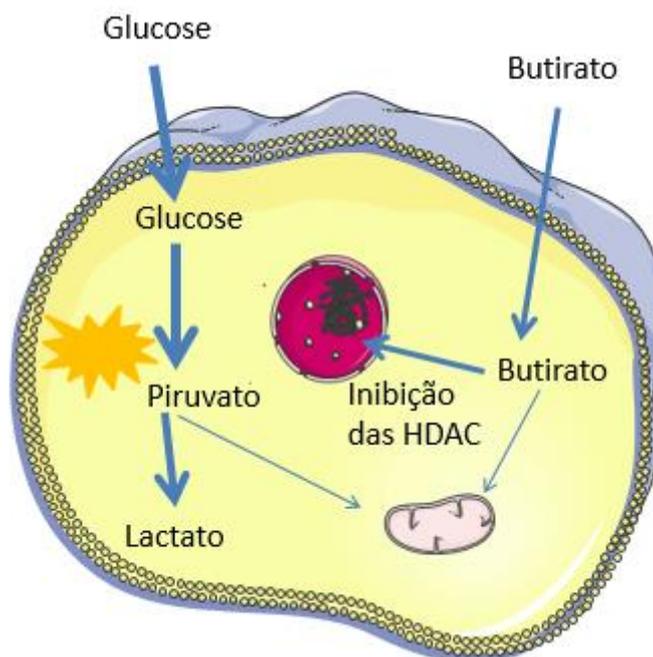


Figura 11 – Representação das consequências do efeito *Warburg* numa célula tumoral. A reprogramação metabólica que diminui a atividade mitocondrial leva a que o butirato se acumule no citoplasma e atinja concentrações elevadas promovendo assim a inibição das HDAC.

Estudos demonstram que a presença de outras fontes de energia, como o piruvato e a glicose, na cultura de diferentes linhas celulares alteram a resposta das mesmas à presença de butirato. Na ausência de glicose e de piruvato, concentrações baixas de butirato estimulam o crescimento celular enquanto que concentrações mais elevadas inibem o crescimento tumoral (AHMAD, *et. al.*, 2000; ANDRIAMIHAJA, *et. al.*, 2009; HE, *et. al.*, 2007; SINGH, *et. al.*, 1997). Mas, a ser utilizado como fonte de energia poderá existir a possibilidade do butirato estar também a promover a reprogramação do metabolismo tumoral das células tumorais, a atenuar as consequências do efeito *Warburg* e a diminuir a agressividade das mesmas (BLOUIN, *et. al.*, 2011; DONOHOE, *et. al.*, 2012). O butirato tem-se mostrado como um bom candidato ao combate e à prevenção do cancro do cólon por inibir seletivamente o crescimento tumoral. Contudo, quando é administrado a doentes, a rápida absorção deste SCFA pelas células normais dificulta a sua chegada em concentrações desejáveis ao tumor. Uma dieta rica em fibra dietética parece ser a melhor solução para que se atinjam concentrações significativas de butirato, na ordem dos mM, a nível do cólon. No entanto, é imprescindível entender com maior profundidade a competição que existe entre o butirato e a glicose, de modo a clarificar o potencial do butirato na terapia do cancro do cólon (SINGH, *et. al.*, 1997).

2.OBJETIVOS

O cancro colorretal é um dos cancros mais incidentes e mortais nos países desenvolvidos. A dieta, essencialmente as fibras dietéticas, tornam-se cada vez mais um fator fundamental na prevenção deste tipo de cancro, pelo facto da sua fermentação levar à produção de butirato no cólon. Assim como é conhecido que este SCFA apresenta um elevado potencial citotóxico para células tumorais do cólon, existem também algumas evidências de que seja competitivo com o metabolismo glicolítico inerente ao efeito *Warburg*.

Assim, o trabalho experimental é dividido em duas partes. Na primeira parte pretende-se estudar a citotoxicidade do butirato em três linhas celulares de cancro colorretal e numa linha normal de cólon. Para isso é proposta a avaliação da atividade metabólica, da viabilidade celular, dos tipos de morte induzidos, e da expressão de BAX e BCL-2.

Na segunda parte do trabalho pretende-se avaliar os efeitos do butirato no metabolismo das células tumorais, sendo para isso proposto a determinação da atividade metabólica em condição de LG, a avaliação do efeito do butirato na captação de ^{18}F -FDG e na expressão de GLUT-1, -3, -5 e -12 a nível citoplasmático e membranar, assim como a determinação da sua expressão basal. Para além disso, recorrendo à técnica de Ressonância Magnética Nuclear, pretende-se determinar o efeito do butirato na produção de lactato, no acoplamento entre a glicólise e o ciclo de Krebs, no *turnover* do ciclo de Krebs assim como, na captação de butirato por parte das células tumorais e consequente interferência deste com o consumo de glicose.

3.MATERIAIS E MÉTODOS

Os efeitos celulares induzidos pelo butirato têm gerado muita controvérsia. Ser a principal fonte de energia nas células do cólon saudável e ao mesmo tempo levar à apoptose e diferenciação de células tumorais parece indicar algum contraditório. Assim, a readaptação metabólica surge como hipótese para explicar estas diferenças. Existem já alguns estudos em que a competição com a glicose é abordada e a hipótese do butirato poder provocar uma reprogramação no metabolismo celular em ambiente tumoral não está descartada. Desta forma, para avaliar a competição do butirato com a glicose a nível do metabolismo celular, recorreu-se a estudos *in vitro*. Para tal, foram utilizadas culturas celulares e as metodologias adequadas.

3.1 Culturas celulares

As culturas celulares são células isoladas, cultivadas e propagadas em condições de assepsia e de esterilidade, para que possam ser estudadas quando sujeitas a determinadas variáveis.

Para este trabalho utilizaram-se 3 linhas celulares de tumores humanos do cólon: a linha C2BBel, a linha WiDr e a linha LSI034 e uma linha de epitélio do cólon humano normal: a linha CCD 841 CoN.

A linha C2BBel é uma linha celular de adenocarcinoma do cólon esquerdo que foi clonada da linha celular CaCo-2 em 1988. Este clone foi selecionado tendo em conta a sua homogeneidade morfológica e a sua localização. Esta linha tem tendência a formar agregados e monocamadas a lembrarem a morfologia do cólon humano. A linha apresenta mutação no gene APC (ILYAS, *et. al.*, 1997).

A linha WiDr também é uma linha celular de adenocarcinoma localizado no cólon esquerdo e é derivada da linha HT-29. Esta linha apresenta a P53 mutada por uma troca de uma arginina por uma histidina na posição 273 e apresenta também uma mutação no gene APC (ILYAS, *et. al.*, 1997).

A linha LSI034 é uma linha de carcinoma do cólon isolada em 1989 de uma biópsia de um tumor de um doente de 54 anos de etnia caucasiana que, segundo a classificação de Dukes se encontrava no estadio C (carcinoma do cego moderado até pouco diferenciado). Estas

células apresentam multi resistência a fármacos e mutação no gene que codifica a P53 (mutação posição 245 com troca de uma glicina por uma serina). A multiresistência a fármacos que esta linha apresenta está relacionada com a sobreexpressão da glicoproteína-P (Gp-P) (CASALTA-LOPES, *et. al.*, 2011). Esta linha apresenta também uma mutação no gene APC (deleção no códon 1309, GAAAAGATT --> GATT).

A linha CCD 841 CoN é uma linha do epitélio do cólon isolada de um feto do sexo feminino com 21 semanas de gestação.

As linhas celulares foram mantidas a 37°C, em atmosfera humidificada com 95% de ar e 5% de CO₂, em incubadora e propagadas de acordo com as recomendações do fornecedor. Ou seja, as linhas WiDr, C2BBel e CCD 841 CoN foram propagadas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, DMEM (Sigma, D5648). O meio foi suplementado com 5% de soro bovino fetal (FBS, do inglês *fetal bovine serum*; Sigma, F7524); 1% de antibiótico (Sigma, A5955) e 0,25 mM de piruvato de sódio (Gibco, 11360), e a a linha LS1034 foi propagada em meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute Medium*, RPMI-1640 (Sigma, R4130). Este meio, em termos de suplementos, difere do DMEM apenas na concentração de piruvato de sódio que, neste caso, era de 1mM. Ambos os meios foram acertados a pH de 7,4 (pH fisiológico).

As três linhas celulares referidas foram propagadas em cultura aderente portanto, para a realização dos diversos protocolos experimentais foi necessário o destacamento destas. Para tal, o meio de cultura foi aspirado, e após lavagem das culturas celulares com uma solução salina de tampão fosfato (PBS, do inglês *phosphate buffer saline*, constituído por 137 mM de NaCl (Sigma, S7653); 2,7 mM de KCl (Sigma, P9333); 10 mM de NaH₂PO₄ (Sigma, S5011) e 1,8 mM de KH₂PO₄ (Sigma, P0662) (pH=7,4)), e incubaram-se a 37°C, durante o tempo necessário para o destacamento das células, com uma solução de tripsina-EDTA a 0,25% (Sigma, T4049) para a linha celular WiDr, ou *Tryple™ Express Enzyme* (Gibco, 12605-028), para as restantes linhas. Após o destacamento das células e tendo em conta que a tripsina é citotóxica quando exposta para além do seu tempo de ação, adicionou-se meio com o objetivo de inibir a mesma, em quantidade correspondente ao dobro do volume de tripsina previamente adicionado. Para a propagação das células, a suspensão celular foi distribuída pelos frascos necessários.

No caso de preparação de células para os diversos protocolos experimentais procedeu-se à contagem das mesmas num microscópio invertido (Motic, AE31) com ampliação de 10x, adicionando 20 µL de suspensão celular a 20 µL de azul tripano com recurso a uma câmara de *neubauer*. Após a determinação da concentração da suspensão celular fizeram-se as

diluições necessárias para poder iniciar os protocolos experimentais pretendidos, distribuindo as células em poços de placas ou frascos conforme o pretendido.

Para a realização dos estudos utilizaram-se duas variantes dos meios acima descritos, que diferiam no teor de glicose: (1) meios com elevada concentração de glicose (25 mM), designados por HG (*high glycose*) e (2) meios com baixa concentração de glicose (5mM), designados por LG (*low glycose*). Os níveis de glicose presentes no FBS não foram tidos em conta para os referidos valores, visto que a percentagem de FBS foi igual para todas as condições.

O trabalho experimental foi dividido em duas partes. Na primeira parte (3.2) pretendeu-se estudar os efeitos do butirato nas linhas celulares referidas na proliferação celular, na viabilidade celular, nos tipos de morte induzidos, na razão BAX/BCL-2. Na segunda parte do trabalho (3.3) pretendeu-se avaliar os efeitos do butirato no metabolismo das células tumorais e avaliou-se a proliferação celular em baixa concentração de glicose, a captação de ^{18}F -FDG, determinou-se a expressão de GLUT-1, -3, -5 e -12 e recorreu-se à técnica de Ressonância Magnética Nuclear para avaliar a influência do butirato em diferentes metabolitos.

3.2 Avaliação da citotoxicidade do butirato no cancro do colorretal

3.2.1 Avaliação da proliferação celular pelo ensaio de MTT

Para avaliar o potencial anti-cancerígeno do butirato realizaram-se estudos de citotoxicidade. Realizou-se assim o ensaio colorimétrico de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT). Este ensaio é dependente da capacidade de metabolização das células viáveis de modo a converter um sal de tetrazólio solúvel em água, em cristais púrpura de formazano insolúveis em água. A degradação do anel tetrazólio é provocada pelas enzimas desidrogenases presentes nas células viáveis, as quais reduzem a NADH (do inglês, *nicotinamide adenine dinucleotide reduced form*) e a NADPH (do inglês, *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form*). Sendo assim, as células metabolicamente inativas não vão originar a formação de cristais de formazano e, conseqüentemente, a quantidade destes cristais é diretamente proporcional ao número de

células metabolicamente ativas, sendo esta uma medida de proliferação celular (BUCH, *et. al.*, 2012; TWENTYMAN & LUSCOMBE, 1987).

Para este protocolo prepararam-se suspensões de 5×10^4 células/mL, para as WiDr e C2BBel, e de 7×10^4 células/mL, para as LSI034 e CCD 840 CoN, cultivadas em meio HG, as quais foram distribuídas por placas de 48 poços, ficando cada poço com 0,5 mL de suspensão. Após 24 horas as células foram incubadas com concentrações crescentes de butirato. Para cada experiência foram usadas células controlo, não sujeitas a qualquer tratamento. A avaliação da proliferação celular pelo ensaio MTT foi feita após 24, 48, 72 e 96 horas de incubação com butirato. De referir que para as 24 horas de incubação as concentrações testadas variaram entre 1 mM e 50 mM, enquanto que para os restantes tempos de incubação, as concentrações testadas variaram entre 1 mM e 20 mM. Para a linha celular CCD 840 CoN avaliou-se a proliferação celular após 48 e 72 horas de incubação com butirato. As concentrações testadas variaram entre 1 mM e 30 mM. Para a preparação das diferentes soluções de butirato, usou-se como solvente PBS.

Para a realização do ensaio MTT, primeiramente removeu-se o meio de cultura por decantação. Em seguida, adicionaram-se 500 μ L de PBS para lavagem das células e se removerem os vestígios de meio. No seguimento, adicionaram-se 150 μ L por poço de uma solução de MTT (0,5 mg/mL; Sigma, M2128) em PBS, pH=7,4 e incubaram-se as células na incubadora a 37°C durante o tempo otimizado para cada linha celular até à formação de cristais. Passado esse tempo, dissolveram-se os cristais ao acrescentar a cada poço 150 μ L de isopropanol (Sigma, 278475), com 0,04 M de ácido clorídrico 37% (Sigma, 258148). Para facilitar a dissolução dos cristais, as placas foram colocadas em agitação, e de seguida transferiram-se 200 μ L do conteúdo de cada poço para uma placa de 96 poços, cuja absorvância foi lida num espectrofotómetro ELISA (Biotek® Synergy HT) a 570 nm e com filtro de referência a 620 nm.

A percentagem de proliferação celular foi determinada relativamente aos controlos. Assim, foi possível traçar as curvas de concentração-resposta e determinar as respetivas concentrações inibitórias médias (IC_{50}) ou seja, a concentração de butirato que inibe a proliferação celular em 50%. Os resultados obtidos foram analisados e processados no programa Origin Pro 8.0.

3.2.2 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma tecnologia que permite analisar e medir diferentes características de partículas (principalmente células) desde que estas estejam em suspensão num líquido, tal como o nome indica (*flow* = fluido; *cyto* = célula; *metry* = medição).

Um citómetro de fluxo é constituído por três sistemas principais: o fluido, o ótico e o eletrónico. O sistema de fluidos transporta as células por uma corrente de fluido estreita de tal forma que as células passam uma a uma por um feixe de luz que será disperso ou as irá atravessar. A dispersão de luz é dependente do tamanho, forma e estrutura interna da célula. A absorção de luz, no comprimento de onda apropriado, permite que haja reemissão por fluorescência num comprimento de onda diferente, caso a célula possua uma substância naturalmente fluorescente ou um ou mais anticorpos marcados com fluorocromos ligados à sua superfície ou estrutura interna. O isotiocianato de fluoresceína (FITC, do inglês *fluorescein isothiocyanate*) e ficoeritrina (PE, do inglês *phycoerythrin*) são os corantes fluorescentes mais comumente usados nas ciências biomédicas.

O sistema ótico consiste em diversos lasers que iluminam as células suspensas no fluido e em filtros óticos que redirecionam os feixes de luz refletidos pelas células para os respetivos fotodetetores. Os sinais de dispersão de luz e/ou de fluorescência são detetados por uma série de fotomultiplicadores e, posteriormente, amplificados. Os filtros óticos são essenciais para bloquear a luz indesejada e permitir que a luz de comprimento de onda específico atinja o fotodetector.

Por último, o sistema eletrónico converte os raios de luz detetados em sinais eletrónicos que podem ser processados por computador. O resultado final aparece na forma de informação quantitativa sobre todas as células analisadas. A análise de uma quantidade elevada de células num curto período de tempo (>1000/seg) permite a obtenção rápida de informações estatisticamente válidas sobre a população celular (DAVEY & KELL, 1996).

Assim, a citometria de fluxo é muito utilizada para determinar diversas características celulares, tais como o tamanho, complexidade do citoplasma, conteúdo em ácidos nucleicos e detetar um diverso número de proteínas, tanto membranares como citoplasmáticas. Para a análise das amostras foram obtidos 10^4 eventos, com auxílio do programa CellQuest™. Para análise e quantificação da informação utilizou-se um software específico que corre em computador dedicado (Paint-a-Gate 3.02, Machintosh Software).

Para este trabalho recorreu-se à citometria de fluxo para avaliar a influência do butirato na viabilidade e tipos de morte celular induzida, e para o cálculo das razões BAX/BCL-2.

Para a realização dos seguintes protocolos as células foram cultivadas em HG, de acordo com o objetivo pretendido, e incubadas durante 48 horas com diferentes concentrações de butirato (2, 5 e 20 mM). As células controlo não foram sujeitas a qualquer tratamento.

3.2.2.1 Avaliação da viabilidade celular e dos tipos de morte

Com o intuito de averiguar a viabilidade celular, esta foi determinada por citometria de fluxo, utilizando a técnica da dupla marcação com anexina V (AV) acoplada ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) e com iodeto de propídeo (IP). Esta técnica permite distinguir as células viáveis das células mortas e dentro destas distinguir qual o mecanismo que desencadeou a morte celular (apoptose ou necrose).

A apoptose, ou morte celular programada, é um processo essencial para a manutenção e desenvolvimento dos seres vivos, sendo importante para eliminar células supérfluas ou com defeitos. Durante a apoptose, a célula sofre alterações morfológicas características desse tipo de morte celular. Por sua vez AV é uma proteína anticoagulante com alta afinidade para fosfolípidos aniónicos. Em condições normais (célula viável) existe uma distribuição assimétrica dos fosfolípidos na bicamada lipídica, sendo que no folheto externo existe fosfatidilcolina e esfingomiéline, enquanto no folheto interno se encontra fosfatidilserina (fosfolípido aniónico). Quando a célula entra em apoptose a fosfatidilserina transloca-se para o folheto externa da membrana celular para servir como sinalizador para certos recetores identificarem a célula apoptótica e a removerem do tecido. Este processo ocorre enquanto ainda existe integridade da membrana, estando assim associado a um estado de apoptose inicial. A deteção deste estadio é possível graças à ligação da AV-FITC à fosfatidilcolina (HEERDE, *et. al.*, 2000).

O iodeto de propídeo (IP) é um corante que se intercala na cadeia de DNA emitindo fluorescência. Esta intercalação só ocorre no caso da membrana celular se encontrar destruída visto que o IP não tem capacidade para atravessar a bicamada lipídica. Por sua vez, a necrose é um tipo de morte celular na qual as células sofrem um insulto que resulta no aumento do volume celular, agregação da cromatina, desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana plasmática e consequente rutura da célula (GRIVICICH, *et. al.*, 2007). Assim, em caso de morte por necrose, o IP intercala-se no DNA, permitindo a deteção deste tipo de morte celular. Quando uma célula se encontra numa fase mais

avançada da apoptose (apoptose tardia) a sua membrana também perde a integridade e permite que o corante IP se ligue ao DNA (BRUNO, *et. al.*, 1992).

Desta forma, com a dupla marcação com AV-FITC e IP é possível identificar 4 grupos de células distintos: as células viáveis (marcação negativa para os dois compostos), as células em apoptose inicial (marcação negativa para o IP mas positiva para AV-FITC), as células em apoptose tardia/necrose (marcação positiva para os dois compostos) e as células em necrose (marcação negativa para AV-FITC e positiva para IP) de acordo com o apresentado na tabela 2 (BRUNO, *et. al.*, 1992; HAYWOOD-SMALL, *et. al.*, 2006).

Tabela 2 - Padrões de marcação com anexina V e iodeto de propídeo para os diferentes grupos de células.

Grupos	Anexina V	Iodeto de Propídeo
Células viáveis	-	-
Células em apoptose inicial	+	-
Células em apoptose tardia/necrose	+	+
Células em necrose	-	-

Para a realização da dupla marcação, após tripsinização, as suspensões com 1 milhão de células foram centrifugadas a 1300 G durante 5 minutos. Decantou-se o meio e ressuspendeu-se o *pellet* em PBS, seguindo-se nova centrifugação nas mesmas condições. O *pellet* resultante foi ressuspensão em 100 µL de tampão de ligação (constituído por 0,1 M de HEPES (Sigma, H7523), 1,4 M de NaCl (Sigma, S7653) e 25 mM de CaCl₂ (Sigma, C4901)) e incubaram-se as células com 2,5 µL de AV-FITC (ANXVF, Immunotech) e 1 µL de IP (KIT Immunotech) durante 15 minutos na ausência de luz e à temperatura ambiente. Após a incubação, adicionaram-se 400 µL de tampão de ligação às suspensões celulares, que se deixaram a repousar a 4°C até leitura no citómetro. Para a leitura no citómetro utilizou-se o comprimento de onda de 520 nm para a AV-FITC e de 640 nm para o IP. Os resultados foram determinados em percentagem de células identificadas em cada uma das subpopulações, baseado na positividade e/ou negatividade de marcação para AV-FITC e IP.

3.2.2.2 Avaliação da expressão de BAX/BCL-2

Muitas são as moléculas envolvidas no controlo das vias de ativação da apoptose. Essas moléculas podem estar relacionadas com a via intrínseca ou extrínseca desta via de morte. A

via extrínseca é desencadeada pela ligação de ligandos específicos a um grupo de recetores de membrana da superfamília dos recetores de fatores de necrose tumoral que, por sua vez, são capazes de ativar a cascata das caspases. Por outro lado, a via intrínseca é ativada por stresse intracelular ou extracelular como a privação de fatores de crescimento, danos no DNA, hipoxia ou ativação de oncogenes. Os sinais que são emitidos em resposta a estes insultos convergem principalmente para a mitocôndria. Um desses sinais é o aumento de expressão de proteínas pró-apoptóticas como a BAX, a BID e a BAK. Por outro lado, existem proteínas, denominadas de reguladores anti-apoptóticos, que têm um efeito contrário, como a BCL-2 e a BCL-XL que previnem a libertação de citocromo c (GRIVICICH, *et. al.*, 2007).

Das proteínas referidas as mais estudadas são a BAX (pró-apoptótica) e a BCL-2 (antiapoptótica) a qual é sobreexpressa em adenomas e carcinoma colorretal (FURTH, BRONNER, & REED, 1995). As proteínas BAX e BCL-2 são capazes de formar homodímeros (BAX-BAX e BCL-2-BCL-2) e heterodímeros (BAX-BCL-2), sendo que o equilíbrio entre esses homodímeros e heterodímeros pode definir o balanço pró-apoptótico ou antiapoptótico na célula. Após um estímulo de morte, a BCL-2 inibe a permeabilização da membrana externa da mitocôndria, pelo sequestro de BAX ou por competir por sítios que seriam ocupados pela BAX na membrana externa mitocondrial (MURPHY, *et. al.*, 2000). A BAX pode promover a apoptose através da interação com a mitocôndria, de forma independente da interação com proteínas antiapoptóticas (GRIVICICH, *et. al.*, 2007).

Pretendeu-se então estudar o efeito do butirato na razão da expressão das proteínas BAX e BCL-2 recorrendo-se à técnica de citometria de fluxo. Esta razão permite-nos saber se a célula apresenta uma tendência para entrar em apoptose (quando há uma elevada expressão da proteína BAX relativamente à BCL-2).

Para a realização do protocolo, após tripsinização, as suspensões com 1 milhão de células foram centrifugadas a 1300 G durante 5 minutos. Decantou-se o meio e ressuspendeu-se o *pellet* em PBS seguindo-se nova centrifugação nas mesmas condições. Decantou-se o sobrenadante e adicionaram-se 100µL de solução de fixação (Immunostep, Intracell). Colocaram-se de seguida as células a repousar no escuro à temperatura ambiente durante 15 minutos. Após esse tempo adicionaram-se 2 mL de PBS para lavar as células, seguindo-se uma centrifugação a 1300 G durante 5 minutos. Nova decantação foi realizada seguindo-se a adição de 100 µL de solução de permeabilização (Immunostep, Intracell) e 2,5 µL do anticorpo anti-BAX-PE (SantaCruz, sc-20067 PE) e 2,5 µL de anti-Bcl2-FITC (SantaCruz, sc-509 FITC). Colocaram-se as células a repousar durante 15 minutos no escuro à temperatura

ambiente, tempo após o qual se realizou nova lavagem com 2 mL de PBS seguida de centrifugação nas condições acima referidas. Decantou-se novamente o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 400 μ L de PBS. Após a ressuspensão com os 400 μ L de PBS em ambos os casos, as suspensões foram guardadas a 4°C até leitura no citómetro. A deteção foi feita utilizando os comprimentos de onda de excitação de 585 nm para a BAX e de 530 nm para a BCL-2. Os resultados obtidos são expressos como média de intensidade de fluorescência (MIF), tendo-se calculado posteriormente a razão BAX/BCL-2 e normalizado o resultado ao controlo.

3.3 O butirato e o metabolismo no cancro do cólon

3.3.1 Efeito da variação dos níveis de glicose na proliferação celular pelo ensaio de MTT

Para avaliar o efeito da variação da concentração de glicose no meio de cultura no efeito citotóxico induzido pelo butirato, realizou-se o ensaio de MTT nas mesmas condições do referido em 2.2.1 com exceção de as células terem sido incubadas em meios LG.

Tendo em conta os resultados obtidos através das curvas de concentraçã-resposta, as concentrações de butirato a utilizar nos protocolos seguintes foram 3 mM para a linha WiDr, 6 mM para a linha LS1034 e 15 mM para a linha C2BBe1. Estas concentrações são referentes ao IC₅₀ às 48 horas e foram escolhidas para garantir que a inibição da proliferação celular não seja muito elevada e, ao mesmo tempo, para permitir a deteção de possíveis alterações no metabolismo das células.

3.3.2 Estudos de captação com ¹⁸F-FDG

O ¹⁸F-FDG é um análogo da glicose, como já foi referido. Assim, ao avaliar a captação deste composto ao longo do tempo pode-se, por analogia, determinar o perfil de captação da glicose. Desta forma, para determinar até que ponto a incubação das células com butirato

iria afetar a captação de glicose por parte das linhas celulares em estudo, realizaram-se estudos de influxo com ^{18}F -FDG.

Para efetuar estes estudos prepararam-se 5×10^6 células cultivadas em meios HG e LG, em frascos de 25 cm^2 num volume final de 2,5 mL. De seguida, incubaram-se as células com a concentração de butirato já referida para cada linha celular durante 1 e 4 horas. As células controlo não foram sujeitas ao tratamento com butirato. Assim, foi possível avaliar os efeitos do butirato na captação deste análogo da glicose a diferentes tempos de exposição ao butirato. Até à adição do ^{18}F -FDG as células permaneceram em repouso a 37°C . Após os tempos de incubação referidos, adicionou-se o radiofármaco na concentração de $25 \mu\text{Ci/mL}$. Aos tempos 5, 30, 60, 90 e 120 minutos após a adição do análogo da glicose, retiraram-se $200 \mu\text{L}$ da suspensão celular para *ependorfs* que continham $500 \mu\text{L}$ de PBS gelado, para que o metabolismo das células seja reduzido ao mínimo. Seguidamente, centrifugaram-se as amostras durante 1 minuto a 5600 G. Após a centrifugação aspirou-se o sobrenadante e colocou-se num tubo devidamente identificado. Para garantir a melhor lavagem possível, adicionaram-se $500 \mu\text{L}$ de PBS gelado ao *pellet* e voltou-se a centrifugar nas mesmas condições. Aspirou-se novamente o sobrenadante e colocou-se no mesmo tubo correspondente. Para cada tempo, a experiência foi realizada em duplicado. Por fim, mediuse a radioatividade das duas frações (*pellet* e sobrenadante) num contador de poço (Capintec, Inc. CRC – 15W) em contagens por minuto (CPM). Assim, foi possível determinar a percentagem de captação de ^{18}F -FDG pelas células e traçar o perfil de captação ao longo do tempo recorrendo à seguinte fórmula:

$$\% \text{captação} = \frac{\text{CPM}_{\text{pellet}}}{\text{CPM}_{\text{pellet}} + \text{CPM}_{\text{sobrenadante}}} \times 100$$

Equação 1: Cálculo da percentagem de captação.

3.3.3 Avaliação da expressão do GLUT-1, -3, -5 e -12

É sabido que nos tumores há uma maior expressão dos transportadores de glicose – os GLUT's. Tendo em conta que os GLUT's desempenham um papel fundamental no transporte de glicose e, conseqüentemente no metabolismo celular, torna-se deveras importante perceber até que ponto a sua expressão é alterada na presença de butirato. Os

GLUTs localizam-se preferencialmente na membrana celular onde exercem a sua função de transportadores, contudo também podem encontrar-se no citoplasma, estando desta forma sensíveis a certos estímulos que levam à sua translocação para a membrana. Assim, torna-se essencial determinar a expressão proteica dos GLUTs presentes nestas duas localizações celulares diferentes. Para este trabalho, avaliou-se a expressão basal dos GLUTs nas três linhas celulares cultivadas em meio LG, assim como, a influência do butirato na expressão dos GLUTs a diferentes tempos de exposição.

A avaliação da expressão dos transportadores de glicose, tanto a nível membranar como intracelular, foi feita na ausência de butirato (controlo) e na sua presença após 1 e 24 horas de incubação com as concentrações de butirato já referenciadas previamente para cada linha celular. Para esta avaliação recorreu-se à técnica de citometria de fluxo descrita em 2.2.2.

3.3.3.1 Avaliação da expressão membranar

Para a determinação dos níveis de GLUTs referidos a nível membranar, após tripsinização, as suspensões com 1 milhão de células foram centrifugadas a 1300 G durante 5 minutos. Decantou-se o meio e ressuspendeu-se o *pellet* em PBS, seguindo-se nova centrifugação nas mesmas condições. Decantou-se novamente o sobrenadante e adicionaram-se 2,5 µL do anticorpo (tabela 3). Após homogeneização, as células foram incubadas durante 15 minutos à temperatura ambiente e na ausência de luz. Após este tempo, lavaram-se as células com 2 mL de PBS e procedeu-se a nova centrifugação nas condições acima referidas. Decantou-se novamente o sobrenadante e, no caso das células marcadas com anti-GLUT-1, ressuspendeu-se o *pellet* em 400 µL de PBS e guardaram-se no frio a 4°C até leitura no citómetro. Para a avaliação da expressão dos outros GLUTs foi necessária a adição de um anticorpo secundário. Assim, após a decantação, adicionaram-se 3 µL do anticorpo secundário correspondente (tabela 3). Incubaram-se as células durante 20 minutos à temperatura ambiente e na ausência de luz. Após o tempo de incubação, as células foram lavadas com 2 mL de PBS, centrifugadas como em passos anteriores e, por fim, o sobrenadante decantado e o *pellet* ressuspenso em 400 µL de PBS e estas suspensões guardadas a 4°C até leitura no citómetro.

3.3.3.2 Avaliação da expressão citoplasmática

Para a determinação dos níveis dos GLUTs referidos a nível citoplasmático, após tripsinização, as suspensões com 1 milhão de células foram centrifugadas a 1300 G durante 5 minutos. Decantou-se o meio e ressuspendeu-se o *pellet* em PBS seguindo-se nova centrifugação nas mesmas condições. Decantou-se o sobrenadante e adicionou-se de seguida 100µL de solução de fixação (Immunostep, Intracell). Colocaram-se de seguida as células a repousar no escuro à temperatura ambiente durante 15 minutos. Após esse tempo adicionaram-se 2 mL de PBS para lavar as células, seguindo-se uma centrifugação a 1300 G durante 5 minutos. Nova decantação foi realizada seguindo-se a adição de 100 µL de solução de permeabilização (Immunostep, Intracell) e 2,5 µL do anticorpo pretendido (tabela 3). Durante 15 minutos no escuro e à temperatura ambiente, as células repousaram, tempo após o qual se realizou nova lavagem com 2 mL de PBS seguida de centrifugação nas condições acima referidas. Decantou-se novamente o sobrenadante e, no caso das células em que se ia avaliar a expressão de GLUT-1, ressuspendeu-se o *pellet* em 400 µL de PBS. Para a avaliação da expressão dos outros GLUTs foi necessária a adição de um anticorpo secundário. Assim, após a decantação, adicionaram-se 3 µL do anticorpo secundário correspondente (tabela 3). As células desta vez foram incubadas durante 20 minutos à temperatura ambiente e na ausência de luz. Após a incubação, as células foram lavadas com 2 mL de PBS, centrifugadas como em passos anteriores, o sobrenadante decantado e o *pellet* ressuspensão em 400 µL de PBS. Após a resuspensão com os 400 µL de PBS em ambos os casos, as suspensões foram guardadas a 4°C até leitura no citómetro.

Tanto no caso das moléculas membranares como no das citoplasmáticas as células foram analisadas no citómetro (FACSCalibur) utilizando o comprimento de onda de excitação de 585 nm e os resultados obtidos foram expressos como MIF para a expressão basal em cada linha celular e normalizados ao controlo para os resultados referentes à incubação com butirato.

Tabela 3 – Anticorpos primários e secundários utilizados para determinar a expressão de GLUT-1, -3, -5 e -12.

Anticorpo	Fornecedor	Hospedeiro	Tipo	Molécula a estudo
anti-hGLUT1-PE	R&D Systems FAB1418P	Rato	Primário	GLUT - 1
anti-hGlut3	R&D Systems MAB1415	Rato	Primário	GLUT - 3
anti-hGlut5	R&D Systems BAM1349	Rato	Primário	GLUT - 5
anti-Glut12 (S-12)	Santa Cruz Biotechnology sc - 161659	Cabra	Primário	GLUT - 12
Anti-goat IgG Pe	Santa Cruz Biotechnology sc - 3755	Coelho	Secundário	-
Anti-mouse IgG-Pe	Santa Cruz Biotechnology sc - 3738	Cabra	Secundário	-

3.3.4 Estudos metabólicos por Ressonância Magnética Nuclear

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma técnica muito utilizada para efetuar estudos metabólicos tanto *in vivo* como *in vitro*. A técnica baseia-se no facto de os núcleos atómicos de certos elementos químicos possuírem propriedades magnéticas.. Esta técnica apresenta um carácter não destrutivo e permite-nos estudar vias metabólicas específicas (MALLOY, *et. al.*, 1988).

Para este trabalho experimental prepararam-se frascos com cerca de 80% de confluência de todas as linhas celulares em estudo. Prepararam-se meios, cujas formulações diferiram das usadas para a cultura celular no tipo de glicose usado: DMEM (Gibco, I1966-025) para as linhas WiDr e C2BBel e RPMI-1640 (Sigma, R1383) para a linha LS1034. A estas preparações foi adicionada glicose uniformemente marcada com carbono-13 ([U-¹³C]glicose, Sigma, 389374) na concentração pretendida. Antes da adição do meio com [U-¹³C]glicose, aspirou-se o meio dos frascos preparados. Lavaram-se as células com 5 mL de PBS por três vezes para garantir que não restassem vestígios do meio antigo. Adicionaram-se 14 mL do novo meio e incubaram-se na ausência (controlos) ou presença de butirato (concentrações já referidas para cada linha celular). Às 0, 1, 3, 4, 6, 8, 12 e 24 horas retiraram-se amostras de 200 µL de meio para *ependorfs* devidamente identificados, as quais foram de seguida conservadas a -80°C. Após as 24 horas procedeu-se à extração celular. Para isso, decantou-se o meio e seguiram-se 3 lavagens com 5 mL de PBS. Em seguida, por duas vezes, adicionaram-se 750 µL de MeOH/H₂O 80% (v/v) frio e raspou-se gentilmente com um

raspador de células, transferindo-se seguidamente a suspensão celular para um *eppendorf* identificado. Por fim, centrifugou-se a 4°C durante 5 minutos e a 5725 G com o intuito de separar a fase aquosa (na qual se encontram os metabolitos solúveis) do *pellet* e conservaram-se as duas frações a -80°C. Seguidamente, procedeu-se à evaporação das frações aquosas numa estufa de secagem.

As amostras de meio recolhidas ao longo de vários tempos foram analisadas a 14.1 Tesla por ¹H-RMN com uma sonda de banda larga de 3 mm. Para a preparação das amostras para análise adicionaram-se 160 µL das amostras de meio a 40 µL de uma solução de fumarato de sódio na concentração de 10 mM em D₂O (99,9%), usada como padrão interno para efeitos quantitativos.

Cada espectro de ¹H-RMN consiste em 64 k pontos a definir uma largura espectral de 7200 Hz. Para a obtenção de uma razão sinal/ruído adequada para análise quantitativa foram adquiridos um total de 16 transientes (*scans*), com um pulso de radiofrequências equivalente a 45° e um tempo total de repetição interpulsos de 10 segundos, para possibilitar a completa relaxação nuclear dos prótons de todos os metabolitos presentes.

A fração com os metabolitos resultantes da extração celular foi dissolvida em D₂O (99,9%) para análise por ¹H- e ¹³C-RMN. Os espectros de ¹H-RMN foram obtidos nas mesmas condições do realizado para as amostras de meio, mas com maior número de transientes (nt=128) possibilitando assim a deteção de metabolismos que se encontravam em concentrações mais baixas. Por sua vez, os espectros de ¹³C-RMN foram adquiridos utilizando desacoplamento de banda larga de próton. Um total de 128 k pontos foram adquiridos para definir uma região espectral de 35 kHz. Para a obtenção de uma razão sinal/ruído compatível com a análise metabólica foram adquiridos entre 15000 e 20000 transientes, utilizando um pulso de radiofrequências de 45° e um tempo de repetição de interpulsos de 3 segundos. O período de tempo permitiu uma relaxação total dos carbonos alifáticos, sendo estes essenciais para o estudo realizado.

Para analisar os espectros obtidos recorreu-se ao *software* NUTS^{pro} (Acorn NMR Inc., Livermore, CA). Este software possibilita a desconvolução das ressonâncias constantes em cada espectro/multiplete e, dessa forma, fornece dados que permitem a análise de isotópómeros (isómeros de isótopos) de carbono-13 e a subsequente interpretação metabólica.

A [U-¹³C]glicose após entrar na célula é convertida em duas moléculas de piruvato pela glicólise. O piruvato apresenta por essa via um padrão de enriquecimento em carbono-13

uniforme, $[U-^{13}C]$ lactato, tal como a $[U-^{13}C]$ glicose que lhe deu origem. A enzima LDH (do inglês, *lactate dehydrogenase*) vai converter o piruvato formado em lactato com a mesma marcação. Assim, através da quantificação do $[U-^{13}C]$ lactato é possível determinar o consumo de $[U-^{13}C]$ glicose por via indireta e perceber a intensidade da via da glicólise nas células em estudo e o efeito do butirato no recurso a esta via (PEREIRA, et. al., 2011). Mas, as células não recorrem exclusivamente à glicose como substrato da glicólise e para a produção de lactato. Existem efectivamente outros nutrientes presentes no meio de cultura que podem ser transformados em piruvato e subseqüentemente lactato, que não se encontram enriquecidos, e que portanto podem conduzir a uma diluição do enriquecimento das *pools* respectivas. O lactato produzido com recurso a estas fontes de energia não vai apresentar qualquer tipo de marcação sendo assim de fácil distinção comparativamente ao $[U-^{13}C]$ lactato (Figura 12).

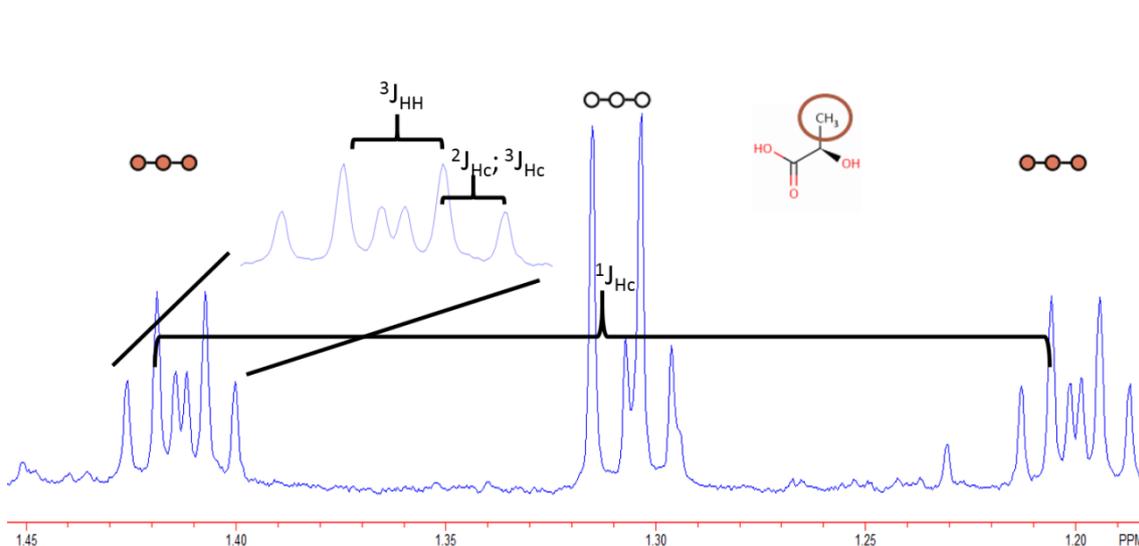


Figura 12 - Expansão da região do espectro RMN relativa ao grupo metilo do lactato. Os dois satélites são referentes ao lactato produzido a partir da $[U-^{13}C]$ glicose enquanto que o duplete central é referente ao lactato que não apresenta qualquer marcação presente no meio e ao próprio lactato produzido por outras fontes não enriquecidas.

O $[U-^{13}C]$ lactato surge no espectro de 1H -RMN representado por dois satélites em que cada um deles é um duplete de tripletos (multipeto). Enquanto que, o espectro referente ao lactato com carbono-12 é representado apenas por um duplete. As diferenças devem-se ao acoplamento adicional que o carbono-13 promove, por ter um *spin* diferente de 0 (o *spin* do carbono-12 é 0). Assim, os multipletos representativos do $[U-^{13}C]$ lactato são referentes à junção de três constantes de acoplamento: uma homo- ($^3J_{HH}=7,0\text{Hz}$) e duas heteronucleares ($^2J_{HC}$ e $^3J_{HC}$, de magnitudes muito similares, $\sim 4,2$ Hz) como é observável na figura 12

(PEREIRA, *et. al.*, 2011). Analisando os espectros RMN de próton do meio de cultura pode-se assim determinar o efeito do butirato de forma indireta na via da glicólise. Como o butirato não apresenta nenhum tipo de marcação (o seu esqueleto carbónico apresenta 4 carbonos- 12 , salvo a pequena contribuição de $\sim 1.1\%$ de abundância natural) o seu pico surge no espectro de ^1H -RMN representado por dois conjuntos de sinais sendo que cada um deles, relativo ao grupo metilo, surge como um tripleto e é o que permite melhor quantificação pela sua localização no espectro e simplicidade espectral. Para se saber as concentrações do $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ lactato, do butirato, e do lactato sem marcação foi preciso recorrer a um controlo de concentração conhecida, a valina. A escolha deste aminoácido como controlo deveu-se também ao seu pico no espectro de ^1H -RMN se manter essencialmente constante, o que demonstra que este aminoácido não está a ser consumido pelas células mantendo-se a sua concentração constante ao longo dos tempos de incubação celular utilizados nestes estudos. Em suma, os picos quantificados nos espectros de ^1H -RMN das amostras de meio foram: $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ lactato; lactato, valina e butirato quando presente (Figura.13).

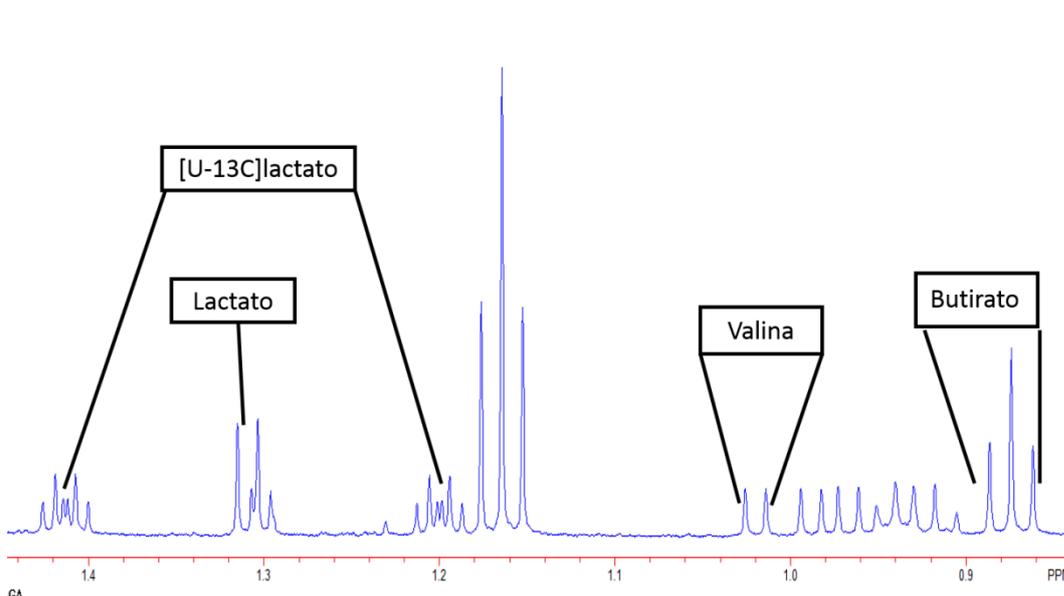


Figura 13 -Expansão do espectro de ^1H -RMN de uma amostra de meio usado para células WiDr incubadas com butirato. Como ressonâncias principais temos as respeitantes ao $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ lactato, ao lactato não marcado, à valina e ao grupo metilo do butirato.

O piruvato, produto final da glicólise, não é apenas convertido em lactato. Existem 4 vias de utilização possíveis para este metabolito, os chamados “fados do piruvato”.

Quanto maior for a quantidade de NADH citosólico resultante do processo glicolítico mais ativa se torna a LDH no seu processo de conversão de piruvato em lactato (“fado” representado na figura 14 por F_2). Quando estes níveis de NADH são reduzidos o piruvato é

convertido em alanina pela aminotransferase (ALT) (“fado” representado na figura 14 por F₃). Uma outra via alternativa é a catalisada pela enzima piruvato carboxilase (PC) que, por carboxilação, conduz à formação de oxaloacetato, um intermediário do ciclo de Krebs (“fado” representado na figura 14 por F₄). O piruvato pode também ser convertido, na mitocôndria, a acetil-CoA pela enzima PDH (do inglês, *pyruvate dehydrogenase*) à qual se vai ligar uma molécula de oxaloacetato por ação da citrato sintase (CS) sendo o produto resultante uma molécula de citrato, um intermediário do ciclo de krebs (“fado” representado na figura 14 por F₁).

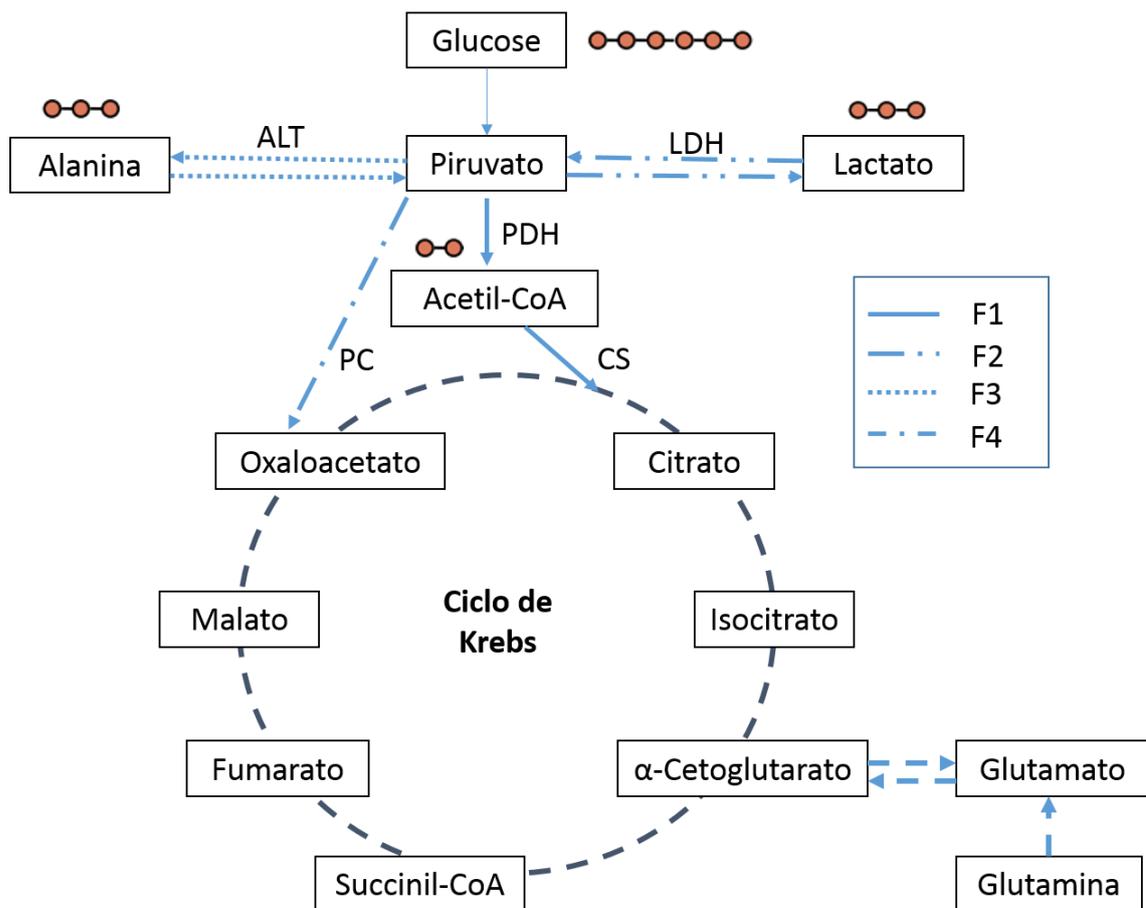


Figura 14 - Esquema representativo dos possíveis destinos do piruvato resultante do processo glicolítico com recurso à [U-¹³C]glicose. São representados 4 destinos: F₁ – oxidação no ciclo de Krebs; F₂ – fermentação láctica; F₃ – transaminação; F₄ – carboxilação.

Como o piruvato possui marcação nos seus carbonos, os intermediários resultantes também irão incorporar a marcação. Para se avaliar esta incorporação recorre-se ao glutamato, um dos aminoácidos mais abundantes no nosso organismo. Este, apesar de não fazer parte do ciclo de Krebs, encontra-se em equilíbrio com um intermediário, o α-

cetoglutarato. O recurso ao glutamato e a esta avaliação indireta da incorporação da marcação deve-se à maior concentração intracelular deste, tornando mais fácil a deteção pela técnica de RMN. Com o aumento do número de voltas do ciclo, maior é a incorporação de carbono-13 nos intermediários e, conseqüentemente, de glutamato (Figura 15). Assim, a determinação da taxa de incorporação do glutamato confere uma medida da velocidade do ciclo. Isto porque, na primeira volta do ciclo são originados intermediários com dupla marcação. O α -cetoglutarato é marcado nos carbonos 4,5 logo após a entrada de $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ acetil-CoA e por equilíbrio com a *pool* de glutamato conduz à marcação deste nas mesmas posições. Com a continuação de entrada de $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ acetil-CoA surgem novas marcações, levando ao aparecimento de intermediários triplamente marcados. Com a continuação da atividade do ciclo, cada vez surgem mais intermediários multi-enriquecidos e, assim, uma medição da razão entre os intermediários multi-enriquecidos e duplamente enriquecidos permite uma avaliação da velocidade do ciclo.

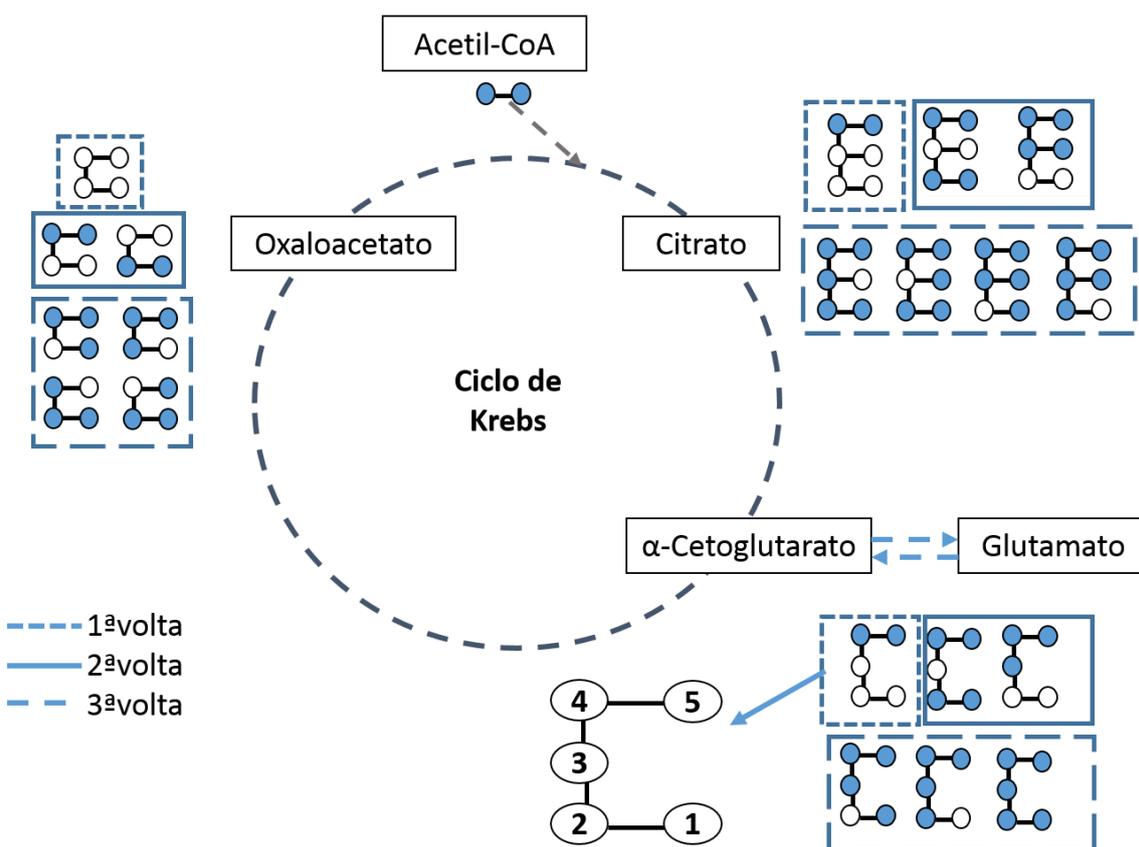


Figura 15 - Esquema representativo das diferentes marcações com carbono-13 em intermediários do ciclo de Krebs e no glutamato durante três voltas e respectivas posições da marcação no glutamato.

Quando ocorrem pelo menos duas voltas no ciclo, o glutamato apresenta os carbonos 3,4 e 5 enriquecidos. Recorrendo ao espectro de ^{13}C -RMN dos extratos de metanol das células é possível quantificar a abundância destas marcações no glutamato. A ressonância do carbono 4 do glutamato, possui um duplete (D45) que reflete as moléculas com marcação simultânea nos carbonos 4 e 5, e um quarteto/pseudoquarteto (Q) que reflete a marcação simultânea nos carbonos 3,4 e 5 de acordo com o representado na figura 16 (PEREIRA, *et. al.*, 2011).

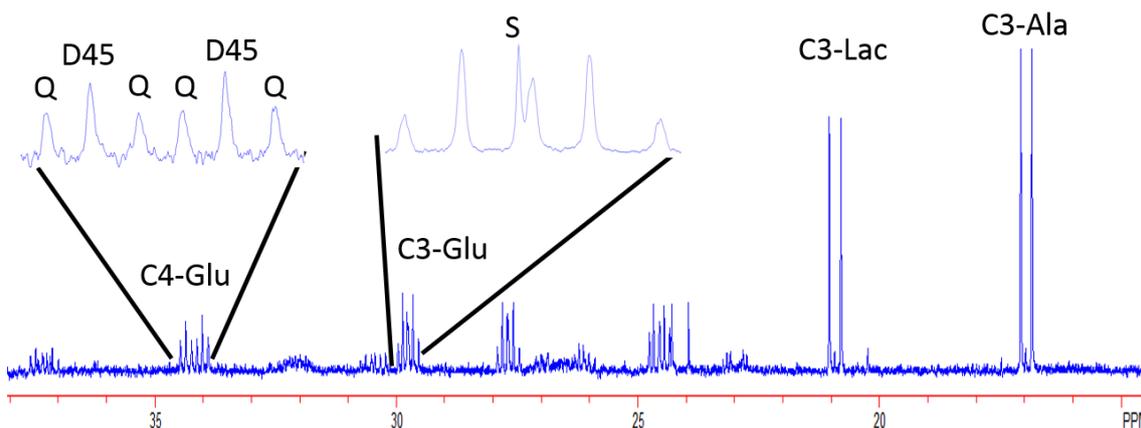


Figura 16 -Expansão do espectro de ^{13}C -RMN do extrato de metanol de células C2BBel incubadas com butirato. Como ressonâncias principais temos as respeitantes ao carbono 3 do lactato (C3-Lac), ao carbono 3 da alanina (C3-Ala) e aos carbonos 3 (C3-Glu) e 4 (C4-Glu) do glutamato. Nas expansões está representado o multipletto referente ao C4-Glu com a designação dos respetivos multiplettos (Q – quarteto; D45 – duplete) e está representado o multipletto referente ao C3-Glu com o destaque para o pico singletto (S) que incorpora a componente devida à abundância natural (N).

Assim, quanto maior a razão Q/D45 dos multiplettos, maior a velocidade do ciclo, maior a oxidação da $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ glicose nas células e maior o recurso ao ciclo de Krebs para a obtenção de equivalentes redutores que irão produzir energia pela cadeia respiratória mitocondrial. Recorrendo às marcações no glutamato é possível ainda determinar outra razão importante que nos indicará a maior ou menor envolvimento de fluxos biossintéticos nas células, ou seja o maior ou menor recurso à anaplerose. O “fado do piruvato” representado na figura 14 por F_4 , está diretamente relacionado com a anaplerose. Como o piruvato marcado uniformemente sofre ação da PC e é convertido em oxaloacetato, a marcação no glutamato será mais intensa nos carbonos 2 e 3 por resultado do *turnover* único do ciclo de Krebs. Assim, para avaliar a intensidade da anaplerose recorreu-se à razão C3-Glu/C4-Glu, cujo aumento indicará também aumento deste fluxo. Recorreu-se também à quantificação do singletto do carbono 3 do glutamato e à determinação da sua razão na

totalidade da marcação desse carbono para inferir quanto à influência que o butirato poderá provocar na marcação com carbono ^{13}C proveniente da glicose uniformemente marcada no glutamato. Este singlete é referente a uma única marcação com carbono- ^{13}C no esqueleto deste.

Para medir o acoplamento entre a glicólise e o ciclo de Krebs, recorreu-se também, aos espetros de ^{13}C -RMN dos extratos de metanol das células com o intuito de determinar a razão entre a marcação do carbono 3 do lactato com o carbono 4 do glutamato. Esta razão é tanto menor quanto maior for esse acoplamento e menos dependentes estiverem as células do processo glicolítico para a obtenção de energia. Outra razão avaliada foi a marcação do carbono 3 do lactato com a marcação do carbono 3 da alanina. Esta razão permite avaliar os diferentes estados redox no citosol (Nunes *et al.*, 2011). Todas as razões determinadas serviram para comparar o efeito do butirato nas mesmas, comparando-se assim as razões nas células incubadas com o butirato com as das células controlo, com o intuito de determinar o efeito no butirato na atividade metabólica das células de cancro colorretal. Para determinar se o butirato realmente estava a ser captado pelas células quantificou-se a área referente ao grupo metilo do butirato do espectro ^1H -RMN dos extratos celulares.

3.4 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.

Na análise da proliferação celular segundo o teste do MTT, os valores experimentais obtidos foram ajustados a um modelo sigmoidal de concentração-resposta utilizando o software OriginLab v. 8.0:

$$\text{Proliferação (\%)} = \frac{100}{1 + 10^{p \cdot (\log x_0 - x)}}$$

onde x_0 corresponde ao valor que inibe a proliferação a 50% (IC_{50}). A comparação dos valores obtidos entre diferentes condições terapêuticas, dentro da mesma linha celular e entre linhas celulares para a mesma condição terapêutica foi realizada segundo o teste

ANOVA de um factor, com comparações múltiplas de acordo com a correção de Bonferroni.

A comparação entre as condições experimentais para cada linha celular no que respeita aos tipos de morte celular e aos resultados obtidos por RMN foi realizada segundo o teste *Analysis of Variance* (ANOVA) de um fator (no caso de distribuição normal e homogeneidade de variâncias) ou segundo o teste Kruskal-Wallis (caso contrário). As comparações múltiplas foram realizadas segundo a correção de Bonferroni.

Na comparação da expressão de GLUTs e da razão BAX/BCL-2 com o controlo, foi utilizado o teste *t* de Student para uma média, comparando com o valor de padronização (controlo igual a 1). 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. As comparações foram corrigidas pelo método de Bonferroni. A comparação entre linhas celulares foi realizada utilizando o teste ANOVA de um fator ou o teste Kruskal-Wallis (de acordo com os critérios mencionados previamente). As comparações múltiplas foram realizadas segundo a correção de Bonferroni.

Na análise de captações de ^{18}F -FDG, os valores experimentais obtidos foram ajustados a um modelo exponencial utilizando o *software* OriginPro (OriginLab Corporation, Northampton, EUA), versão 8.0:

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

onde A representa a 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 fator, com comparações múltiplas segundo a correção de Bonferroni.

Os valores experimentais obtidos para a produção de lactato por RMN foram ajustados a um modelo linear utilizando o *software* OriginPro (OriginLab Corporation, Northampton, EUA), versão 8.0:

$$y = m \cdot x$$

onde m representa o declive da reta. Este parâmetro foi comparados entre condição controlo e tratamento segundo o teste *t* de Student para amostras independentes.

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

4. RESULTADOS

Os métodos descritos no capítulo anterior foram utilizados com o intuito de avaliar o efeito citotóxico do butirato nas três linhas a estudo (4.1) e posteriormente o efeito do butirato no metabolismo das mesmas células tumorais (4.2).

4.1 Avaliação da citotoxicidade do Butirato*

4.1.1 Avaliação da actividade metabólica pelo ensaio de MTT em condições HG

O ensaio do MTT permitiu obter valores de actividade metabólica em resposta à incubação com diferentes concentrações de butirato, em percentagem, relativa a culturas celulares não tratadas, às quais foi atribuído o valor de actividade metabólica de 100%. Estes valores permitiram traçar as curvas concentração-resposta.

Para este estudo utilizaram-se as linhas celulares C2BBe1, LS1034, WiDr e CCD 841 CoN cultivadas em meios HG. Os tempos de incubação para a realização deste protocolo foram de 24, 48, 72 e 96 horas e as concentrações variaram entre 1 mM e 50 mM para 24 horas de incubação e entre 1 mM e 20 mM para os outros tempos com exceção da linha CCD 841 em que os tempos de incubação foram de 48 e 72 horas e as concentrações de butirato utilizadas variaram entre 1 mM e 30 mM. Na figura 17 são apresentados os gráficos das curvas concentração-resposta das linhas celulares LS1034, C2BBe1 e WiDr. Na figura 18 são apresentados os gráficos das curvas de concentração-resposta para as 4 linhas aos tempos de incubação de 48 e 72 horas.

*Os resultados apresentados ao longo deste capítulo foram obtidos em coautoria com o Licenciado João Carlos Crispim da Costa da Encarnação.

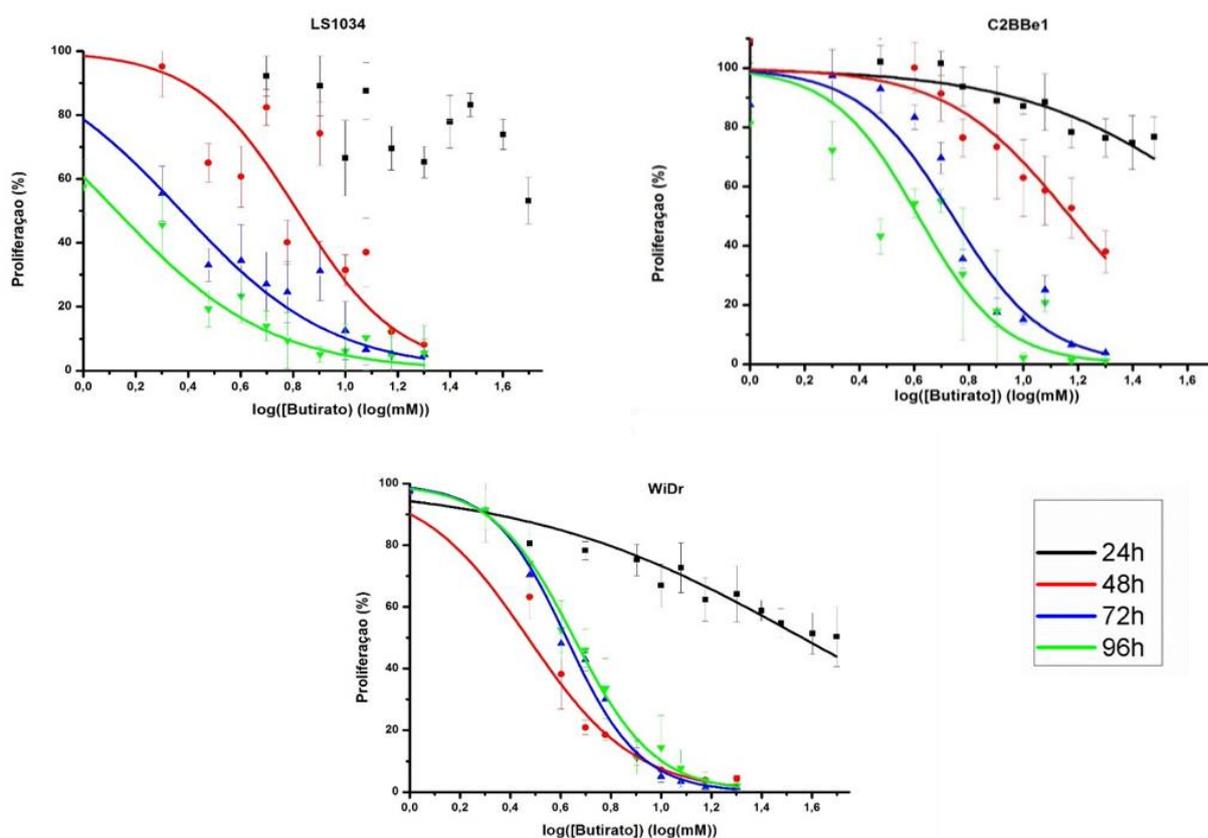


Figura 17 - Curvas de concentração-resposta das três linhas celulares em resposta à incubação com butirato. Avaliação da proliferação pelo ensaio de MTT a 24, 48, 72 e 96 horas após a incubação com o composto em estudo nas linhas celulares LS1034, C2BBe1 e WiDr. Os resultados expressam a média e o desvio padrão de pelo menos 3 experiências independentes realizadas em duplicado ($n \geq 6$).

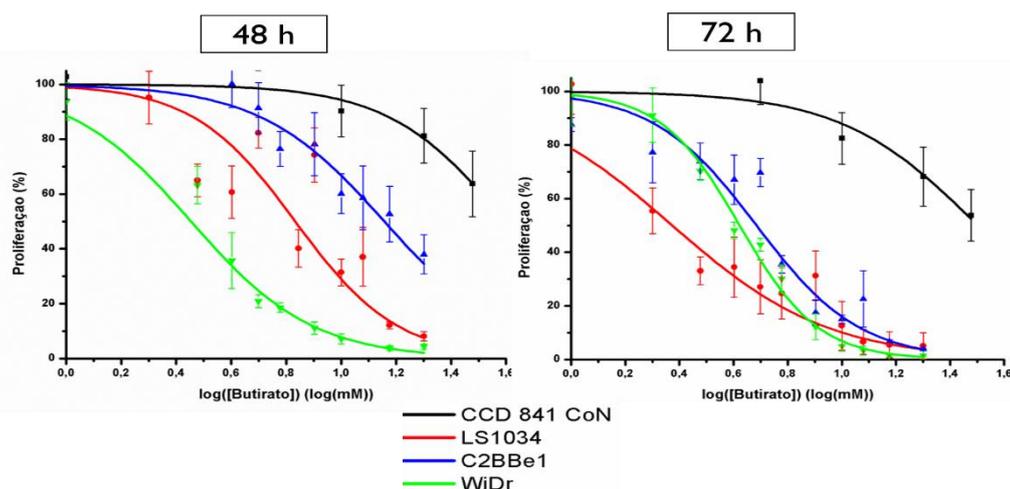


Figura 18 - Curvas de concentração-resposta das 4 linhas celulares em resposta à incubação com butirato. Avaliação da proliferação pelo ensaio de MTT a 48 e 72 horas após a incubação com o composto em estudo nas linhas celulares LS1034, C2BBe1, WiDr e CCd 841 CoN. Os resultados expressam a média e o desvio padrão de pelo menos 3 experiências independentes realizadas em duplicado ($n \geq 6$).

A partir das curvas de concentração-resposta foi possível determinar os valores de IC_{50} apresentados na tabela 4.

Tabela 4: Valores de IC_{50} , r^2 e intervalos de confiança obtidos para as linhas celulares LS1034, C2BBel e WiDr, quando incubadas com butirato para os diferentes tempos de incubação.

Linha celular	Tempos de Incubação	IC_{50} (mM)	r^2	Intervalo de confiança (mM)
LS1034	24h	*	*	
	48h	6,81	0,90	[5,03; 9,21]
	72h	2,36	0,88	[1,68; 3,32]
	96h	1,34	0,93	[1,01; 1,77]
C2BBel	24h	*	*	
	48h	14,36	0,88	[10,76; 19,16]
	72h	4,84	0,96	[3,86; 6,05]
	96h	4,17	0,90	[2,95; 5,89]
WiDr	24h	*	*	
	48h	2,84	0,96	[2,14; 3,78]
	72h	4,19	0,98	[3,86; 4,55]
	96h	4,44	0,98	[3,79; 5,20]
CCD 841 CoN	48h	*	*	
	72h	*	*	

*- Não foi possível calcular

Através da análise da figura 17 constata-se que o butirato possui um efeito inibitório nas 3 linhas de estudo, em todos os tempos estudados, com exceção das 24 horas de incubação para o qual não foi possível determinar os IC_{50} , e que esse efeito é dependente da concentração do composto. Nas linhas celulares LS1034 e C2BBel o efeito antiproliferativo também é dependente do tempo de incubação, na medida em que quanto maior o tempo de incubação, menor o valor de IC_{50} , o que não acontece para a linha celular WiDr.

Pela observação da figura 18 é possível concluir que as três linhas celulares de cancro colorretal são mais sensíveis ao butirato do que a linha normal CCD 841 CoN para os dois tempos a estudo.

Através da análise dos valores da tabela 4 foi possível verificar que na linha LSI034, para os tempos de incubação de 48, 72 e 96 horas, os valores de IC_{50} determinados foram respetivamente 6,81, 2,36 e 1,34 mM de butirato, evidenciando o decréscimo da proliferação celular com o aumento do tempo de incubação mas, apenas se verificam diferenças significativas entre as 48 e as 96 horas ($p=0,011$). De realçar também que o IC_{50} obtido às 96 horas nesta linha (1,34 mM) é o valor mais baixo encontrado em todas as linhas celulares que foram estudadas. Na linha C2BBel, os valores de IC_{50} diminuem com o aumento do tempo de incubação, obtendo-se valores de 14,36, 4,84 e 4,17 mM, para as 48, 72 e 96 horas, respetivamente, contudo, sem diferenças estatisticamente significativas. Por sua vez, na linha WiDr obtiveram-se os valores 2,84, 4,19 e 4,44 mM de IC_{50} para os tempos de 48, 72 e 96 horas, respetivamente, não se verificando, no entanto, diferenças estatisticamente significativas. Na linha CCD 84I com não foi possível determinar o IC_{50} com as concentrações testadas (a máxima foi de 30 mM).

Comparando os IC_{50} das quatro linhas celulares é possível concluir que a linha LSI034 é a que apresenta os IC_{50} mais baixos para os maiores tempos de incubação, e a linha C2BBel a que apresenta o maior IC_{50} para as 48 horas entre as linhas celulares tumorais.

4.1.2 Avaliação da viabilidade celular e tipos de morte induzida

Após a avaliação da atividade metabólica e de acordo com os resultados observados, tendo em conta a diminuição da atividade metabólica na presença de butirato, foi necessária a avaliação da viabilidade celular e das vias de morte. Os resultados encontram-se apresentados na figura 19.

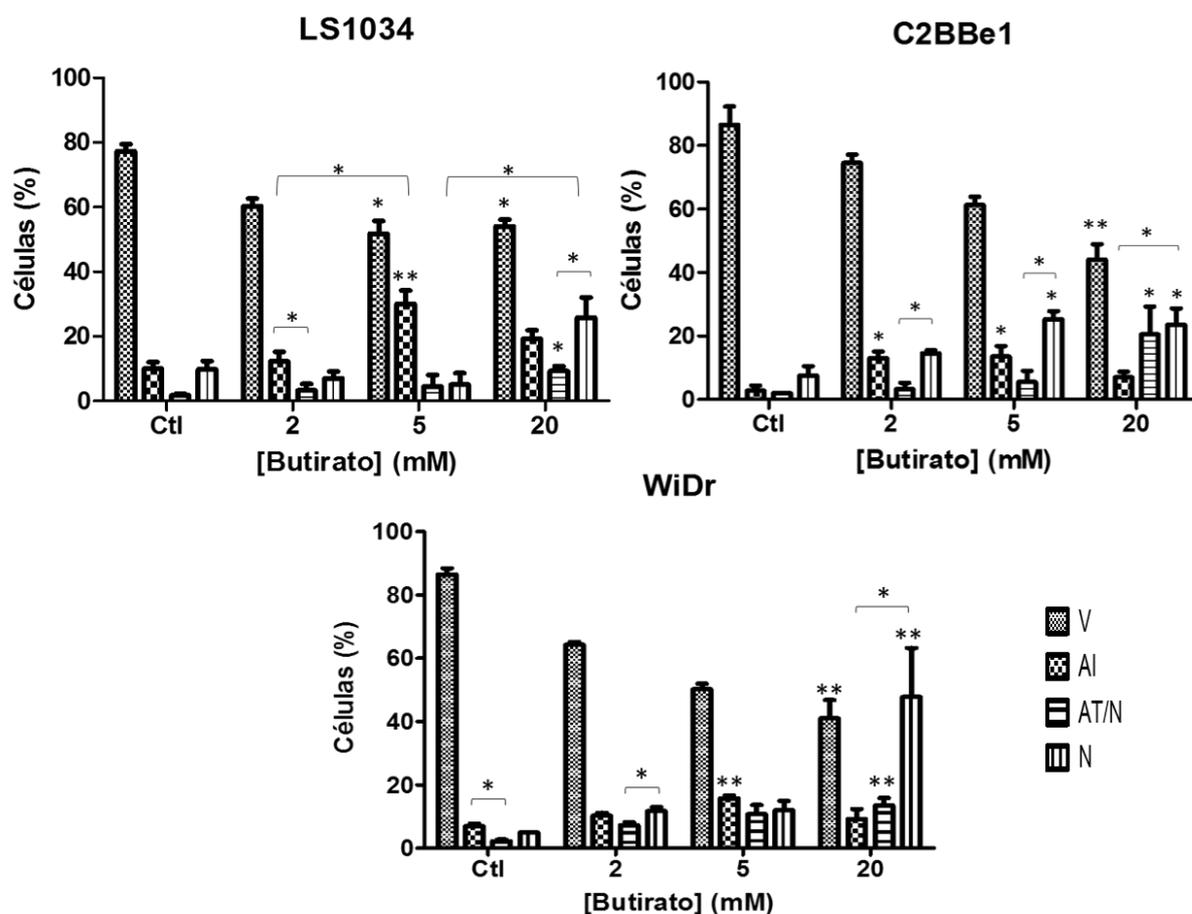


Figura 19 - Viabilidade e vias de morte celular. Os resultados foram obtidos por citometria de fluxo através da dupla marcação com AV/IP, 48h horas após a incubação das linhas celulares LS1034, C2BBel e WiDr com as diferentes concentrações de butirato. Os resultados estão representados como a percentagem 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 pelo menos duas experiências independentes realizadas em duplicado ($n \geq 4$). As diferenças significativas relativamente ao controlo estão representadas por * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

Pela observação da figura 19 podemos constatar que nas três linhas celulares, a exposição ao butirato induz uma diminuição da percentagem de células viáveis, em comparação com o controlo.

Na linha celular LS1034 verificou-se uma diminuição das células viáveis para as três concentrações de butirato em estudo, mas apenas para as concentrações de 5 mM e 20 mM se verificou significância estatística ($p=0,011$ e $p=0,031$, respetivamente). Em relação aos tipos de morte induzida pelo butirato para esta linha verificou-se um aumento da percentagem de células em apoptose inicial com a concentração de 5 mM com significância estatística relativamente ao controlo ($p=0,006$). Este aumento também foi verificado com significância estatística relativamente à concentração de 2 mM ($p=0,042$). No que diz respeito à concentração de 20 mM verificou-se, nesta linha, um aumento da percentagem de

células nos vários tipos de morte celular relativamente ao controlo. Contudo, apenas se verificou significância estatística em relação ao controlo para as células em apoptose tardia/necrose ($p=0,03$). Nesta condição verificou-se, ainda, um aumento significativo da percentagem de células em necrose relativamente à condição de 5 mM ($p=0,015$) sendo este o tipo de morte predominante na condição de 20 mM.

Na linha C2BBel verificou-se uma diminuição da percentagem de células viáveis relativamente ao controlo para as três concentrações de butirato a estudo, sendo essa diminuição tanto maior quanto maior a concentração de butirato. Contudo, apenas se verificou significância estatística para a condição de 20 mM ($p=0,002$) em relação ao controlo. Para a condição de 2 mM verificou-se um aumento da percentagem de células em apoptose inicial relativamente ao controlo ($p=0,022$), não se verificando diferenças significativas para as restantes populações. Quando as células são tratadas com 5 mM de butirato, verifica-se um aumento estatisticamente significativo da percentagem de células em apoptose inicial e em necrose relativamente ao controlo ($p=0,018$ e $p=0,028$, respetivamente). Por sua vez, na condição de 20 mM verificou-se um aumento estatisticamente significativo da percentagem de células em apoptose tardia/necrose e em necrose relativamente ao controlo ($p=0,012$ e $p=0,01$, respetivamente).

Na linha celular WiDr verificou-se uma diminuição da percentagem de células viáveis relativamente ao controlo, sendo essa diminuição tanto maior quanto maior a concentração de butirato. Esta diminuição apenas apresentou diferenças estatisticamente significativas para a concentração de 20 mM ($p=0,002$). Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas relativamente ao controlo para a condição de 2 mM de butirato apesar da tendência para a diminuição da viabilidade celular quando comparado com o controlo. Na condição de 5 mM verifica-se também um aumento da percentagem de células nos três tipos de morte em estudo encontrando-se diferenças estatisticamente significativas para a percentagem de células em apoptose inicial ($p=0,006$). Para a condição de 20 mM verificou-se uma predominância estatisticamente significativa de células mortas por necrose ($p=0,002$), quando comparados todos os tipos de morte com o controlo. Verificou-se também um aumento estatisticamente significativo para a percentagem de células em apoptose tardia/necrose para esta condição ($p=0,005$).

Na condição de 2 mM e de 5mM de butirato, a linha celular C2BBel é a que apresenta maior percentagem de células viáveis, apresentando diferenças estatisticamente significativas com a linha LS1034 ($p=0,006$) para a concentração mais baixa e com a linha WiDr ($p=0,036$) para a concentração intermédia. Quando se incubaram as células com 20 mM de butirato, a

linha LS1034 foi a que apresenta uma maior percentagem de células que não se encontram em nenhum dos tipos de morte em estudo, apresentando diferenças estatisticamente significativas com a linha WiDr ($p=0,024$).

4.1.3 Avaliação da expressão de BAX e BCL-2

Para determinar a razão da expressão da proteína pro-apoptótica BAX e da proteína anti-apoptótica BCL-2 recorreu-se à citometria de fluxo. O gráfico da figura 20 mostra os valores obtidos nas três linhas celulares em estudo, para diferentes concentrações, calculados em relação às culturas controlo.

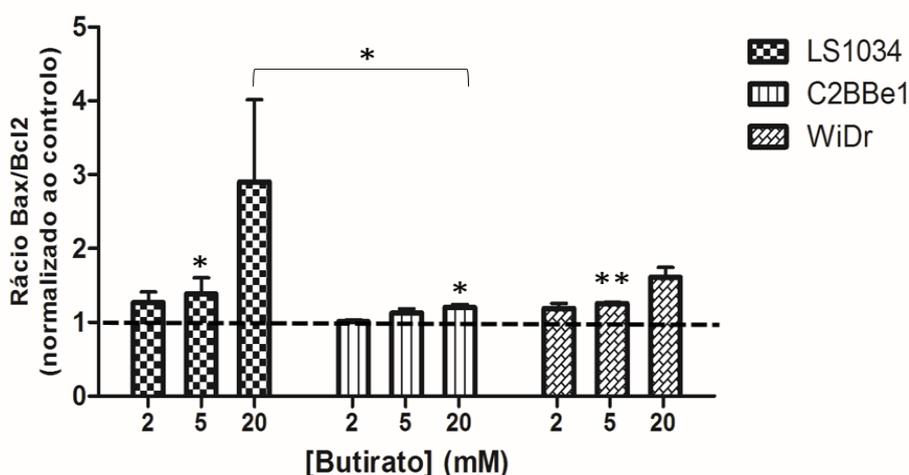


Figura 20 -Análise da expressão das proteínas BAX e BCL-2 em resposta ao butirato. Os resultados apresentados são expressos em razão BAX/BCL-2 normalizada ao controlo para cada uma das condições em estudo. O estudo foi realizado nas linhas celulares LS1034, WiDr, e C2BBel após incubação com 3 concentrações distintas de butirato por 48 horas. Os resultados exprimem a média e o desvio padrão de 3 experiências independentes. As diferenças significativas relativamente ao controlo estão representadas por * $p<0,05$ e ** $p<0,01$.

Pela observação da figura 20 verifica-se que a a razão entre as proteínas BAX e BCL-2 aumenta após incubação com butirato, tendo-se verificado diferenças estatisticamente significativas em todas as linhas numa das condições a estudo.

Na linha celular LS1034 verificou-se um aumento da razão com o aumento da concentração de butirato. Contudo, apenas se verificaram diferenças estatisticamente significativas relativamente ao controlo após a incubação com 5 mM de butirato ($p=0,024$).

Na linha C2BBeI verificou-se um aumento estatisticamente significativo na razão BAX/BCL-2 para a condição de 20 mM comparativamente ao controlo ($p=0,018$).

Para a linha WiDr verificou-se um aumento na razão a estudo nas três condições de incubação, mas apenas se verificaram diferenças significativas relativamente ao controlo após a incubação com 5 mM de butirato ($p=0,006$).

Comparando as diferentes linhas para as mesmas concentrações de butirato verificou-se também que a linha LS1034 apresentou o maior aumento na razão BAX/BCL-2, com diferenças estatisticamente significativas para a condição de 20 mM quando comparada com a mesma condição da linha C2BBeI ($p=0,012$).

4.2 O Butirato e o metabolismo tumoral

4.2.1 Avaliação da proliferação celular pelo ensaio de MTT em condições de baixa concentração de glicose (LG)

Tendo em conta as condições de cultura das linhas celulares no que diz respeito à concentração de glicose de 25 mM, esta concentração não corresponde à concentração presente no sangue do humano na situação normal. Desta forma houve a necessidade de realizar as experiências com uma concentração de glicose no meio de cultura de 5 mM. Na figura 21 são apresentados os gráficos das curvas concentração-resposta referentes à realização deste ensaio nas três linhas celulares em condições LG.

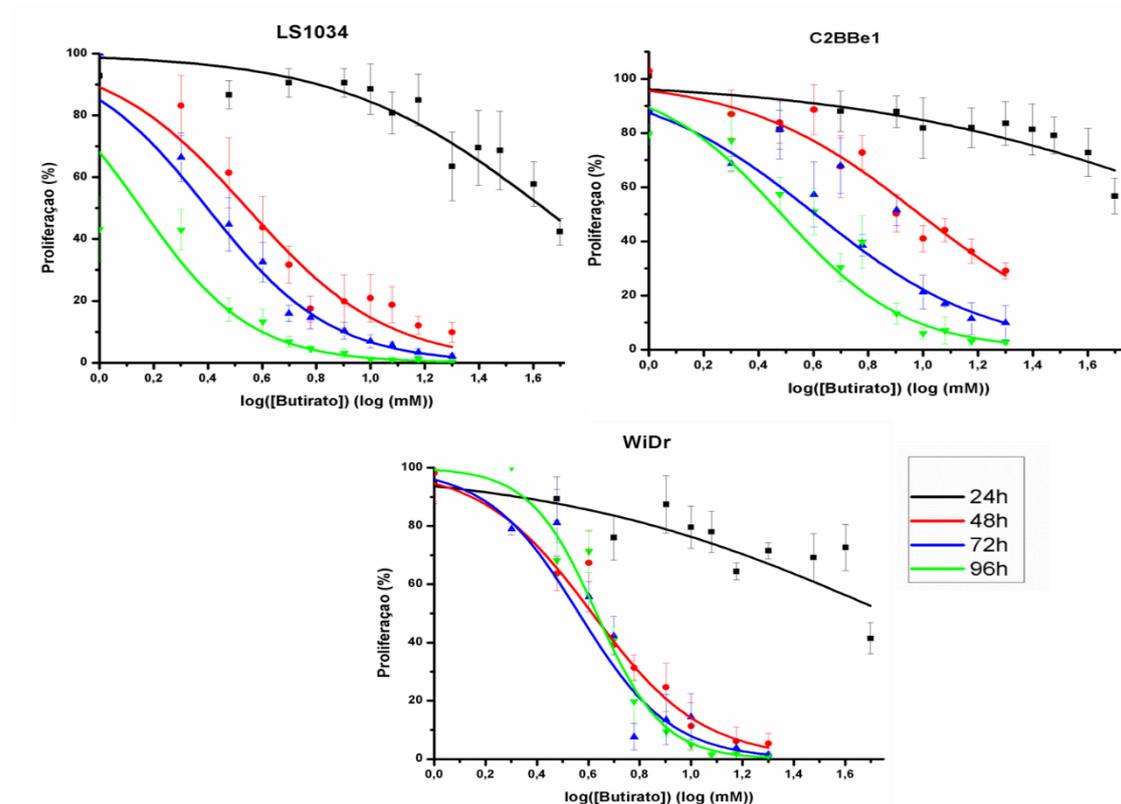


Figura 21 - Curvas de concentração-resposta das três linhas celulares em resposta à incubação com butirato. Avaliação da actividade metabólica pelo ensaio de MTT a 24, 48, 72 e 96 horas após a incubação com o composto em estudo nas linhas celulares LS1034 , C2BBel e WiDr. Os resultados expressam a média e o desvio padrão de pelo menos 3 experiências independentes em duplicado ($n \geq 6$).

A partir das curvas de concentração-resposta foi possível determinar os valores de IC_{50} apresentados na tabela 5.

Tabela 5: Valores de IC_{50} , r^2 e intervalos de confiança obtidos para as linhas celulares LSI034, C2BBe1 e WiDr, quando incubadas com butirato, em condições LG e para os diferentes tempos de incubação.

Linha celular	Tempos de Incubação	IC_{50} (mM)	r^2	Intervalo de confiança
LSI034	24h	43,54	0,91	[32,97; 57,52]
	48h	3,50	0,92	[2,76; 4,96]
	72h	2,50	0,96	[2,03; 3,08]
	96h	1,42	0,90	[1,11; 1,83]
C2BBe1	24h	*	*	
	48h	9,74	0,94	[8,40; 11,30]
	72h	4,05	0,93	[3,12; 5,27]
	96h	3,04	0,96	[2,33; 3,98]
WiDr	24h	*	*	
	48h	4,11	0,98	[3,71; 4,58]
	72h	3,65	0,98	[3,00; 4,50]
	96h	4,27	0,97	[3,65; 5,02]

*- Não foi possível calcular

Através da análise da figura 21 constata-se que o butirato possui um efeito inibitório nas 3 linhas celulares em estudo nas condições de LG e que esse efeito é dependente da concentração do composto.

Através da análise dos valores presentes na tabela 5 é possível constatar que a linha celular LSI034 foi a única em que foi possível determinar o IC_{50} para as 24 horas de incubação com butirato. Os valores de IC_{50} nesta linha para as 48, 72 e 96 horas de incubação com butirato foram respetivamente 3,50, 2,50, 1,42 mM. Verifica-se, assim, que o valor de IC_{50} diminui com o aumento do tempo de exposição ao butirato. Apesar dessa diminuição apenas se verificaram diferenças estatisticamente significativas comparando os valores de IC_{50} das 48, 72 e 96 horas com o IC_{50} correspondente às 24 horas de incubação ($p=0,0005$, $p=0,00008$ e $p=0,00001$ respetivamente). O valor do IC_{50} às 96 horas é sempre o valor mais baixo encontrado para a condição de LG nas três linhas celulares.

Quanto à linha celular C2BBe1, foi possível determinar o IC_{50} para os tempos de 48, 72 e 96 horas sendo os respetivos valores de 9,74, 4,05, 3,04 mM. Assim, verifica-se que os valores de IC_{50} diminuíram com o aumento do tempo de exposição ao composto a estudo

verificando-se uma diminuição estatisticamente significativa entre os IC_{50} das 72 e 96 horas relativamente ao das 48 horas ($p=0,009$ e $p=0,0007$, respetivamente).

Em relação à linha celular WiDr, dos três valores de IC_{50} que foi possível determinar, não se verificaram diferenças dependentes do tempo de incubação. Os valores de IC_{50} para as 48, 72 e 96 horas foram respetivamente 4,11, 3,65 e 4,27, não apresentando diferenças com significado estatístico.

Através das curvas de concentração-resposta apresentadas na figura 17 e das apresentadas na figura 21 foi possível fazer a comparação das diferenças do efeito do butirato na proliferação celular das linhas a estudo na condição de HG e LG. As figuras 22, 23 e 24 representam as curvas concentração-resposta das três linhas celulares, LSI034, C2BBel e WiDr em condições de cultura HG e LG.

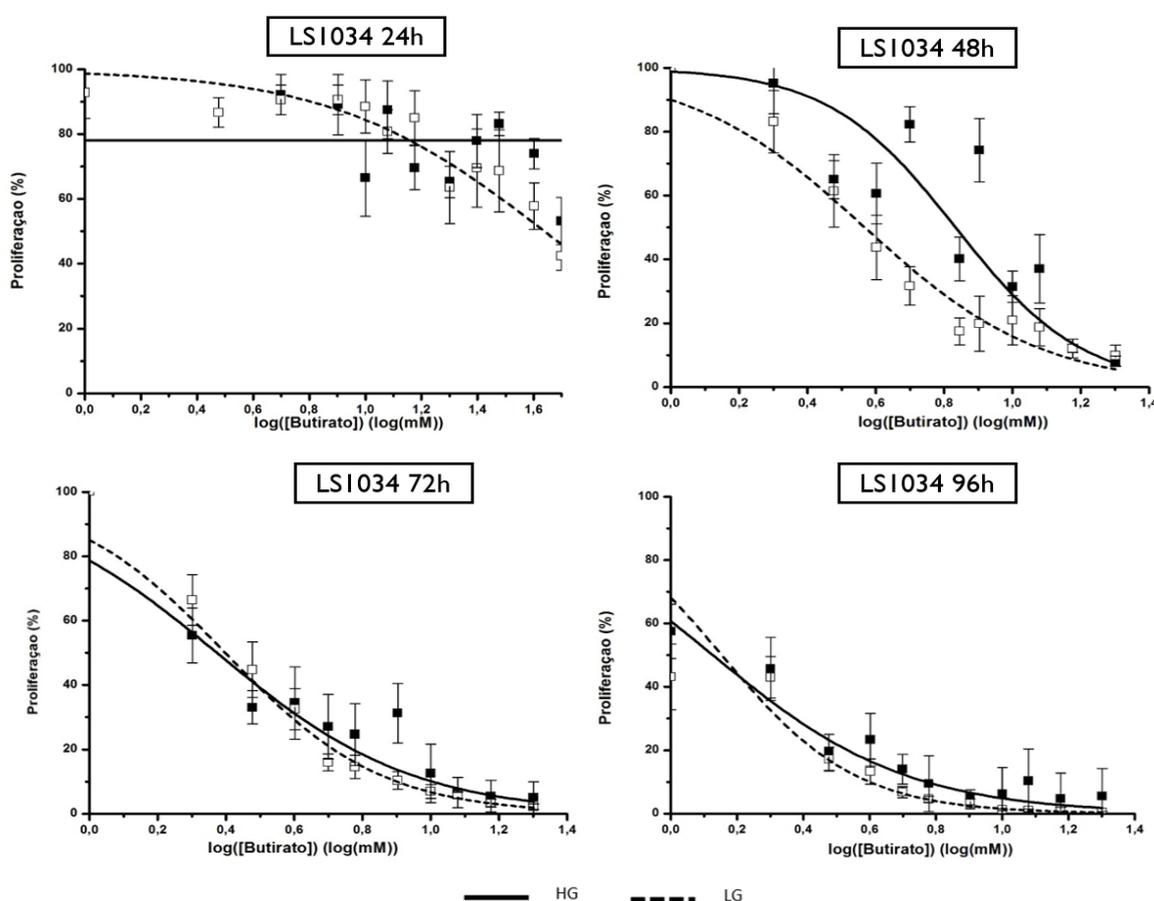


Figura 22 - Curvas de concentração-resposta da linha celular LSI034 em resposta à incubação com butirato nas condições HG e LG. Avaliação da proliferação pelo ensaio de MTT a 24, 48, 72 e 96 horas após a incubação com o composto em estudo na linha celular LSI034 nas condições HG e LG. Os resultados expressam a média e o desvio padrão de pelo menos 3 experiências independentes em duplicado ($n \geq 6$).

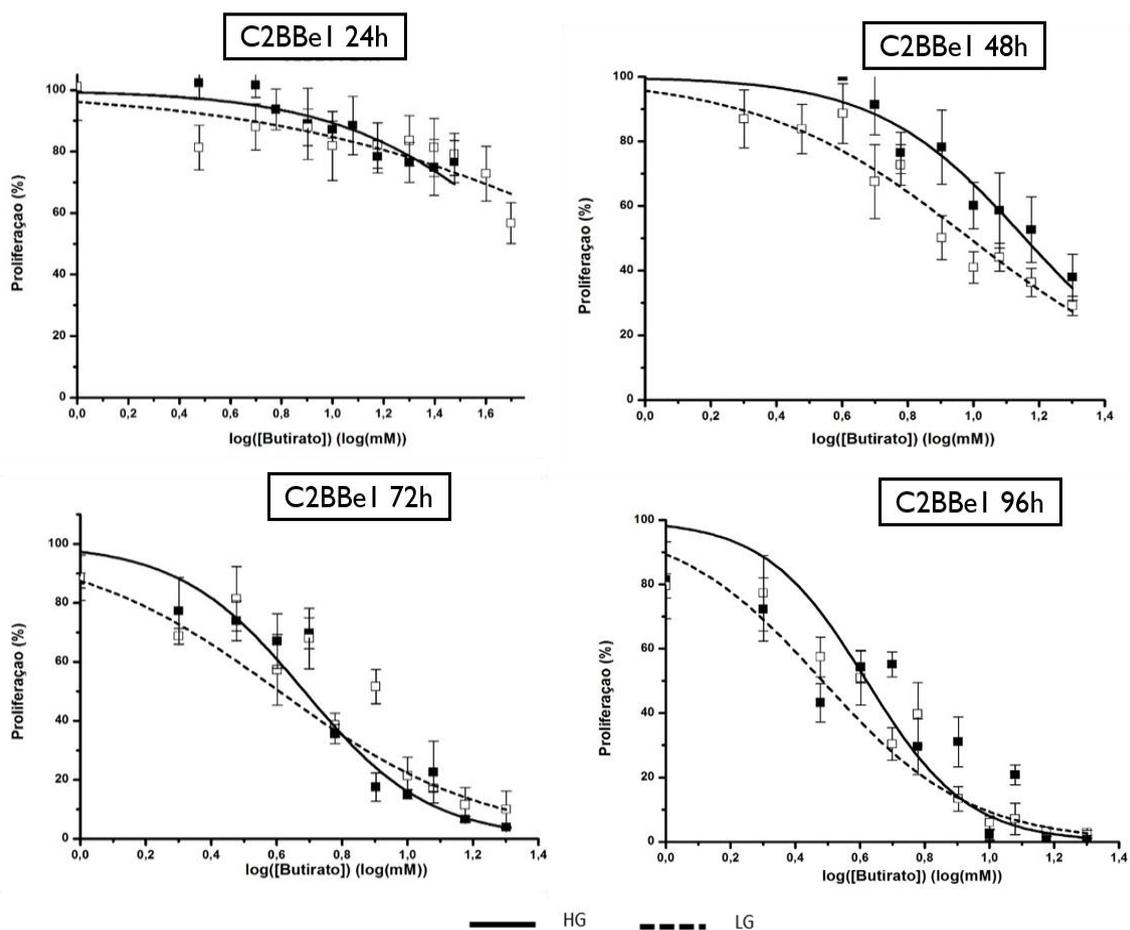


Figura 23 - Curvas de concentração-resposta da linha celular C2BBel em resposta à incubação com butirato nas condições HG e LG. Avaliação da proliferação pelo ensaio de MTT a 24, 48, 72 e 96 horas após a incubação com o composto em estudo na linha celular C2BBel nas condições HG e LG. Os resultados expressam a média e o desvio padrão de pelo menos 3 experiências independentes em duplicado ($n \geq 6$).

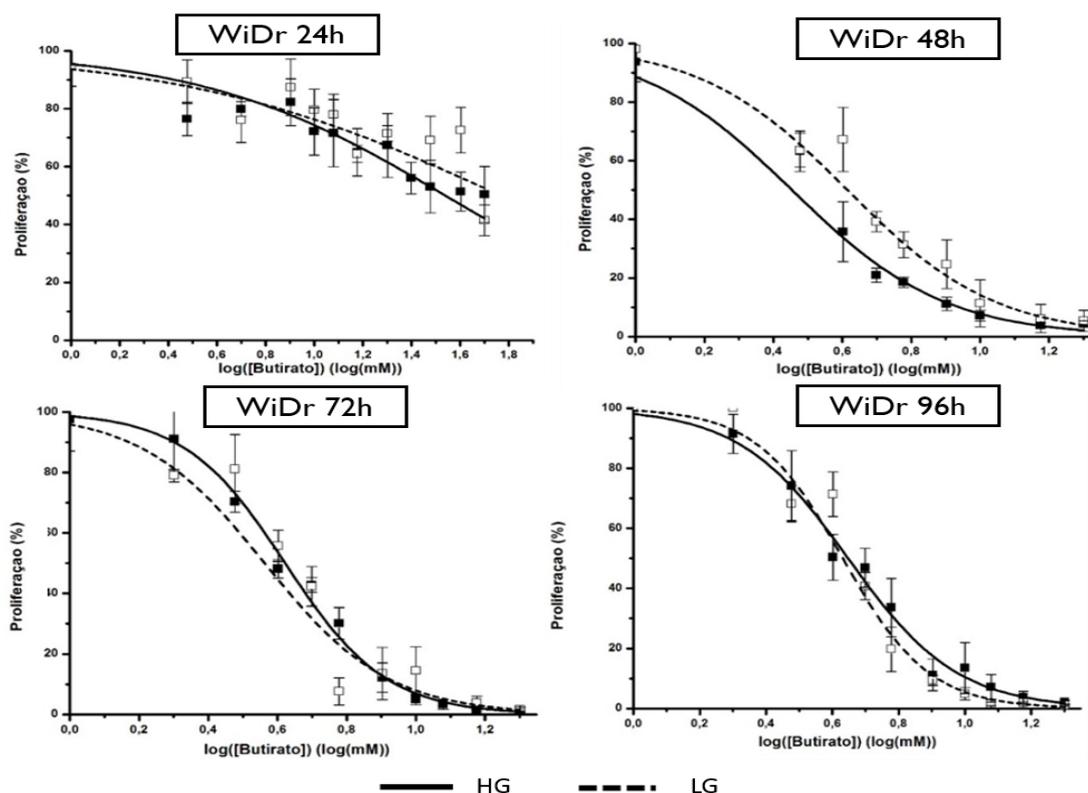


Figura 24 - Curvas de concentração-resposta da linha celular WiDr em resposta à incubação com butirato nas condições HG e LG. Avaliação da proliferação pelo ensaio de MTT a 24, 48, 72 e 96 horas após a incubação com o composto a estudo na linha celular WiDr nas condições HG e LG. Os resultados expressam a média e o desvio padrão de pelo menos 3 experiências independentes em duplicado ($n \geq 6$).

Através dos valores das tabelas 3 e 4 foi possível fazer a comparação do efeito do butirato considerando os valores de IC_{50} das linhas celulares em estudo nas condições de HG e LG. A comparação é apresentada na tabela 5.

Tabela 6: Valores de IC₅₀, r² e intervalos de confiança obtidos para as linhas celulares LS1034, C2BBe1 e WiDr, quando incubadas com butirato para os diferentes tempos de incubação nas condições de LG e HG.

Linha celular	Tempos de Incubação	IC ₅₀ (mM) LG	r ²	IC ₅₀ (mM) HG	r ²
LS1034	24 h	43,54	0,91	*	*
	48 h	3,50	0,94	6,81	0,90
	72 h	2,50	0,96	2,36	0,88
	96 h	1,42	0,90	1,34	0,93
C2BBe1	24 h	*	*	*	*
	48 h	9,74	0,94	14,79	0,88
	72 h	4,05	0,93	4,83	0,96
	96 h	3,04	0,96	4,17	0,90
WiDr	24 h	*	*	*	*
	48 h	4,11	0,98	2,95	0,96
	72 h	3,65	0,98	4,19	0,98
	96 h	4,27	0,97	4,44	0,98

*-Não foi possível calcular

Pela observação das curvas concentração-resposta das figuras 22, 23 e 24 verifica-se que na condição LG para tempos de incubação mais curtos (24 e 48 horas), as linhas celulares C2BBe1 e LS1034 apresentam maior sensibilidade ao butirato. Na linha WiDr o mesmo não se verificou, havendo uma maior sensibilização para a condição de HG às 48 horas de incubação. Para os restantes tempos de incubação as curvas de concentração-resposta são semelhantes.

Pela observação da tabela 6 é possível comparar os IC₅₀ nas duas condições. Na linha celular LS1034 foi possível determinar o IC₅₀ após 24 horas de incubação com butirato, não se verificando o mesmo na condição de HG. Após 48 horas de incubação, o IC₅₀ na condição de LG é mais baixo do que na condição de HG (3,50 e 6,81 mM, respetivamente), mas sem se verificarem diferenças estatisticamente significativas. Para os restantes tempos de incubação os valores de IC₅₀ determinados apresentam valores muito semelhantes nas duas condições, não apresentando também diferenças estatisticamente significativas.

Na linha C2BBe1 não foi possível determinar os valores de IC_{50} após 24 horas de incubação nas duas condições. Em relação aos restantes tempos, na condição de LG os IC_{50} são sempre mais baixos que na condição de HG. Para as 48 horas o valor na condição de LG é de 9,74 mM enquanto que, na condição de HG esse valor é 14,79 mM. Após 72 horas de incubação o valor de IC_{50} na condição de LG é 4,05 mM enquanto que, na condição de HG é de 4,83 mM. Após 96 horas de incubação o valor dos IC_{50} na condição LG é de 3,04 mM e na condição de HG é de 4,17 mM. As diferenças registadas entre os IC_{50} em HG e LG não apresentaram, contudo, significância estatística.

Na linha WiDr, verifica-se que o valor de IC_{50} para as 48 horas de incubação na condição HG é mais baixo que o da condição LG (2,95 e 4,11 mM respetivamente), mas esta diferença não apresentou significância estatística. Para os restantes tempos de incubação, os valores de IC_{50} são muito semelhantes, não apresentando também diferenças estatisticamente significativas.

4.2.2 Estudos de Captação de ^{18}F -FDG

Os estudos de captação do radiofármaco ^{18}F -FDG permitiram estudar o perfil de captação do mesmo ao longo do tempo e, por analogia, o perfil de captação da glicose nas três linhas em estudo cultivadas nas condições HG e LG e incubadas na presença ou ausência de butirato, 1 ou 4 horas antes da realização do estudo.

Na figura 25 estão representados os perfis de captação obtidos para as linhas celulares LSI034, C2BBe1 e WiDr nas condições de HG e LG em situação de controlo ou de incubação com butirato 1 ou 4 horas antes do início do estudo.

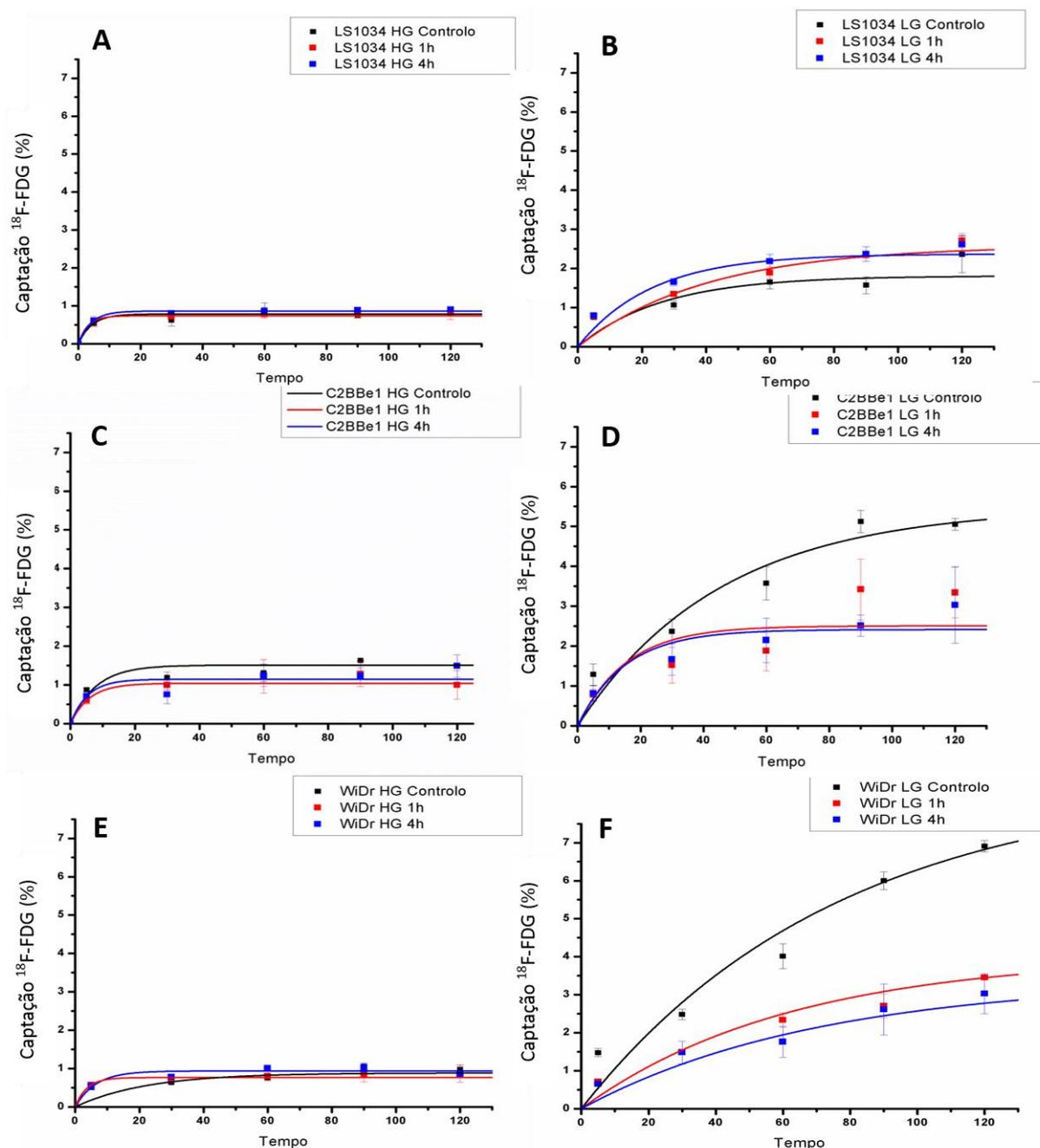


Figura 25 - Perfis de captação de ^{18}F -FDG. Avaliação da captação de ^{18}F -FDG pelas linhas celulares LSI034 (A e B), C2BBel (C e D) e WiDr (E e F) em células pré-incubadas com butirato durante 1 e 4 horas em células na ausência de butirato. Os resultados expressam a média e o desvio padrão de pelo menos 4 experiências independentes realizadas em duplicado ($n \geq 8$).

Considerando o modelo utilizado, é possível descrever as curvas utilizando os parâmetros A (% captação máxima) e T (tempo necessário para que a captação seja igual a $A/2$), que se apresentam para cada condição na tabela 7.

Tabela 7 - Valores médios dos parâmetros A e T, erro padrão e r^2 obtido para as linhas celulares LSI034, C2BBe1 e WiDr às diferentes condições.

Condição	Tempo	A	Erro Padrão	T	Erro Padrão	R ²
LSI034 HG	0h	0,78	0,14	2,98	1,40	0,86
	1h	0,74	0,02	2,08	0,60	1,00
	4h	0,86	0,03	3,66	1,28	1,00
LSI034 LG	0h	1,81	0,38	18,27	15,48	0,71
	1h	2,58	0,44	28,08	14,25	0,90
	4h	2,37	0,19	15,96	5,76	0,94
C2BBe1 HG	0h	1,51	11,85	5,39	65,81	0,05
	1h	1,04	0,06	4,06	0,67	0,99
	4h	1,14	0,15	2,79	0,35	0,99
C2BBe1 LG	0h	5,49	0,6	31,49	11,85	0,95
	1h	2,51	0,52	10,68	4,85	0,89
	4h	2,41	0,21	10,47	3,2	0,97
WiDr HG	0h	0,89	0,24	15,60	9,89	0,95
	1h	0,76	0,04	2,54	0,49	0,99
	4h	0,94	0,06	4,42	2,04	0,98
WiDr LG	0h	8,62	2,95	52,98	34,71	0,96
	1h	4,03	0,43	43,11	12,43	1,00
	4h	3,40	1,19	48,99	35,22	0,90

Pela observação do gráfico A da figura 25 é notório que o perfil de captação de ^{18}F -FDG, para a linha LS1034, na condição de HG, não é afetado pela incubação com butirato. Pela observação da tabela 7 também não se verificam diferenças nos valores de captação máxima (A) entre a situação de controlo (0,78 %) e após exposição ao butirato durante 1 hora (0,74 %) e 4 horas (0,86 %). Na condição de LG, as duas curvas referentes ao perfil de captação após 1 e 4 horas demonstram uma tendência para um aumento da captação do análogo da glicose em comparação com o controlo (figura 25.B), corroborado pelos valores de A em que o valor máximo de captação na situação controlo foi de 1,81% enquanto que, para a 1 hora de incubação foi de 2,585 % e para as 4 horas de 2,37%.

Quanto aos perfis de captação na linha celular C2BBel verificou-se em ambas as condições uma tendência para a diminuição da captação do radiofármaco quando comparadas as condições com e sem butirato (Figura 25.C e D). A diferença foi mais evidente na condição de LG, em que a captação máxima na condição controlo é de 5,49%, diminuindo para 2,51% 2,41%, após exposição ao butirato durante 1 e 4 horas, respetivamente. O mesmo se verificou em relação ao tempo necessário para atingir metade da captação máxima, sendo na situação controlo (31,49 minutos) muito superior aos tempos observados para as condições em que ocorreu incubação com butirato (10,68 minutos para 1 hora de incubação e 10,47 minutos para as 4 horas de incubação). Apesar das diminuições obtidas, não se encontraram diferenças significativas para os parâmetros A e T nesta linha celular.

Na linha celular WiDr, não se verificaram alterações estatisticamente significativas nos perfis de captação do radiofármaco e respetivos parâmetros A e T, após a incubação com butirato durante 1 ou 4 horas, na condição de HG. Contudo, é de realçar a diminuição do parâmetro T, da situação de controlo (15,60 minutos) para as condições de tratamento com butirato, em que T assumiu valores de 2,54 minutos para 1 hora de incubação e de 4,42 minutos para as 4 horas de incubação. Para a condição de LG verifica-se uma diminuição acentuada nas curvas do perfil de captação após a incubação com butirato. Esta diminuição é acompanhada de uma diminuição dos valores de percentagem de captação máxima em que, o valor na situação controlo é de 8,62% e diminui para 4,03% e 3,40 % quando as células são incubadas com butirato 1 ou 4 horas antes do início do estudo, respetivamente. No entanto, as diferenças encontradas para o parâmetro A não são estatisticamente significativas. Para o parâmetro de T não foram também encontradas diferenças estatisticamente significativas.

4.2.3 Avaliação da expressão proteica do GLUT-1, -3, -5 e -12

Para avaliar a expressão membranar e citoplasmática do GLUT-1, -3, -5 e -12 em ambiente LG, recorreu-se à técnica de citometria de fluxo.

Os resultados da expressão basal dos referidos GLUTs a nível membranar para as três linhas a estudo estão expressos no gráfico da figura 26.

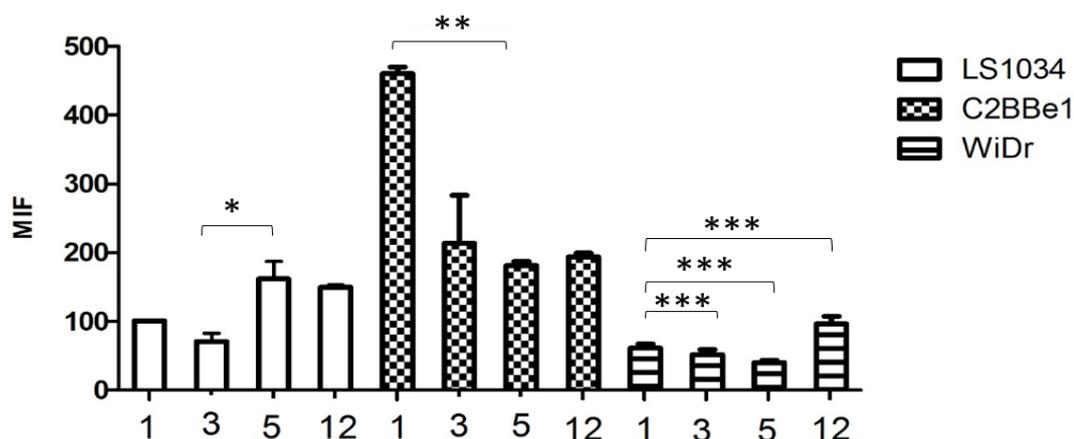


Figura 26 - Análise da expressão membranar dos GLUT-1,-3,-5 e -12 nas linhas celulares LS1034, C2BBel e WiDr para a condição controlo. Os resultados são expressos em termos de MIF exprimem a média e o desvio padrão de 3 ou mais experiências independentes. As diferenças estatisticamente significativas estão representadas por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Pela observação da figura 26 é possível constatar que as três linhas celulares expressam, a nível membranar, os quatro GLUTs avaliados.

Na linha LS1034 os GLUT-5 e -12 são os que apresentam maior expressão enquanto que o GLUT-3 é o que apresenta menor expressão, sendo esta subexpressão estatisticamente significativa comparativamente com a expressão de GLUT-5 ($p=0,024$).

Na linha C2BBel o GLUT-1 é o que apresenta maior expressão, não se verificando diferenças entre os restantes. A maior expressão da isoforma GLUT-1 comparativamente com a GLUT-5 apresenta significância estatística ($p=0,002$).

Na linha WiDr o GLUT-12 é o que apresenta maior expressão, sendo esta diferença estatisticamente significativa comparativamente com a expressão de GLUT-1 ($p < 0,001$). O GLUT-1 é o segundo transportador de glicose a estudo mais expresso sendo que, a sua maior expressão comparativamente às isoformas -3 e -5 apresenta significância estatística ($p < 0,001$).

Na Figura 27 são apresentados os valores da expressão dos quatro transportadores de glicose a estudo ao nível do citoplasma.

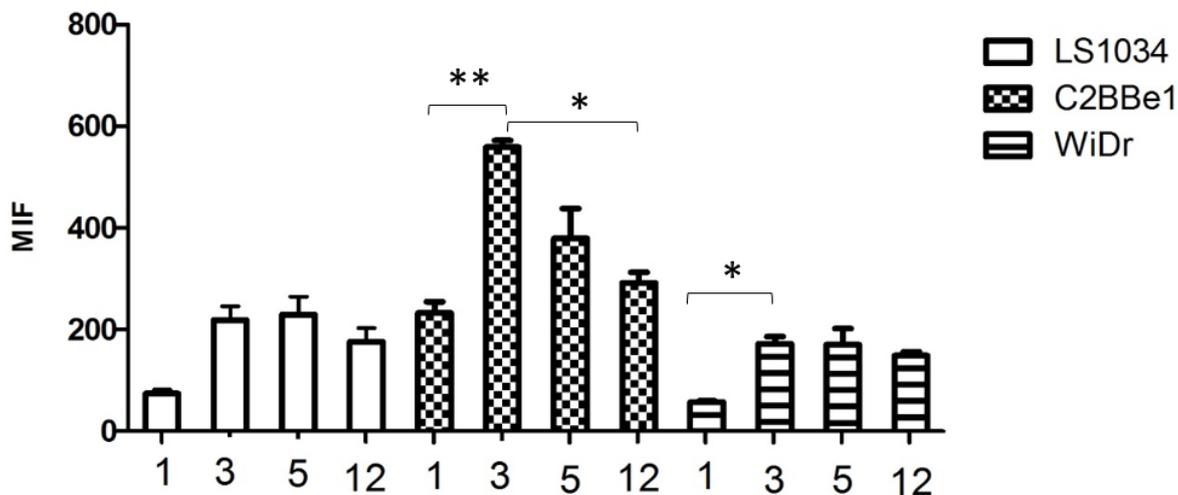


Figura 27 - Análise da expressão citoplasmática dos GLUT-1,-3,-5 e -12 nas linhas celular LS1034, C2BBel e WiDr para a condição controlo. Os resultados são expressos em termos de MIF exprimem a média e o desvio padrão de 3 ou mais experiências independentes. As diferenças estatisticamente significativas estão representadas por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Através da observação da figura 27 verifica-se que os quatro GLUTs estão expressos ao nível do citoplasma nas três linhas celulares estudadas.

Quanto à expressão no citoplasma da linha LS1034 é possível constatar que o GLUT-1 é o menos expresso e que os restantes GLUTs apresentam valores de expressão semelhantes entre eles. As diferenças entre a expressão dos transportadores de glicose nesta linha não apresentam significância estatística.

Quanto à expressão citoplasmática destes transportadores na linha C2BBel, denota-se que a maior expressão é a do GLUT-3 sendo que, a sua maior expressão apresenta significância estatística em relação à expressão do GLUT-1 ($p=0,001$) e GLUT-5 ($p=0,024$). O transportador menos expresso é o GLUT-1, mas sem apresentar diferenças estatisticamente significativas quando comparado com as isoformas -5 e -12.

Na linha WiDr, o GLUT-1 é o que apresenta menor expressão ao nível do citoplasma, apresentando diferenças estatisticamente significativas com a expressão do GLUT-3 ($p=0,024$). Quanto à expressão dos restantes transportadores de glicose não se observam diferenças estatisticamente significativas.

Para avaliar o efeito da exposição ao butirato na expressão membranar dos quatro transportadores de glicose a estudo, determinaram-se as razões relativamente aos controlos das linhas celulares incubadas com butirato 1 e 24 horas antes do início do estudo.

Na figura 28 são apresentados os resultados obtidos para a linha LSI034.

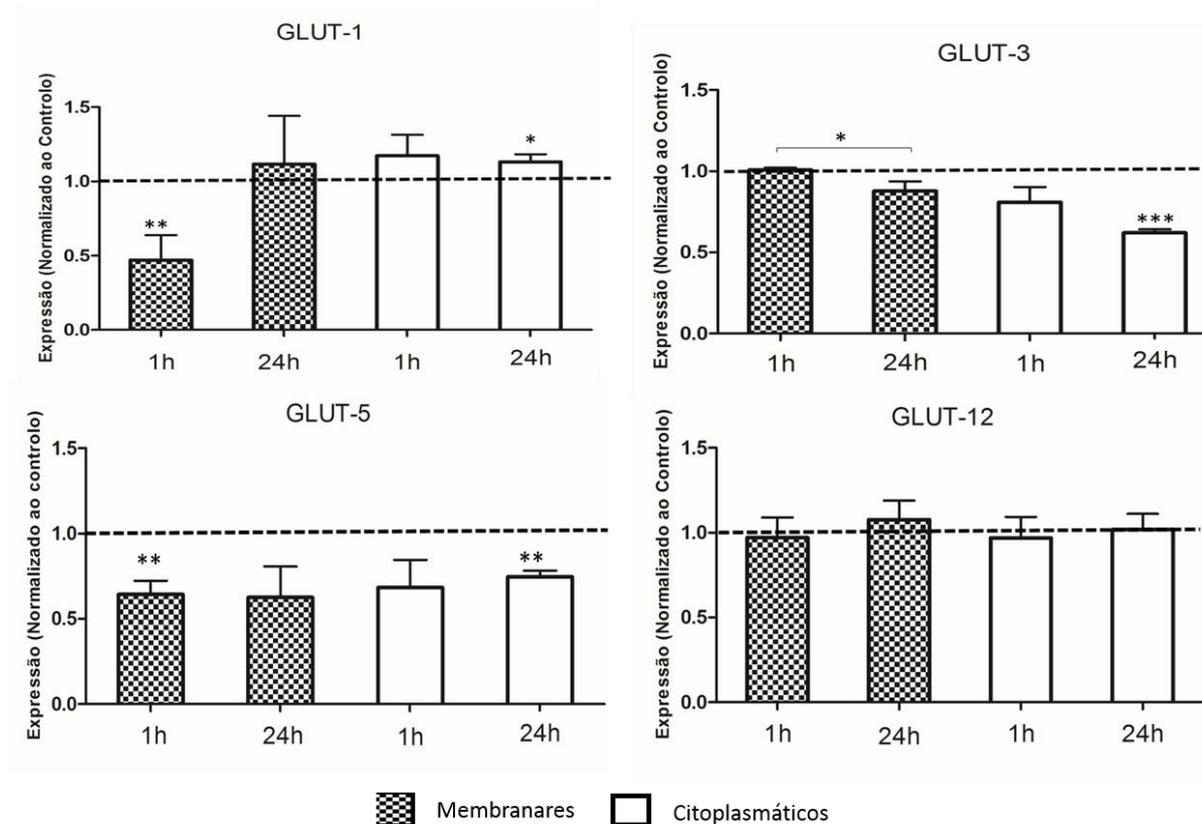


Figura 28 - Análise da expressão membranar e citoplasmática do GLUT-1, -3, -5 e -12 na linha celular LSI034 após incubação com butirato, 1 ou 24 horas antes da realização do estudo. Os valores encontram-se normalizados ao controlo e exprimem a média e o desvio padrão de pelo menos 2 experiências independentes realizadas em duplicado ($n \geq 4$). As diferenças estatisticamente significativas estão representadas por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Pela observação da figura 28 verifica-se que a presença de butirato diminui a expressão de GLUT-1 ao nível da membrana após 1 hora de incubação ($p=0,006$). Esta diminuição já não se observa com o aumento do tempo de exposição para 24 horas, verificando-se um ligeiro aumento contudo, sem significado estatístico. Quanto ao nível da expressão do GLUT-1 no citoplasma, verifica-se um aumento estatisticamente significativo após 24 horas de incubação com butirato ($p=0,015$).

Relativamente à expressão do GLUT-3, não se observam alterações da expressão membranar 1 hora após a incubação. Após 24 horas verifica-se uma diminuição não significativa estatisticamente em relação ao controlo, mas sim em relação à 1 hora ($p=0,015$).

Quanto à expressão ao nível do citoplasma, verifica-se uma diminuição não significativa estatisticamente após 1 hora de incubação sendo que, esta diminuição acentua-se após 24 horas apresentando significância estatística relativamente ao controlo ($p < 0,001$).

Em relação à expressão do GLUT-5 verifica-se uma diminuição a todos os tempos de incubação, tanto a nível membranar como a nível citoplasmático. Essa diminuição é estatisticamente significativa em relação ao controlo para a 1 hora de incubação ao nível da membrana ($p = 0,003$) e às 24 horas de incubação ao nível do citoplasma ($p = 0,003$).

Em relação ao GLUT-12 não se verificaram diferenças após exposição ao butirato, tanto a nível membranar como a nível citoplasmático.

Na figura 29 são apresentados os resultados da influência do butirato na expressão dos GLUT-1, -3, -5, e -12 para a linha celular C2BBel.

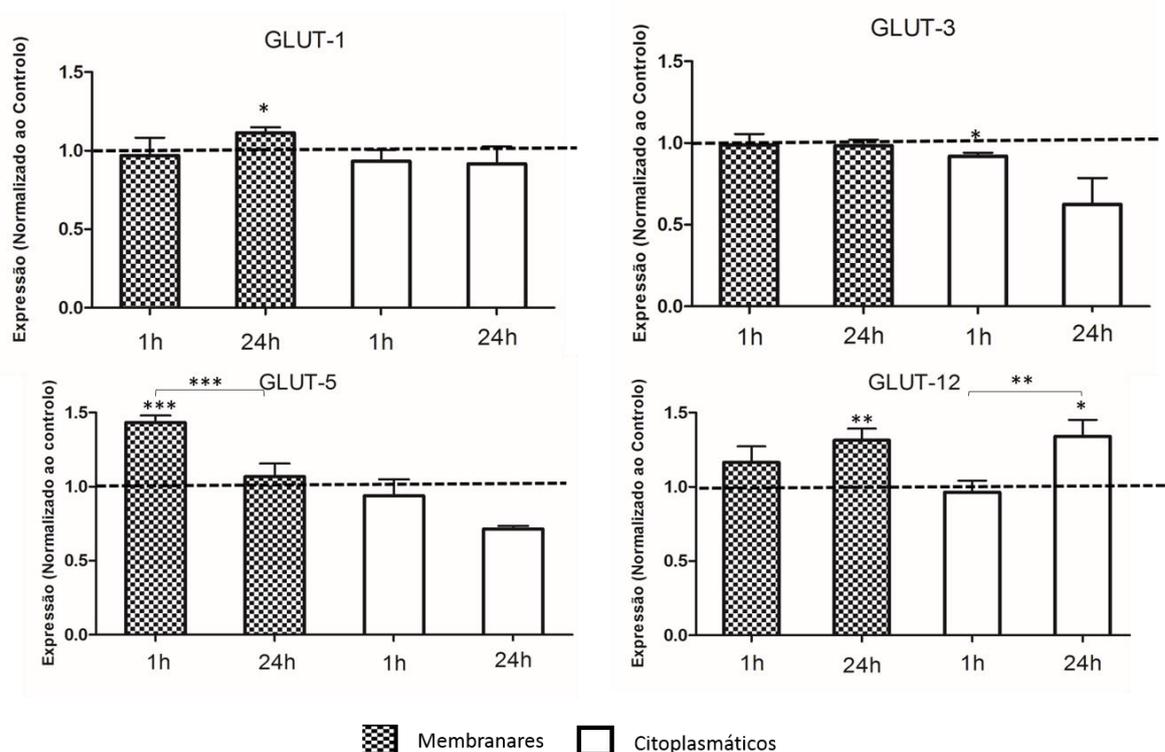


Figura 29 - Análise da expressão membranar e citoplasmática do GLUT-1, -3, -5 e -12 na linha celular C2BBel após incubação com butirato, 1 ou 24 horas antes da realização do estudo. Os valores encontram-se normalizados ao controlo e exprimem a média e o desvio padrão de pelo menos 2 experiências independentes realizadas em duplicado ($n \geq 4$). As diferenças estatisticamente significativas estão representadas por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Pela observação da figura 29 verifica-se um aumento da expressão deste transportador a nível membranar após 24 horas de incubação ($p = 0,021$), sem diferenças para as restantes condições.

Em relação à expressão do GLUT-3, não se verificam alterações na expressão ao nível da membrana. Ao nível do citoplasma há uma diminuição da expressão após 1 hora ($p=0,012$) e após 24 horas de incubação com butirato.

Quanto à expressão membranar do GLUT-5, verifica-se um aumento significativa 1 hora após a incubação ($p<0,001$), com posterior diminuição após 24 horas de incubação, com significado estatístico comparativamente ao dado anterior ($p<0,001$). Ao nível do citoplasma não se verificam alterações após 1 hora, mas após 24 horas existe uma diminuição significativa da expressão do transportador ($p<0,001$).

Pelos dados da figura 29 verifica-se também, que ao nível do citoplasma há um aumento da expressão do GLUT-12, aumento esse que é estatisticamente significativo para as 24 horas de incubação ($p=0,003$). Em relação à expressão desta isoforma no citoplasma, após 1 hora de incubação não existem diferenças relativamente ao controlo, mas às 24 horas existe um aumento da expressão relativamente ao controlo ($p=0,027$) e à 1 hora ($p=0,003$).

Na figura 30 encontram-se representados os resultados da expressão dos referidos GLUTs a nível citoplasmático e membranar após incubação com butirato 1 ou 24 horas para a linha WiDr. Os valores encontram-se normalizados ao controlo.

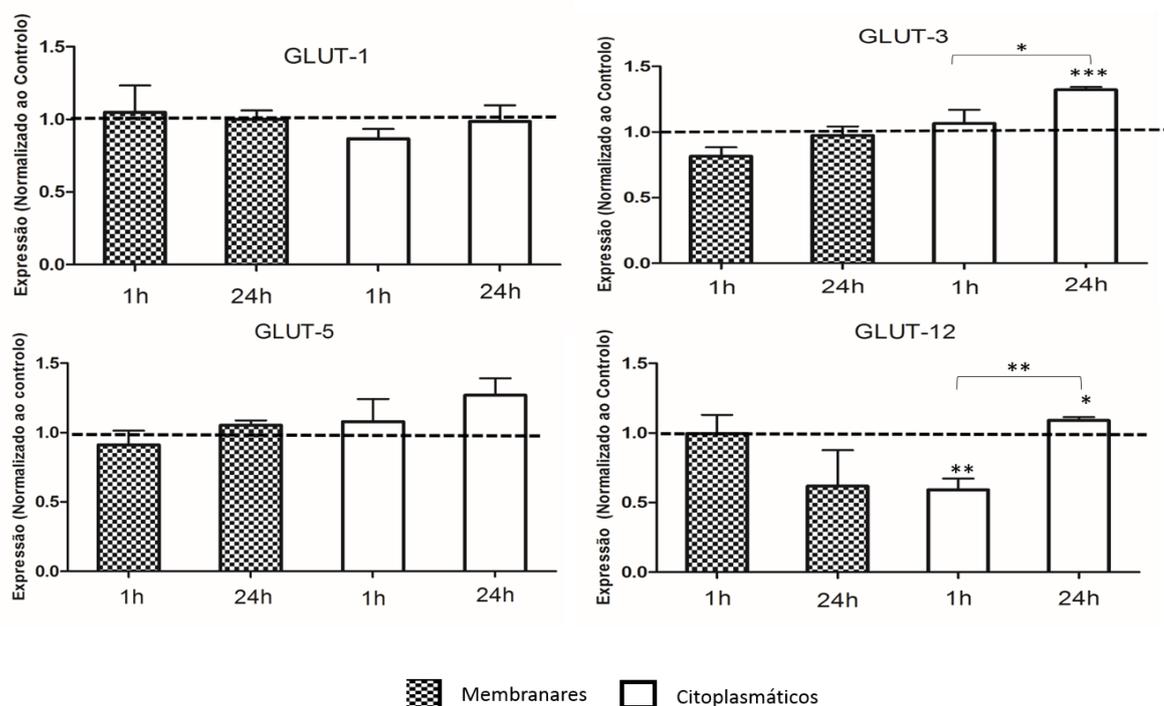


Figura 30- Análise da expressão membranar e citoplasmática do GLUT-1, -3, -5 e -12 na linha celular WiDr após incubação com butirato 1 ou 24 horas antes da realização do estudo. Os valores encontram-se normalizados ao controlo e exprimem a média e o desvio padrão de pelo menos 2 experiências independentes realizadas em duplicado ($n\geq 4$). As diferenças estatisticamente significativas estão representadas por * $p<0,05$, ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$.

Pela observação dos gráficos da figura 30 verifica-se que o butirato não induz alterações na expressão do GLUT-1 tanto a nível membranar como a nível citoplasmático.

Em relação ao GLUT-3 verifica-se uma ligeira diminuição na expressão do GLUT-1 ao nível da membrana após 1 hora de incubação, contudo não estatisticamente significativa. Ao nível do citoplasma, não se verificam diferenças após 1 hora de incubação, mas às 24 horas existe um aumento relativamente ao controlo ($p < 0,001$) e relativamente à 1 hora ($p = 0,042$).

Quando à expressão do GLUT-5, verifica-se um ligeiro aumento da sua expressão citoplasmática após 24 horas de incubação com butirato, mas sem significado estatístico.

No que diz respeito à expressão do GLUT-12, verifica-se uma diminuição não significativa estatisticamente, ao nível da membrana, após as 24 horas de incubação. Ao nível do citoplasma verifica-se uma diminuição após 1 hora de incubação ($p = 0,006$), com posterior aumento após as 24 horas, relativamente ao controlo ($p = 0,015$) e à 1 hora ($p = 0,003$).

4.2.4 Estudos metabólicos por Ressonância Magnética Nuclear

Para avaliar o fluxo glicolítico das linhas celulares em estudo e a atividade do seu ciclo de Krebs recorreu-se à Ressonância Magnética Nuclear e ao uso de um marcador isotópico, neste caso a glicose com marcação em carbono-13 uniforme ($[U-^{13}C]$ glicose).

Para a avaliação do fluxo de glicolítico recorreu-se à determinação da produção de $[U-^{13}C]$ lactato ao longo do tempo nas linhas celulares em estudo na condição de controlo (sem tratamento) e após incubação com butirato. Nas figuras 31, 32 e 33 encontram-se as expansões de ressonância referentes ao $[U-^{13}C]$ lactato produzido e presente no meio, aos tempos 0, 1, 3, 4, 6 e 8 horas após o início da experiência, com a incubação das células com o meio suplementado com $[U-^{13}C]$ glicose.

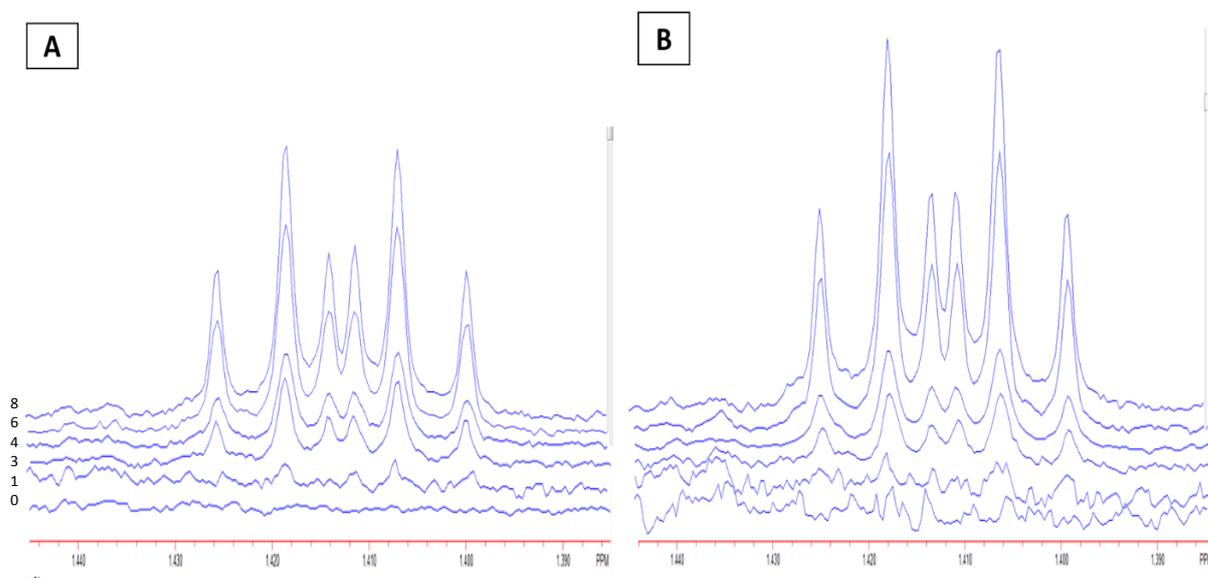


Figura 31 – Expansões do espectro de ^1H -RMN do meio de cultura das células LSI034, respeitantes a um dos satélites do $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ lactato. A ressonância é composta por 6 picos, resultado da existência de acoplamentos homo- ($^3\text{J}_{\text{HH}}$) e heteronucleares ($^2\text{J}_{\text{HC}}$ e $^3\text{J}_{\text{HC}}$). A evolução temporal (0,1,3, 4,6 e 8 horas) dos conteúdos em lactato para as 2 condições em estudo: controlos (A) e na presença de butirato (B).

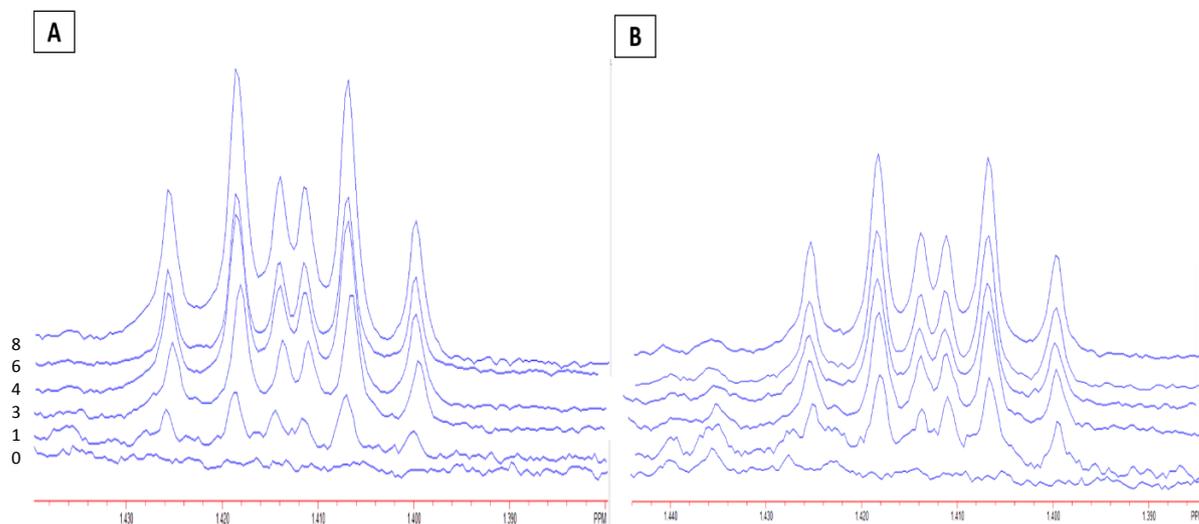


Figura 32 – Expansões do espectro de ^1H -RMN do meio de cultura das células C2BBel, respeitantes a um dos satélites do $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ lactato. A ressonância é composta por 6 picos, resultado da existência de acoplamentos homo- ($^3\text{J}_{\text{HH}}$) e heteronucleares ($^2\text{J}_{\text{HC}}$ e $^3\text{J}_{\text{HC}}$). A evolução temporal (0,1,3, 4,6 e 8 horas) dos conteúdos em lactato para as 2 condições em estudo: controlos (A) e na presença de butirato (B).

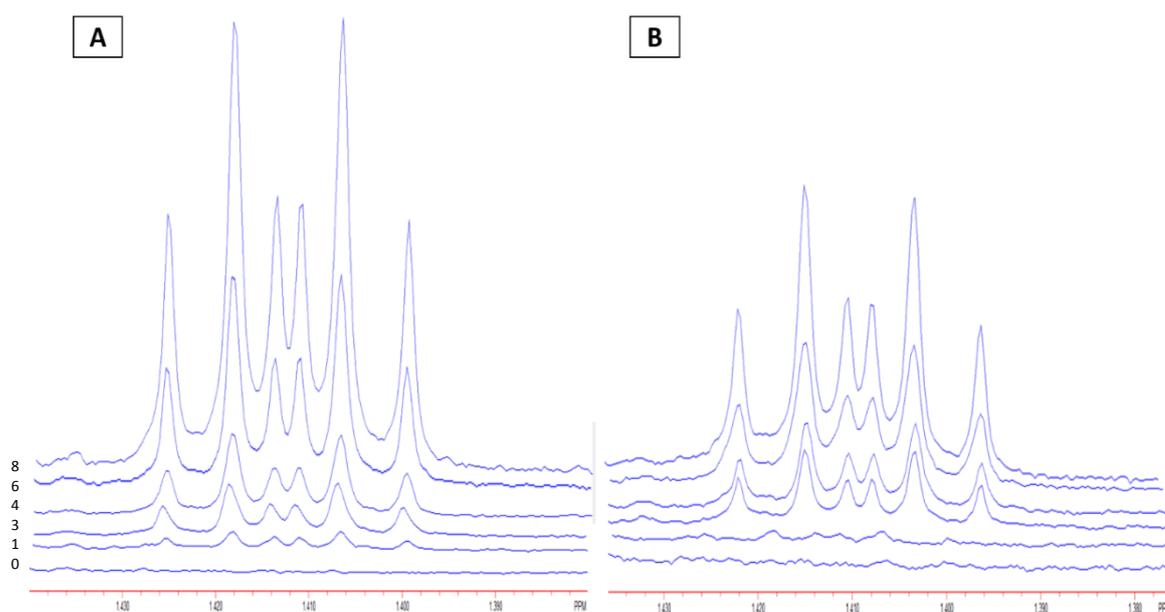


Figura 33 – Expansões do espectro de ^1H -RMN do meio de cultura das células WiDr, respeitantes a um dos satélites do $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ lactato. A ressonância é composta por 6 picos, resultado da existência de acoplamentos homo- ($^3\text{J}_{\text{HH}}$) e heteronucleares ($^2\text{J}_{\text{HC}}$ e $^3\text{J}_{\text{HC}}$). A evolução temporal (0,1,3, 4,6 e 8 horas) dos conteúdos em lactato para as 2 condições em estudo: controlos (A) e na presença de butirato (B).

A análise da produção de lactato marcado nas primeiras 8 horas permitiu uma melhor avaliação do efeito do butirato na produção deste metabolito. A escolha dos tempos mais curtos deveu-se ao facto de esta produção apresentar uma resposta linear até às 8 horas. Para tempos mais longos, há uma menor disponibilidade de substrato, nomeadamente glicose, no meio de cultura levando a que hajam alterações na atividade metabólica, com consumo de lactato anteriormente produzido e presente no meio de cultura.

Através da análise da figura 31, de uma forma qualitativa o que se observa é um aumento de tamanho nos picos de lactato marcado quando as células são incubadas com butirato para a linha LS1034 aos maiores tempos avaliados. Quanto às linhas celulares C2BBel e WiDr, verificou-se uma diminuição no tamanho dos picos referentes $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ lactato quando as células foram incubadas com butirato (figura 32 e 33 respetivamente).

Assim, após a quantificação dos picos representados nas figuras 31, 32 e 33 e respetiva normalização ao controlo utilizado, a valina, foi possível traçar os gráficos de resposta linear referentes à evolução da concentração de $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ lactato no meio, os quais estão representados na figura 34.

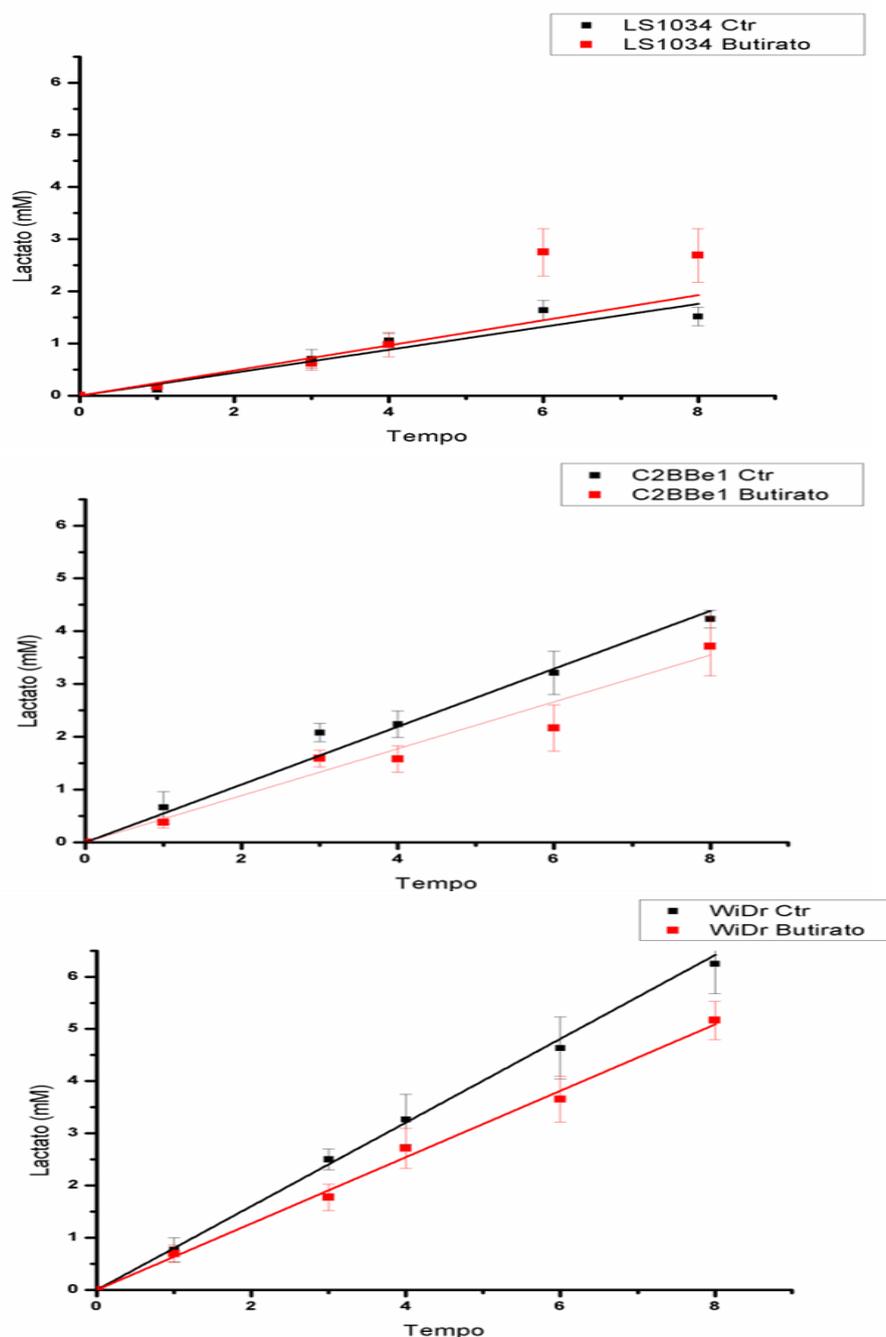


Figura 34 – Evolução da concentração de $[U-^{13}C]$ lactato no meio de cultura durante 8 horas de incubação para as três linhas celulares em estudo, na ausência e presença de butirato. Os resultados obtidos representam, para cada tempo, a média e o desvio padrão 4 experiências independentes.

Das respostas lineares apresentadas na figura 34 foi possível determinar os valores do declive das retas e o respetivo erro-padrão, valores esses representados na tabela 8.

Tabela 8 - Declives das respostas lineares de produção de lactato marcado e respetivo erro-padrão.

Linha Celular	Condição	Declive	Erro-padrão
LS1034	Controlo	0,220	0,023
	Butirato	0,241	0,044
C2BBel	Controlo	0,548	0,024
	Butirato	0,443	0,034
WiDr	Controlo	0,802	0,013
	Butirato	0,636	0,014

Ao observar a figura 34 e o respetivo valor do declive na tabela 8 referente às respostas lineares verifica-se um ligeiro aumento quando as células são incubadas com butirato para a linha celular LS1034. Apesar das diferenças verificadas às 6 e 8 horas, o comportamento da produção de $[U-^{13}C]$ lactato a esses tempos não correspondia a uma resposta linear levando assim a que os declives da reta referente ao controlo e da reta referente à incubação com butirato fossem muito semelhantes.

Quanto à linha celular C21BBel verificou-se um menor declive da resposta linear (0,548 para o controlo e 0,443 para a incubação com butirato) como é observável na figura 34. Apesar das diferenças verificadas entre as duas retas, estas não apresentaram significância estatística.

Aquando da incubação com butirato para a linha celular WiDr, verificou-se uma diminuição no declive da reta referente à resposta linear na presença de butirato em que o declive é 0,632 enquanto que o declive referente ao controlo é de 0,802. As diferenças entre o controlo e a incubação com butirato revelaram significância estatística ($p=0,003$).

Para a avaliação da atividade do ciclo de Krebs, do seu *turnover*, do acoplamento entre o processo glicolítico e este ciclo, do processo de anaplerose, do estado redox do citosol e da captação de butirato pelas células, recorreu-se aos espetros ^{13}C -RMN e 1H -RMN dos extratos de metanol, fazendo-se sempre a comparação entre os extratos não expostos a butirato (controlos) com os expostos a butirato.

Para avaliar o efeito do butirato no estado redox do citosol determinou-se a razão entre o carbono 3 do lactato (C3_Lac) e o carbono 3 da alanina (C3_Ala), tanto na condição controlo como na condição de incubação com butirato. Quanto maior o valor desta razão maior o incremento da via glicolítica na condição em estudo. Os resultados desta quantificação são apresentados na figura 35 e são referentes às razões C3_Lac/C3_Ala na situação controlo e na situação de incubação com butirato nas três linhas a estudo.

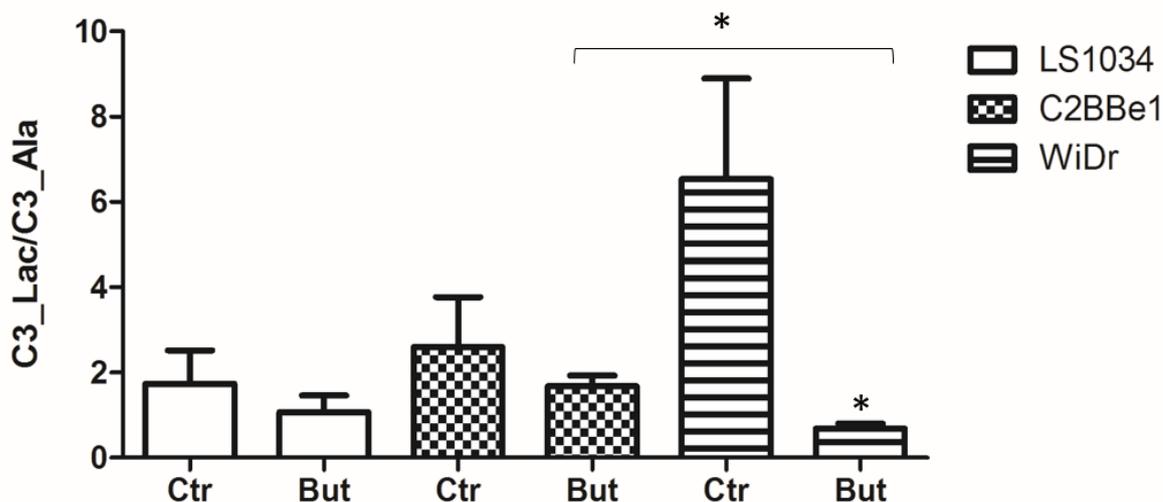


Figura 35 – Razão C3_Lac/C3_Ala para as três linhas em estudo (LS1034, C2BBel e WiDr) nas duas condições avaliadas (controlo e incubação com butirato). Os valores apresentados exprimem a média e o desvio padrão de pelo menos 3 experiências independentes. As diferenças significativas relativamente ao controlo estão representadas por * para $p < 0,05$.

Pela observação da figura 35 verifica-se que a incubação com butirato promoveu uma tendência para a diminuição da razão C3_Lac/C3_Ala, o que indica uma diminuição no recurso à glicólise nas três linhas celulares. De realçar a diminuição abrupta observada na atividade da via glicolítica ($p=0,034$).

Comparando os controlos das três linhas a estudo verifica-se que a linha WiDr apresenta o maior valor para esta razão, indicando assim um maior incremento da via glicolítica. Após a incubação com butirato, esta linha passa a apresentar o menor valor da razão C3_Lac/C3_Ala, tendo significância estatística quando comparado com a mesma condição da linha C2BBel ($p=0,042$).

Para avaliar o efeito do butirato no acoplamento entre a via glicolítica e o ciclo de Krebs recorreu-se à determinação da razão entre o C3_Lac e o carbono 4 do glutamato (C4_Glut), tanto na condição controlo como na condição de incubação com butirato. Os resultados desta quantificação são apresentados na figura 36.

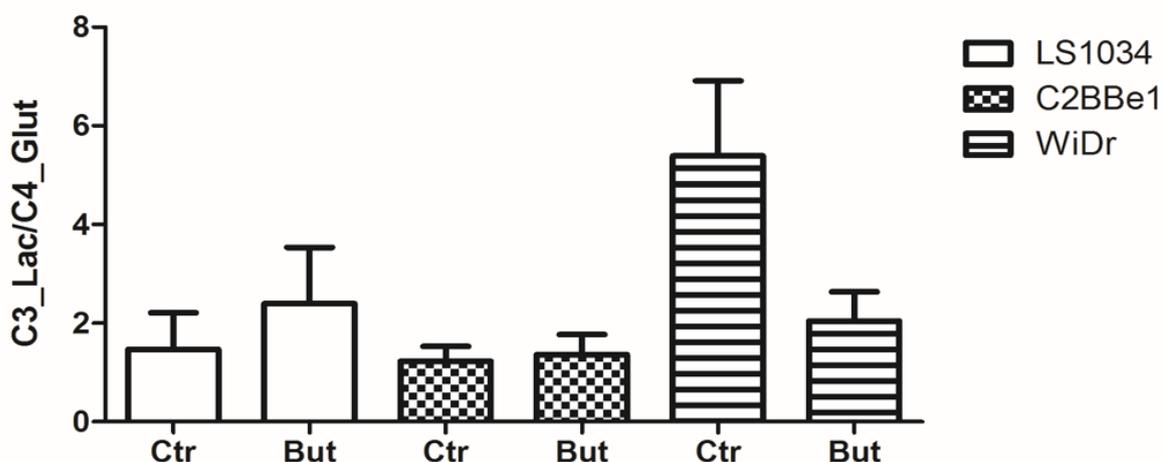


Figura 36 – Razão C3_Lac/C4_Glut para as três linhas em estudo (LS1034, C2BBel e WiDr) nas duas condições avaliadas (controlo e incubação com butirato). Os valores apresentados exprimem a média e o desvio padrão de pelo menos 3 experiências independentes.

Pela observação da figura 36 verifica-se que para a linha celular LS1034 há uma tendência para um aumento da razão C3_Lac/C4_Glut, o que revela uma diminuição do acoplamento entre a glicólise e o ciclo de Krebs.

Na linha celular C2BBel não se verificaram alterações nesse acoplamento indicando que o butirato não afeta o acoplamento entre o ciclo de Krebs e a glicólise.

Na linha celular WiDr verificou-se uma diminuição na razão, revelando assim um aumento do acoplamento entre as duas vias.

Para determinar a captação de butirato pelas células procedeu-se à quantificação do espectro ¹H-RMN referente ao carbono 3 deste composto. Na figura 37 encontram-se os resultados referentes a esta quantificação.

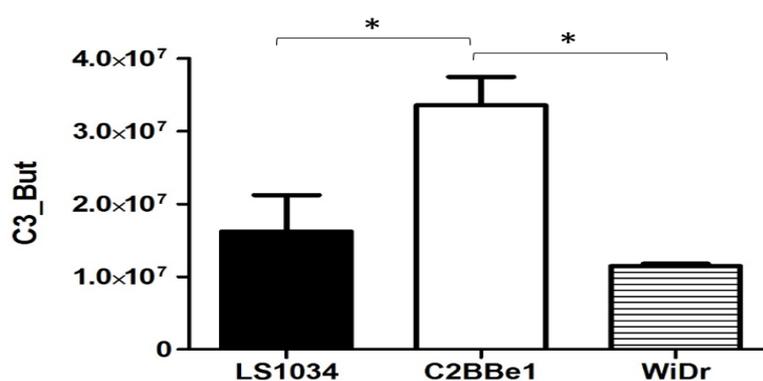


Figura 37 – Quantificação do carbono 3 do butirato para as três linhas celulares em estudo (LS1034, C2BBel e WiDr). Os valores apresentados exprimem a média e o desvio padrão de pelo menos 3 experiências independentes. As diferenças significativas relativamente às comparações entre as linhas a estudo são representadas por * para $p < 0,05$.

Pela observação da figura verifica-se que as células C2BBel possuíam maior quantidade de butirato no seu interior, diferenças estatisticamente significativas quando comparada com a linha LS1034 ($p=0,048$) e com a linha WiDr ($p=0,016$). Entre a linha WiDr e LS1034 não se verificaram diferenças significativas.

Para a avaliação do *turnover* do ciclo de Krebs recorreu-se aa razão Q/D45 do carbono 4 do glutamato. Na figura 38 são apresentados as razões referentes às três linhas celulares em estudo.

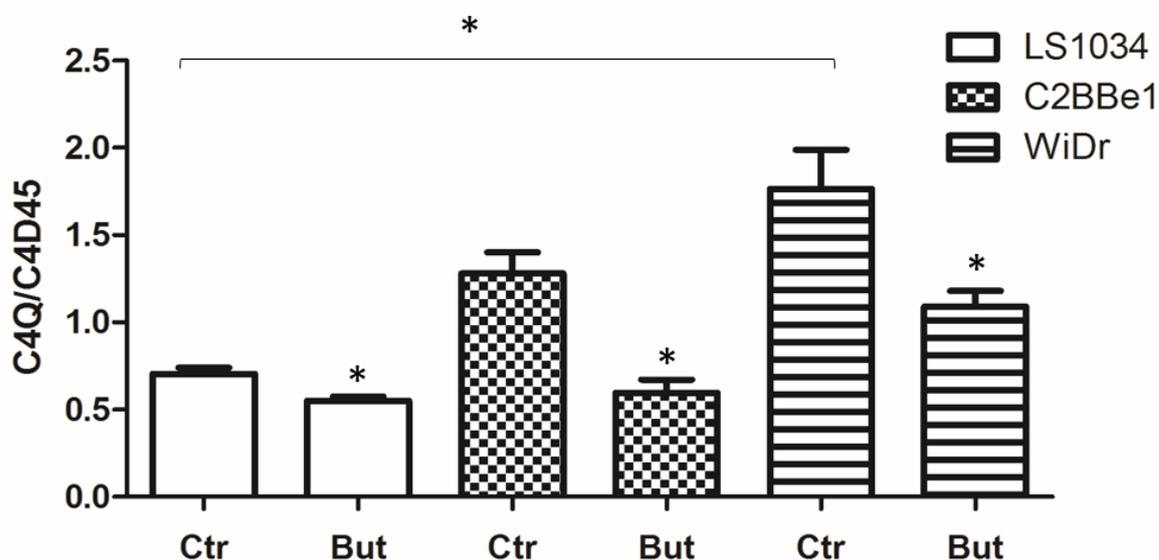


Figura 38 – Razões entre os multipletos do glutamato no carbono 4, C4Q/C4D45 para as três linhas em estudo (LS1034, C2BBel e WiDr) nas duas condições avaliadas (controlo e incubação com butirato). Os valores apresentados exprimem a média e o desvio padrão de pelo menos 3 experiências independentes. As diferenças significativas relativamente ao controlo estão representadas por * para $p < 0,05$.

A razão Q/D45 tradicionalmente avalia a velocidade do ciclo de Krebs, na medida em que quanto maior o número de voltas do ciclo, maior será o valor domesmo. Desta forma, pela observação da figura 38, verifica-se que o butirato induz uma diminuição da razão e, conseqüentemente, uma diminuição da velocidade do ciclo de Krebs em todas as linhas celulares. Essa diminuição apresentou significância estatística nas 3 linhas (para a linha LS1034 $p=0,034$, para a linha C2BBel $p=0,049$ e para a linha WiDr $p=0,034$).

Comparando a razão das três linhas ao nível dos controlos, verifica-se que a linha WiDr é a que apresenta maior velocidade de *turnover* do ciclo de Krebs e a linha LS1034 a que apresenta o menor valor, apresentando esta diferença significado estatístico ($p=0,015$).

Recorreu-se também à quantificação do singlete do carbono 3 do glutamato e à determinação da sua razão na totalidade da marcação desse carbono para inferir quanto à influência que o butirato poderá provocar na marcação com carbono 13 proveniente da glicose uniformemente marcada no glutamato. Este singlete é referente a uma única marcação com carbono-13 no esqueleto deste. Na figura 39 são apresentados os resultados referentes às três linhas em estudo nas duas condições em análise.

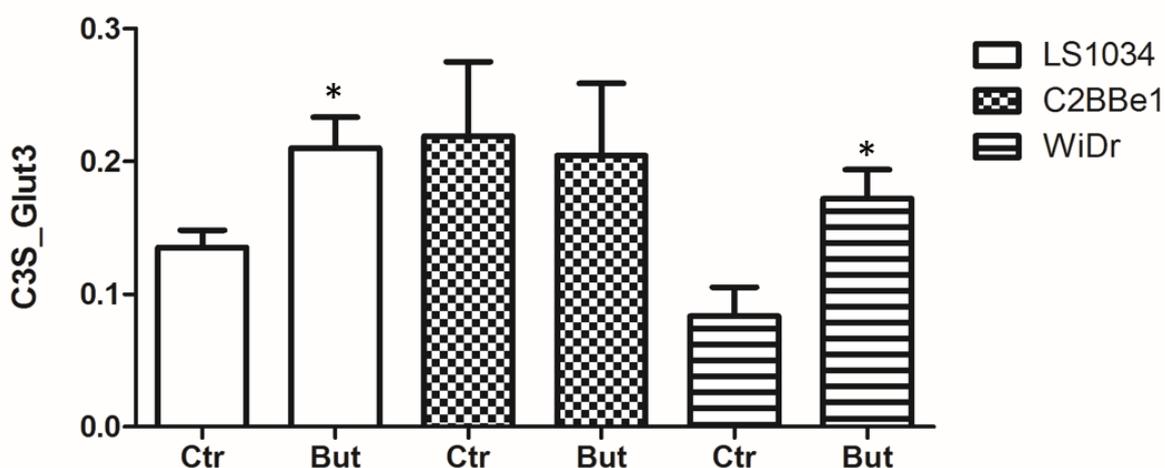


Figura 39 – Razão C3S/C3 para as três linhas a estudo (LS1034, C2BBel e WiDr) nas duas condições avaliadas (controlo e incubação com butirato). Os valores apresentados exprimem a média e o desvio padrão depelo menos 3 experiências independentes. As diferenças significativas relativamente ao controlo estão representadas por * para $p<0,05$.

Pela observação da figura 39 verifica-se que a exposição ao butirato induziu respostas na razão C3S/Glut3 dependentes da linha celular.

Para a linha LSI034 verificou-se um aumento da razão estudada após a incubação com butirato relativamente ao controlo ($p=0,034$), indicando assim uma diluição da marcação de carbono 13.

Na linha C2BBel não se verificaram diferenças entre o controlo e o tratamento com butirato.

Na linha WiDr verificou-se um aumento desta razão como verificado na linha LSI034. Este aumento foi estatisticamente significativo ($p=0,049$) e revela que o butirato interfere com a incorporação de carbono 13 no glutamato.

Com recurso aa razão entre o carbono 3 e 4 do glutamato foi também possível determinar o efeito do butirato na anaplerose. Os resultados da situação de controlo e de incubação com butirato para as três linhas celulares são apresentados na figura 40.

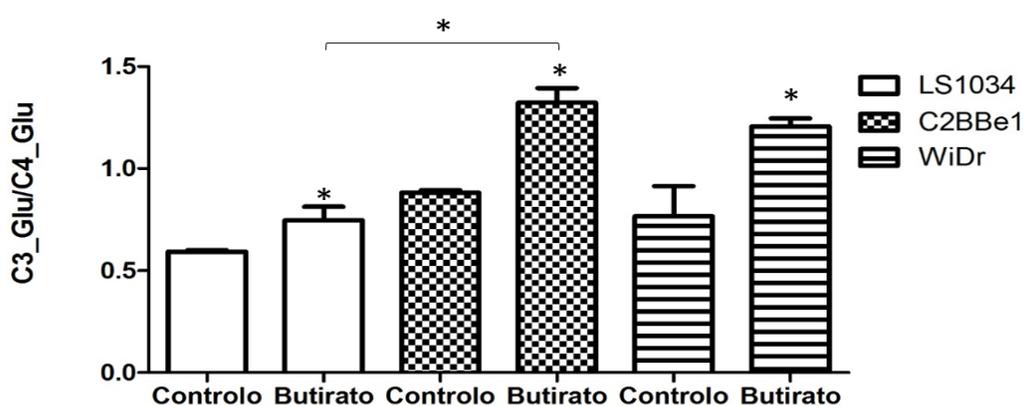


Figura 40 – Razões C3_Glu/C4_Glu para as três linhas em estudo (LSI034, C2BBel e WiDr) nas duas condições avaliadas (controlo e incubação com butirato). Os valores apresentados exprimem a média e o desvio padrão de pelo menos 3 experiências independentes. As diferenças significativas relativamente ao controlo estão representadas por * para $p < 0,05$.

Pela observação da figura 40 constata-se que o butirato promove um aumento da razão C3_Glu/C4_Glu nas três linhas em estudo. Esse aumento apresentou significância estatística nas três linhas (na linha LSI034 $p=0,034$, na linha C2BBel $p=0,049$ e na linha WiDr $p=0,049$).

Na condição de controlo, a razão em estudo apresentava valores semelhantes nas três linhas. Após a incubação com butirato verifica-se que a razão C3_Glu/C4_Glu é estatisticamente superior na linha C2BBel em comparação com a linha LSI034 ($p=0,033$).

5.DISSCUSSÃO E CONCLUSÃO

O potencial citotóxico do butirato e dos inibidores das HDACs (grupo no qual o butirato se integra) em células tumorais do cólon e noutros tipos de tumor já foi descrito algumas vezes (GIANNINI, *et. al.*, 2012; JOSEPH, *et. al.*, 2004). Como foi referido anteriormente, a primeira parte do trabalho experimental tinha como objetivo avaliar a citotoxicidade do butirato em três linhas celulares de cancro colorretal. Com o recurso ao ensaio de MTT foi possível determinar o efeito antiproliferativo deste inibidor das HDAC nas linhas celulares de cancro a estudo, e da maior resistência da linha celular não tumoral por avaliação da atividade metabólica. O butirato apresentou efeito antiproliferativo nas linhas celulares LSI034, C2BBeI e WiDr estudadas, sendo esse efeito tanto maior quanto maior a concentração do composto e o tempo de exposição ao mesmo. No entanto, as linhas apresentaram diferenças na resposta.

A linha LSI034, foi a que se revelou mais sensível ao butirato para tempos de incubação mais longos, está referenciada na literatura como resistente a diferentes fármacos anticancerígenos (CASALTA-LOPES, *et. al.*, 2011). Para o tempo de incubação de 96 horas o IC_{50} desta linha é de 1,34 mM enquanto que o da linha celular C2BBeI é de 4,17 mM e o da linha celular WiDr é de 4,44 mM. Assim, a linha C2BBeI foi a que se revelou menos sensível ao efeito antiproliferativo do butirato essencialmente para tempos de incubação mais curtos. Para o tempo de incubação de 48 horas o valor de IC_{50} obtido na linha C2BBeI é de 14,36 mM enquanto que os das linhas LSI034 e WiDr são 6,81 e 2,84 mM, respetivamente. Esta menor sensibilização pode estar relacionada com o facto de a linha C2BBeI não expressar a proteína P53 ao contrário das outras duas células (ABRANTES, 2013). A proteína referida é responsável por atuar quando algo de anormal acontece na célula podendo conduzir a unidade biológica à apoptose ou a um estado de senescência caso a anormalidade detetada não possa ser corrigida. Assim, com a ausência da expressão da proteína P53, nos períodos mais curtos de incubação, as células da linha celular C2BBeI podem entrar em senescência e perder a sua capacidade de proliferar.

O efeito do butirato na linha celular CCD 84I CoN foi distinto do das linhas celulares tumorais não sendo possível determinar os IC_{50} às concentrações. Estes resultados demonstraram a não citotoxicidade do butirato em células não tumorais (SENGUPTA *et. al.* 2006).

O ensaio de MTT apresenta algumas limitações na avaliação da citotoxicidade visto que, apenas avalia a atividade metabólica e, por inerência a proliferação, não permitindo determinar a viabilidade celular. Contudo, esta técnica é de extrema utilidade para determinação dos valores de IC_{50} que permitem avançar para estudos de citotoxicidade.

Após a determinação dos valores de IC_{50} das três linhas selecionaram-se 3 concentrações para determinar até que ponto o efeito antiproliferativo induzido pelo butirato é acompanhado por um efeito a nível da viabilidade celular. A avaliação do efeito do butirato na viabilidade celular e o tipo de morte induzida foi realizada com recurso à técnica de citometria de fluxo, com dupla marcação AV/IP. As três concentrações escolhidas (2 mM, 5 mM e 20 mM) e o tempo de exposição ao butirato (48 horas) tiveram em conta os resultados obtidos na avaliação da atividade metabólica pelo ensaio de MTT. Assim, as concentrações de 2, 5 e 20 mM foram escolhidas de forma a permitir avaliar o efeito do butirato quando presente em concentrações abaixo do valor de IC_{50} (2mM) próximas do valor do IC_{50} da maioria das linhas celulares em estudo (5mM) e também para concentrações superiores ao valores de IC_{50} (20 mM).

De facto, após a exposição ao butirato durante 48 horas, verificou-se uma diminuição da viabilidade celular em todas as linhas celulares, de forma dependente da concentração do composto. Esta diminuição foi mais evidente nas células WiDr, quando expostas a maiores concentrações de butirato (5 e 20 mM), sendo, para tais condições, a linha celular mais sensível ao butirato. A maior sensibilidade por parte desta linha celular pode ser explicada por esta possuir um metabolismo glicolítico mais exacerbado, o que leva a uma maior acumulação de butirato quando entra na célula (corroborando com os resultados discutidos mais à frente). Em relação à concentração de 2 mM e 5 mM, a linha C2BBel foi a que se revelou ser menos sensível (com diferenças estatísticas relativamente à linha celular WiDr) corroborando estes resultados com os obtidos para o ensaio MTT, nos quais esta linha celular apresentou maior IC_{50} após 48 horas de incubação com butirato. Esta menor sensibilização pode ser justificada pela não expressão da proteína P53 já referida, o que permite às células da linha celular C2BBel acumular erros sem que estes provoquem a morte celular.

Por outro lado, a linha celular LS1034 mostrou ser a mais resistente após exposição a 20 mM de butirato durante 48 horas. Esse resultado pode ser justificado pela característica já reportada para esta linha celular, que é a sua multirresistência a diferentes fármacos (CASALTA-LOPES, *et. al.*, 2011)

Em relação aos tipos de morte estudados, para concentrações mais baixas (2 e 5 mM) verifica-se um aumento da apoptose inicial relativamente aos controlos. Na linha LS1034 este é o tipo de morte mais ativado na presença de 5 mM de butirato enquanto que, na linha C2BBel, apesar do aumento significativo relativamente ao controlo da percentagem de células em apoptose inicial, o tipo de morte predominante é a necrose (apresentando

também um aumento estatisticamente significativo relativamente ao controlo). Com 20 mM de butirato, a necrose passa a ser o tipo de morte preferencial nas linhas celulares LSI034 e WiDr (com significância estatística relativamente ao controlo para as WiDr), e continua a ser a mais ativa nas células C2BBel juntamente com a apoptose tardia/necrose (ambas com significância estatística relativamente ao controlo). Esta mudança no tipo de morte mais ativo com o aumento de concentração mostra que, para concentrações mais baixas de butirato a morte celular é, geralmente, controlada e regulada pelos mecanismos apoptóticos, enquanto que para concentrações mais elevadas, se observa um tipo de morte mais agressivo, a necrose. Assim, quanto maior a concentração de butirato, mais agressivo o tipo de morte por parte das células tumorais das linhas em estudo e menor o controlo do processo de indução morte (ELMORE, 2007).

Como foi referido, a linha celular C2BBel não apresenta expressão da proteína P53, uma proteína geralmente associada à apoptose. Mesmo sem essa expressão existiu um aumento estatisticamente significativo da percentagem de células em apoptose após o tratamento com butirato, o que sugere que o butirato induz apoptose nas células tumorais por uma via independente da P53. *Chopin et. al. (2002)* provaram que o butirato induz apoptose por uma via independente da P53, em células tumorais de cancro da mama, sendo a apoptose mediada por um aumento do transporte de BAX para a mitocôndria (CHOPIN ET, *et. al.*, 2002). Por outro lado esta constatação já foi referida por outros, como *Zhang et. al. (2010)*, os quais concluíram a mesma hipótese, numa linha celular de cancro colorretal (ZHANG, *et. al.*, 2010).

Tendo em conta que a apoptose é um dos tipos de morte induzidos pelo butirato, avaliou-se também o efeito deste composto na expressão das proteínas BAX e BCL-2. Estas duas proteínas estão associadas à via intrínseca da apoptose, sendo que a proteína BAX é sobreexpressa aquando da entrada da célula em apoptose enquanto que a proteína BCL-2 é subexpressa (GRIVICICH, *et. al.*, 2007). Assim, o aumento da razão entre a proteína pro-apoptótica BAX e a proteína anti-apoptótica BCL-2 indica uma maior ativação da via intrínseca da apoptose.

Segundo os resultados apresentados no capítulo 3.1.3, verificaram-se aumentos com significância estatística nas três linhas celulares em estudo o que é coerente com os resultados encontrados para a dupla marcação AV/IP em que houve aumentos da percentagem de células em apoptose relativamente aos controlos em todas as linhas. Verificou-se também uma tendência para um aumento desta razão com o aumento da concentração de butirato, contudo, sem significância estatística. Esta não dependência do

aumento da razão BAX/BCL-2 com o aumento da concentração de butirato vai de encontro aos factos supracitados, tendo em conta que as células, quando sujeitas a 20 mM de butirato, são conduzidas para a necrose, em que outras proteínas terão um papel primordial. A linha LSI034 foi a que apresentou um maior aumento da razão, apesar do aumento com a concentração de 20 mM. Este aumento verificado é coerente com os resultados obtidos com a dupla marcação AV/IP em que esta linha apresentou maior percentagem de células em apoptose inicial.

Choi (2006) realizou um estudo sobre o efeito do butirato em linhas celulares de leucemia e mostraram também que este composto provocava a morte por apoptose dessas células por aumento de expressão da proteína BAX e pela diminuição de expressão das proteínas BCL-2 e BCLX (CHOI, 2006). O aumento da expressão de outras proteínas pró-apoptóticas da família BCL-2 após exposição ao butirato ou a outros inibidores das HDACs está também documentado, como é o caso da BAD (SAWA, *et. al.*, 2001) e da BAK (CHIRAKKAL, *et. al.*, 2006).

Assim, é possível constatar que o butirato, um inibidor das HDAC, tem um efeito citotóxico nas três linhas celulares humanas de cancro colorretal LSI034, C2BBel e WiDr, apesar das suas diferentes localizações no intestino grosso. A sua localização no cólon revela-se importante pelo facto de o butirato apresentar um gradiente de concentração decrescente com o aproximar do reto e a incidência de tumores colorretais apresentar um gradiente crescente com o aproximar dessa zona. Ao ser considerado como citotóxico para linhas de fenótipos de localizações diferentes demonstra-se que, se a sua concentração na zona terminal do cólon for mais elevada, as células tumorais apresentarão a mesma resposta que as células de outras localizações.

Como os valores das concentrações do composto utilizadas para a realização do trabalho experimental desta dissertação estarem dentro dos valores normalmente presentes no nosso epitélio intestinal, caso a nossa dieta seja equilibrada em fibra dietética (a concentração média deste SCFA no cólon é de 20 mM) (POMARE, *et. al.*, 1987) os alimentos que nós ingerimos poderão ter um papel preponderante na prevenção ao cancro colorretal.

Assim, algumas questões continuam em aberto quanto à citotoxicidade do butirato. Dos resultados obtidos, a maior sensibilidade revelada pela linha WiDr em termos de viabilidade celular e o porquê de a linha LSI034 ser a mais sensível para longos tempos de incubação em termos de análise metabólica são difíceis de justificar. Para uma melhor compreensão do efeito do butirato nas linhas a estudo, uma análise da expressão dos transportadores de

butirato assim como da captação deste por parte dessas células poderia trazer algumas respostas.

No que diz respeito à segunda parte do trabalho experimental, esta teve como objetivo principal avaliar o efeito do butirato no metabolismo tumoral. No processo tumorigênico, as células sofrem uma reprogramação metabólica para que consigam obter a energia necessária para sustentar a elevada proliferação e para que consigam produzir organelos celulares necessários para a divisão descontrolada das células. Uma das principais alterações metabólicas que ocorre na maioria das células tumorais é o elevado fluxo glicolítico. Para uma obtenção de energia mais rápida, a célula tumoral intensifica a via da glicólise e diminui o recurso à via mitocondrial, usando-a essencialmente para o processo de anaplerose. Esta reprogramação metabólica designa-se por *efeito Warburg* e é tanto mais intensa quanto mais agressivo for o tumor (CAIRNS, *et. al.*, 2011).

Com o aumento do metabolismo glicolítico é necessário o aumento de entrada de glicose na célula, apresentando assim uma captação de glicose superior às células não tumorais e, conseqüentemente uma sobreexpressão de GLUTs. Com a segunda parte do trabalho experimental pretendeu-se averiguar se o butirato poderia interferir com estas alterações metabólicas que ocorrem nas células tumorais e que as levam a ser mais agressivas e, conseqüentemente, mais proliferativas.

Para a realização de culturas celulares recorre-se geralmente a meios em que a concentração de glicose é de 25 mM (HG). Estes meios apresentam uma concentração de glicose 5 vezes superior aos níveis de euglicemia que se verificam no humano. Recorre-se a meios com esta grande concentração de glicose para estimular o crescimento das células fora do seu ambiente normal (*in vivo*). Como já foi referido, o butirato é a principal fonte de energia das células do cólon saudável e, durante a tumorigénese esse papel passa a ser desempenhado pela glicose. As concentrações normais de butirato no cólon podem atingir os 20 mM enquanto que, a concentração de glicose no estado de euglicemia é de 5 mM. Ao se realizar o trabalho experimental com meios na condição de HG (25 mM), estimula-se o recurso das células tumorais ao consumo de glicose graças à sua maior disponibilidade, levando a que as células tumorais não recorram ao butirato. Assim, a hipótese postulada nesta etapa do trabalho teve como base a ideia de que na condição de LG (5 mM), o efeito do butirato seria mais notório. Tendo em conta a menor disponibilidade glicolítica, a célula tumoral teria de recorrer a outras fontes de energia, aumentando assim a captação de

butirato e, por consequência, a sua concentração no citoplasma. Com esse aumento de concentração o efeito antiproliferativo previamente observado seria intensificado.

Com o intuito de analisar até que ponto a disponibilidade de glicose no meio influenciaria o efeito citotóxico induzido pelo butirato, realizou-se novamente o ensaio de MTT, em que as células foram sujeitas a condições de cultura com níveis reduzidos de glicose (LG – 5 mM). Os restantes parâmetros da experiência foram mantidos de forma igual ao previamente descrito para as experiências com concentrações elevadas de glicose (HG – 25 mM). Para as 3 linhas celulares em estudo o butirato induziu uma diminuição da atividade metabólica e, por inerência, da proliferação celular, sendo esse efeito tanto maior quanto maior a concentração do composto e o tempo de exposição ao mesmo. A linha LS1034 revelou-se a mais sensível ao tratamento com o butirato a todos os tempos de incubação. A linha C2BBBeI apresentou um IC_{50} às 48 horas elevado quando comparado com as outras duas linhas revelando uma menor sensibilização ao composto. Ambas as situações tinham sido verificadas na condição de HG (com exceção de a linha LS1034 também ser a mais sensível para os tempos mais curtos de incubação).

Apesar de não se terem encontrado diferenças estatisticamente significativas entre a condição de HG e de LG, verificaram-se alterações nas curvas de concentração-resposta e respetivos valores de IC_{50} . Para tempos de incubação mais baixos, verificou-se uma tendência para uma diminuição da concentração inibitória média com a diminuição da concentração de glicose no meio. Na linha celular LS1034 a condição de LG permitiu determinar o valor de IC_{50} para as 24 horas de incubação, valor que não tinha sido possível obter para a condição de HG. Para as 48 horas de incubação com as diferentes concentrações de butirato, verificou-se um abaixamento da curva de concentração-resposta na condição LG comparativamente à condição HG, revelando assim uma maior sensibilização por parte das células ao butirato na condição de euglicemia. Essa maior sensibilização foi também acompanhada pela diminuição do valor de IC_{50} da condição HG (6,81 mM) para cerca de metade na condição LG (3,50 mM). Para os restantes tempos de incubação não se verificaram diferenças consideráveis nas curvas de concentração-resposta e nos valores de IC_{50} , possivelmente por uma saturação no transporte de butirato não influenciada pelos níveis de glicose.

Na linha C2BBBeI não foi possível determinar o valor do IC_{50} às 24 horas, como se tinha verificado na condição de HG. Mas, às 48 horas de incubação, verificou-se um abaixamento na curva de concentração-resposta comparativamente à condição HG correspondendo a uma diminuição no valor de IC_{50} de 14,79 mM para 9,74 mM o que revela uma maior

sensibilização desta linha ao butirato na condição de euglicemia. Para os restantes tempos de incubação não existem alterações consideráveis possivelmente pelo mesmo motivo do sucedido na linha LSI034.

Na linha WiDr, a utilização de meios na condição de LG não levou a uma maior sensibilização, como o verificado nas outras duas linhas celulares. Para as 48 horas de incubação o efeito acabou por ser contrário verificando-se um aumento do valor de IC_{50} de 2,95 mM em HG para 4,11 mM em LG. Nos restantes tempos de incubação não se verificaram alterações consideráveis.

Singh et al. estudaram o efeito do butirato na presença ou não de glicose no meio de cultura. Neste estudo, realizado na linha celular HT29, linha celular da qual as células WiDr derivam, concluiu-se que o butirato na condição de HG possuía um efeito antiproliferativo com todas as concentrações testadas enquanto que, na ausência de glicose do meio o butirato promovia a proliferação a valores de 2 mM e só para valores acima de 4 mM promovia a inibição da proliferação. Por analogia da linha HT29 com a linha WiDr, nesse trabalho experimental provou-se que as baixas concentrações de glicose não sensibilizam a linha ao tratamento com butirato (*SINGH, et al., 1997*). Para além disto *Heiden et al. (2001)* demonstraram que o aumento de glicose intracelular protege a célula enquanto que, uma diminuição da mesma, sensibiliza a célula a fatores externos. Essa conclusão vai de encontro ao verificado para a linha LSI034 e C2BBel, na medida em que para tempos de incubação mais curtos e com menores concentrações de glicose, estas mostraram ser mais sensíveis ao fator externo a que foram expostas, o butirato (*HEIDEN, et al., 2001*).

Para as restantes técnicas realizadas, como o objetivo a que nos propúnhamos consistia na avaliação do efeito do butirato em diferentes processos metabólicos das células viáveis, utilizaram-se concentrações de butirato que permitissem detetar essas alterações, contudo, que não induzissem morte celular. As concentrações escolhidas foram as correspondentes aos valores de IC_{50} obtidos após 48 horas de incubação com butirato na condição HG, visto que são concentrações que às 24 horas (tempo máximo a que as células foram sujeitas ao butirato ao longo destas experiências) não induzem um efeito inibitório. As concentrações utilizadas foram: 6 mM para a linha celular LSI034, 15 mM para a linha celular C2BBel e 3 mM para a linha celular WiDr. Como uma das principais diferenças metabólicas das células tumorais de cancro do cólon é o aumento da captação de glicose, fomos avaliar, por analogia, o efeito do butirato na sua captação. Avaliou-se a captação de ^{18}F -FDG, um análogo radioativo da glicose, e através desta experiência foi possível traçarem-se curvas de captação deste radiofármaco ao longo do tempo na ausência e na presença de butirato.

As diferenças mais notórias encontradas foram na condição de LG em que a captação máxima de ^{18}F -FDG diminui para cerca de metade na presença de butirato na linha WiDr, na medida em que na situação controlo a captação máxima corresponde a 8,62% enquanto que após a incubação de 1 hora e 4 horas com butirato corresponde a 4,03% e 3,40%, respetivamente. O mesmo acontece na linha celular C2BBel, em que na ausência de butirato a captação máxima foi 5,49% enquanto que após 1 e 4 horas de incubação foi de 2,51% e 2,41%, respetivamente. Assim, nas linhas celulares C2BBel e WiDr o butirato diminui consideravelmente a captação de glicose. Na condição de HG, nestas duas linhas, as diferenças não foram tão notórias apesar de na linha celular C2BBel existir uma ligeira diminuição da captação máxima. As diferenças na captação de glicose entre a condição HG e a condição LG podem ser explicadas pela diferença da concentração de glicose no meio. Como é possível observar, a captação de ^{18}F -FDG na ausência de butirato em condição LG foi em todas as linhas celulares consideravelmente superior à correspondente em condição HG. Este facto poder-se-á dever à competição do ^{18}F -FDG e da glicose pelos transportadores de glicose, pois na condição de HG essa competição é com 5 vezes mais moléculas de glicose do que na condição de LG.

Estes resultados estão de acordo com os verificados na prática clínica em que os índices de glicemia afetam o valor do diagnóstico da PET- ^{18}F -FDG (RABKIN, *et. al.*, 2010).

He *et. al.* (2007) provaram que o aumento da concentração de glicose no meio poderá atenuar o efeito do butirato e diminuir a expressão de um dos seus principais transportadores, o MCT1 (HE, *et. al.*, 2007). Assim, a elevada concentração glicose (25 mM) na condição HG, superior à de butirato utilizada para cada uma das linhas celulares, pode explicar a não existência de um efeito tão notório como na condição de LG. Na linha LSI034 não se verificou o mesmo que nas outras linhas. Para a condição de HG as curvas de captação foram semelhantes enquanto que, na condição LG ocorreu uma tendência para um aumento de captação na presença de butirato (a captação máxima verificada para as 0 horas de incubação foi de 1,81%, após 1 hora foi de 2,58% e quando sujeitas a 4 horas foi de 2,38%). A linha LSI034 sobreexpressa a glicoproteína-P (CASALTA-LOPES, *et. al.*, 2011), uma proteína de multirresistência a fármacos (do inglês *multidrug resistant* - MDR) referenciada como extrusadora do ^{18}F -FDG ou seja, quanto maior a expressão de Gp-P menor a concentração intracelular do radiofármaco (SEO, *et. al.*, 2009). Esta correlação explica o porquê de esta linha apresentar, na situação controlo, uma menor captação do análogo da glicose, dificultando assim também a avaliação do efeito do butirato.

Para transpor esses resultados para a prática clínica temos de dar maior relevância aos resultados obtidos na condição LG, visto esta ser a condição de euglicemia. Nesta condição foi notória uma diminuição da captação de ^{18}F -FDG nas células WiDr e C2BBel, sendo que a elevada extrusão de radiofármaco na linha LS1034 nos impede de retirar conclusões quanto ao efeito do butirato. Estes factos poderão indicar que a célula, na presença de butirato, poderá diminuir a intensidade do seu metabolismo glicolítico e da sua capacidade proliferativa.

Para comprovar os resultados obtidos nos estudos de captação foi também necessário avaliar o efeito do butirato nos transportadores de glicose referenciados como transportadores de FDG. Durante o processo tumoral, para que seja possível a célula anormal aumentar o consumo de glicose, esta sobreexpressa transportadores de glicose, sendo que na maioria dos casos, a célula no seu estado normal, antes de ocorrer a carcinogénese não expressa as diferentes isoformas.

A avaliação da expressão de GLUTs foi apenas realizada na condição de LG por ser a que melhor mimetiza a condição clínica e por ter sido a condição onde se obtiveram resultados mais consistentes. A expressão das isoformas GLUT-1,-3,-5 e -12 foi avaliada, já que estas isoformas se encontram descritas em referências bibliográficas como sendo as que não distinguem as diferenças entre o ^{18}F -FDG e a glicose, transportando as duas moléculas para o interior das células. Nesta revisão apenas são referidos os GLUT-1, e -3 como expressos em tumores colorretais (JADVAR, *et. al.*, 2009). Contudo, Li e colaboradores demonstraram que a linha celular HT-29 expressava também a isoforma GLUT-5 (LI, *et. al.*, 2006), assim como Mahraoui que demonstrou a mesma expressão para a linha celular Caco-2 (MAHRAOUI, *et. al.*, 1994). Em relação à isoforma GLUT-12 não existem referências bibliográficas sobre a sua expressão em cancro colorretal, sendo este um transportador apenas descoberto em 2002 e, por isso, menos estudado (ROGERS, *et. al.*, 2002).

Neste trabalho experimental avaliou-se numa primeira fase a expressão das quatro isoformas de GLUTs referidos na ausência de butirato, ou seja, na condição basal das células, a nível citoplasmático e a nível membranar. A avaliação da expressão dos transportadores ao nível membranar revela-se mais crucial para o objetivo proposto, por serem os transportadores presentes na membrana os responsáveis pela entrada de glicose e, também, do ^{18}F -FDG, nas células. Por outro lado, apesar de ainda não se saber ao certo a função e as consequências de uma elevada expressão de GLUTs a nível do citoplasma (CARVALHO, *et. al.*, 2011), supõem-se que estarão no citoplasma de forma que, assim que necessários serem recrutados para a membrana. Todas as quatro isoformas estão expressas nas três linhas,

sendo de destacar a expressão do GLUT-12 que não é referenciado como expresso em cancro colorretal. Verificou-se também que este transportador foi um dos mais expressos a nível membranar na linha LS1034 (assim como o GLUT-5) e o mais expresso na linha WiDr. Por sua vez, na membrana da linha celular C2BBel a isoforma mais expressa é o GLUT-1. Em relação aos GLUTs expressos no citoplasma na condição basal, os GLUT-3, -5, e -12 são os que apresentam maior expressão nas linhas celulares LS1034 e WiDr. Na linha C2BBel a isoforma 3 é a que apresenta maior expressão.

Para testar o efeito do butirato incubaram-se as células 0 (controlos), 1 e 24 horas antes da realização da marcação com os respetivos anticorpos. Os resultados obtidos foram posteriormente normalizados aos controlos. Na linha celular LS1034, os resultados mais promissores foram obtidos na avaliação da expressão do GLUT-5 em que se obteve diminuição da expressão tanto a nível membranar como a nível citoplasmático quando a incubação foi de 1 e 24 horas. Não se verificaram diferenças quanto à maior exposição de butirato relativamente à menor exposição revelando que a ação deste composto sobre este transportador foi rápida e não dependente do tempo de incubação. A inibição desta isoforma por parte do butirato ganha um papel ainda mais revelante quando se observam os valores de expressão basal e se verifica que o GLUT-5 é um dos transportadores de glicose mais expressos tanto a nível do citoplasma como a nível membranar. Também se verificou uma diminuição na expressão membranar do GLUT-3 após 24 horas de incubação com butirato não se verificando alterações quando as células foram sujeitas a 1 hora de incubação com o composto. Esta diminuição foi acompanhada pela inibição da sua expressão a nível citoplasmático, em que na condição de 1 hora se verificou já uma inibição na expressão desta isoforma, tornando-se ainda mais notória e com significância estatística relativamente ao controlo após 24 horas de exposição ao butirato. Neste caso, verifica-se que o butirato induziu um efeito inibitório, dependente do tempo, na expressão de GLUT-3. O butirato afetou também a expressão de GLUT-1 a nível membranar após 1 hora de incubação, não se verificando o mesmo após 24 horas, revelando que para esta isoforma o butirato promove uma resposta imediata mas não duradoura. Os resultados obtidos para a linha LS1034 na expressão de transportadores de glicose acabaram por não refletir os obtidos nos estudos de captação de ^{18}F -FDG. As alterações verificadas no GLUT-3 poderão não influenciar a captação de ^{18}F -FDG devido ao tempo de incubação com butirato ter sido bem mais curto nos estudos de captação comparado com o tempo que provocou diferenças nesta isoforma. Contudo, as diminuições de expressão a nível membranar verificadas para o GLUT-1 e -5 após 1 hora de incubação, sugerem que seria de esperar uma diminuição na captação do

radiofármaco após a incubação com butirato o que não ocorreu. Assim, é reforçada a hipótese de que a sobreexpressão de Gp-P poderá ter ditado o verificado nos estudos de captação.

Na linha C2BBeI, ao nível membranar, verificou-se um aumento de expressão dos GLUT-1 e -12 quando o tempo de incubação foi mais elevado e uma resposta imediata no GLUT-5 que levou a um aumento da sua expressão. Verificou-se também uma inibição ao nível citoplasmático dos GLUT-3 e -5 numa resposta dependente do tempo de incubação. Os resultados obtidos ao nível dos transportadores de glicose não são correlacionáveis com os obtidos nos estudos de captação da linha C2BBeI, sendo o esperado a diminuição da expressão de alguma das isoformas. Ao não haver diminuição, o butirato poderá estar a provocar alterações na cinética dos transportadores, não provocando alterações na sua expressão mas sim na sua função, por exemplo, na quantidade de glicose que atravessa cada um deles (RODRÍGUEZ-ENRÍQUEZ, *et. al.*, 2009). Outra hipótese será a de que o butirato poderá afetar nesta linha celular os facilitadores do transporte de glicose SGLTs (do inglês *sodium-glycose linked transporters*). Estes transportadores encontram-se também muitas vezes sobreexpressos em tumores (GANAPATHY, *et. al.*, 2009) e também se encontram expressos na linha celular Caco-2, da qual a linha C2BBeI é um clone (MAHRAOUI, *et. al.*, 1994).

Na linha celular WiDr verificou-se a diminuição da expressão do GLUT-3 a nível membranar após 1 hora de incubação com butirato, um tempo de incubação possível de relacionar com os estudos de captação e de justificar a diminuição de captação de ^{18}F -FDG verificada. Essa diminuição destaca-se ainda mais por não ter sido detetada nenhuma alteração de expressão das outras isoformas para o tempo de incubação mais curto. Contudo, essa diminuição não foi correspondida com o sucedido após 24 horas de incubação em que o nível de expressão voltou à normalidade. A isoforma do transportador de glicose mais expressa a nível da membrana foi a 12 sendo que, o butirato promoveu a inibição da sua expressão após 24 horas de incubação podendo estes resultados mostrar que o butirato interfere com a captação de glicose para tempos de incubação mais longos. Verificou-se também o aumento de expressão de algumas isoformas ao nível do citoplasma que, como já foi referido, a sua importância ainda não é conhecida na totalidade.

A enzima glicose-6-fosfato isomerasenão reconhece o ^{18}F -FDG-6-fosfato devido à diferença que a molécula apresenta comparativamente à glicose. Assim este entra na células pelos transportadores de glicose mas não é metabolizado como a glicose e acumula-se no citoplasma (JADVAR, *et. al.*, 2009). Assim, os estudos de captação de ^{18}F -FDG apresentam

uma grande limitação quanto à avaliação do metabolismo glicolítico, o que pode influenciar os resultados obtidos. Assim, para uma melhor avaliação do metabolismo glicolítico, e por consequência da influência do butirato no efeito *Warburg* foi possível avaliar o metabolismo da [U-¹³C]glicose por espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear, uma molécula que é reconhecida pelas enzimas inerentes ao processo metabólico como uma molécula de glicose normal. Contudo, esta molécula difere da glicose normal ao possuir carbonos-13 no lugar de carbonos-12 permitindo-nos avaliar apenas o metabolismo celular referente à glicose uniformemente marcada e distingui-lo do de outras fontes de energia pela técnica de RMN. Para a realização dessa avaliação e dos restantes estudos de RMN utilizaram-se condições de cultura em níveis baixos de glicose (LG).

Após a entrada da [U-¹³C]glicose na célula pelos transportadores de glicose, esta é convertida em duas moléculas de [U-¹³C]lactato como produto final da glicólise seguida de fermentação láctica (via hiperativada em tumores). Grande parte do [U-¹³C]lactato é libertado pela célula tumoral e assim, pela medição dos seus níveis de concentração ao longo do tempo no meio de cultura, é possível de forma indireta determinar o quão intenso está a ser o metabolismo glicolítico. Verificou-se que na linha celular LS1034, para os tempos mais longos, houve uma tendência para um aumento da formação de [U-¹³C]lactato sendo que, para os tempos mais curtos a concentração era semelhante. Estes resultados revelam semelhanças com os obtidos nos estudos de captação e excluem a hipótese de ser a sobreexpressão de Gp-P a responsável por não se poderem observar diferenças como nas outras duas linhas a estudo. Quanto aos resultados obtidos nas linhas celulares C2BBel e WiDr, corroboram os obtidos nos estudos de captação, sendo que as maiores diferenças foram obtidas na linha WiDr em que se obteve significância estatística. Assim, foi possível provar que nestas duas linhas celulares o butirato interfere com a hiperativação da via glicolítica inerente ao efeito *Warburg*. Comparando a produção de lactato nas três linhas verifica-se que a linha WiDr é a que metaboliza mais rapidamente a glicose, atingindo valores maiores na produção de lactato que as restantes linhas. A interferência do butirato na via glicolítica é comprovada pela análise da razão C3_Lac/C3_Ala. Quanto maiores forem os níveis de NADH citosólicos, maior é a conversão de piruvato em lactato. Devido a questões de sensibilidade e resolução espectral, não foi possível determinar os níveis de piruvato eficazmente, mas foi possível determinar os de um bom refletor desse composto, a alanina. Por esse motivo optou-se pela análise da razão entre lactato e alanina. Através dele é possível avaliar a razão NADH/NAD⁺ que quanto maior, mais reduzido se encontra o citosol e mais incrementada se encontra a via glicolítica (FAN, *et. al.*, 2011). Conclui-se assim que o

butirato diminui esta razão para as três linhas celulares, sendo as células WiDr as mais sensíveis ao efeito do butirato, corroborando os resultados obtidos noutros ensaios já descritos e discutidos. De realçar que também se verificou uma ligeira diminuição da razão C3_Lac/C3_Ala na linha celular LS1034, o que não era esperado tendo em conta os valores obtidos noutros ensaios.

A razão C3_Lac/C4_Glut indica-nos o acoplamento entre a glicólise e o metabolismo oxidativo, de forma que esta razão será tanto maior quanto menor a quantidade de lactato marcado com carbono-3 seguir para a mitocôndria onde a marcação acaba por se incorporar no glutamato graças ao *turnover* do ciclo de Krebs. Pelos resultados desta razão conclui-se que o butirato promoveu na linha WiDr um maior acoplamento entre as duas vias, sugerindo uma diminuição do metabolismo glicolítico. Na linha celular C2BBel não se verificaram diferenças enquanto que, na linha celular LS1034 é possível constatar um ligeiro aumento no desacoplamento das duas vias, sugerindo uma maior preponderância da via glicolítica. Para comprovar que o butirato estava a atravessar a membrana celular das três linhas celulares em estudo quantificou-se o butirato utilizando a ressonância do seu grupo metilo. A linha celular C2BBel foi a que apresentou maiores níveis de butirato no seu interior, sendo seguida pela linha celular LS1034 apesar de esta não apresentar diferenças consideráveis em relação à linha celular WiDr. Como as células foram incubadas com diferentes concentrações de butirato (as células C2BBel com 15 mM, as LS1034 com 6 mM e por sua vez, as WiDr com 3 mM) ficou demonstrado que a captação de butirato por parte das células tumorais do cólon é dependente da concentração do mesmo no meio extracelular. Segundo algumas referências, a expressão de alguns dos transportadores associados ao butirato SMCT1 e MCT1 está diminuída em tumores do cólon (GANAPATHY, *et. al.*, 2009), contudo, este também pode ser transportado para o interior das células por difusão simples. Ficou também comprovado que, apesar da linha celular LS1034 apresentar um comportamento distinto das outras duas linhas celulares em estudo em resposta à incubação com butirato, esta também o capta. Para uma melhor compreensão do transporte do butirato assim como do seu metabolismo, a realização de estudos com butirato marcado uniformemente com carbono-13 seria uma boa abordagem e poderia esclarecer alguns resultados anteriores.

A razão Q/D45 do espectro referente ao carbono 4 do glutamato permite-nos avaliar a velocidade de *turnover* do ciclo de Krebs. Esta avaliação é possível pelo facto da marcação no multipletto C4Q só aparecer após a segunda volta do ciclo de Krebs (Figura 15) e assim, quanto maior o seu valor mais voltas terão ocorrido no ciclo, maior a velocidade deste, e

mais oxidativo se torna o metabolismo celular. Numa primeira análise dos resultados obtidos, em que a incubação com butirato promoveu a diminuição desta razão, conclui-se que o SCFA promoveu um desaceleramento do ciclo de Krebs e uma diminuição do metabolismo oxidativo. Contudo, esta conclusão está errada. Ao avaliarmos a razão referida, apenas estamos a avaliar o metabolismo inerente à glicose uniformemente marcada e à velocidade do ciclo na metabolização dos intermediários que incorporaram a marcação. O butirato ao entrar numa célula normal é metabolizado na mitocôndria pela via da β -oxidação dando origem a duas moléculas de acetil-CoA (DONOHOE, *et. al.*, 2012). O mesmo pode estar a suceder nas células tumorais como já foi provado por alguns investigadores (ANDRIAMIHAJA, *et. al.*, 2009). Estas moléculas de acetil-CoA vão ser incorporadas no ciclo de Krebs no caso de ocorrência do metabolismo oxidativo da mesma forma que como as moléculas de $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ acetil-CoA referentes à metabolização da $[\text{U}-^{13}\text{C}]$ glicose. Ao se incorporarem no ciclo de Krebs irão diluir a marcação que estaria a ocorrer com carbono 13 no glutamato, levando a que a razão Q/D45 diminua. Na figura 41 é apresentada a representação esquemática desta interferência, em que as diversas moléculas de oxaloacetato provenientes de *turnovers* do ciclo de Krebs com acetil-CoA marcada vão ser ligadas a moléculas de acetil-CoA não marcadas provenientes do butirato. Dessa ligação surgem intermediários metabólicos do ciclo de Krebs com diluição de marcação comparativamente com o que sucede com a situação representada na figura 15. Assim, a diluição provoca uma diminuição da razão de C4Q comparativamente ao C4D45, pelo facto da célula tumoral estar a recorrer também ao butirato como fonte de energia e não por uma redução da velocidade de *turnover* do ciclo de Krebs.

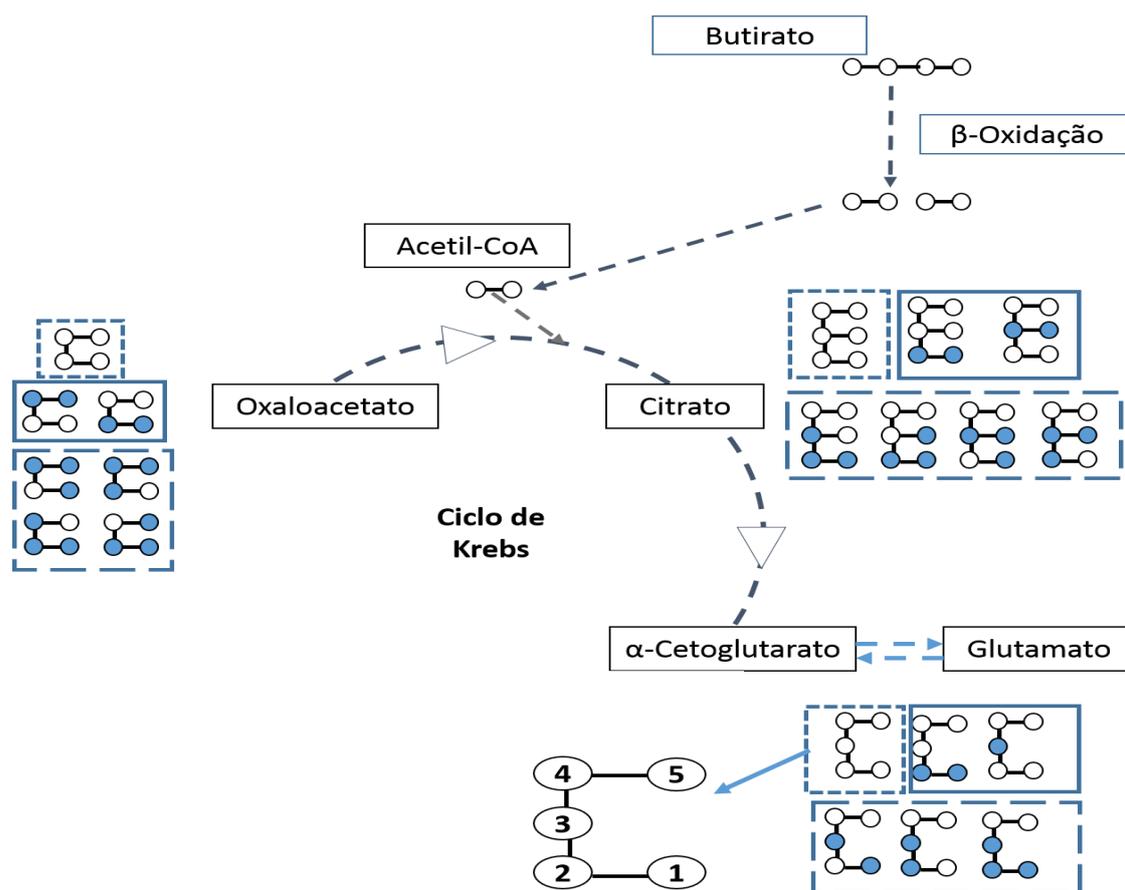


Figura 4I- Esquema representativo das diferentes diluições de marcações com carbono-13 em intermediários do ciclo de Krebs e no glutamato por incorporação de acetil-CoA não marcada proveniente da metabolização do butirato.

Pelos resultados obtidos pela determinação da razão C3S/C3Glut demonstrou-se também a diluição de marcação no glutamato. A quantificação de C3S é dependente de uma maior quantidade de glutamato marcado no carbono 3 e sem marcação nos carbonos 4 e 2. Como é observável pela figura 4I a diluição causada pelo recurso ao butirato leva à formação de glutamato com esse padrão de marcação com carbono-13.

Segundo a razão C3_Glut/C4_Glut, o butirato promove um aumento da anaplerose nas três linhas em estudo. A utilização desta razão baseia-se na conclusão de que, quando de uma anaplerose mais ativa há maior atividade da PC. A PC promove a incorporação de marcação carbono-13 nos carbonos 2 e 3 do glutamato e quanto maior essa incorporação, maior será o enriquecimento fraccionário no carbono 3 do glutamato comparativamente ao do carbono 4. Mas, pela observação da figura 4I, constata-se que a diluição de marcação com o butirato leva também a um aumento da marcação no carbono 2 e 3 do glutamato

comparativamente a outras marcações podendo assim, justificar-se o aumento verificado nesta razão. Contudo, Blouin et. al. (2011) comprovaram que a metabolização do butirato em células tumorais leva a um aumento de produção de reservas lipídicas e outras macromoléculas anapleróticas e a uma diminuição da proliferação (BLOUIN, et. al., 2011). Assim, as diferenças obtidas nesta razão podem ser um misto da diluição do butirato com um estímulo anaplerótico por ele provocado. A anaplerose é geralmente associada a uma elevada proliferação celular (DEBERARDINID, et. al., 2008), o que com os resultados obtidos acaba por ser um contrassenso (assim como por os resultados obtidos pelo grupo acima citado). Com a clara interferência na via glicolítica entre outros, prova-se que o butirato interfere com a elevada proliferação, mas assim sendo, porque razão as células apresentam esse estímulo anaplerótico? Uma das principais características do butirato é a indução da diferenciação celular, e ao promover essa mesma diferenciação a célula tumoral poderá estar a recorrer à anaplerose para a produção de reservas lipídicas e outras macromoléculas inerentes ao aumento da complexidade celular. Novamente aqui seria interessante o uso do [U-¹³C]butirato para permitir uma melhor avaliação da efectiva contribuição do butirato para o metabolismo oxidativo.

As diferenças ao longo do trabalho experimental na linha LS1034 podem ser justificadas pelo facto da concentração de butirato utilizada ser citotóxica para as células levando aos aumentos de produção de lactato e ao não estímulo do ciclo de *Krebs*. Esta linha celular foi a única que teve uma resposta ao butirato em que se tornou possível a determinação do valor de IC₅₀, após 24 horas de incubação na condição LG. Os níveis da enzima LDH, responsável pela conversão de piruvato em lactato, são um bom indicador de citotoxicidade de um composto, sendo o composto mais citotóxico quanto maiores os níveis de atividade da enzima (CORNELIA, 2009). A avaliação do efeito do butirato na atividade da enzima LDH seria um parâmetro importante a ser avaliado para uma melhor análise e justificação da diferença verificada,.

Em suma, com este trabalho foi possível avaliar o potencial do butirato ao nível de citotoxicidade e de interferência com o metabolismo glicolítico de três linhas celulares humanas de cancro do cólon com perfis genéticos e localizações de origem diferentes. Com os resultados obtidos foi possível comprovar o potencial citotóxico do butirato nas três linhas celulares em estudo sendo que, o aumento da concentração de butirato e, na maioria dos casos, o aumento do tempo de incubação aumentam esse efeito. Foi também possível verificar uma menor sensibilização por parte da linha celular não tumoral CCD 841 CoN à

inibição da proliferação por parte do butirato. Com a segunda parte do trabalho determinou-se o potencial do butirato no combate ao efeito *Warburg* e à elevada proliferação celular. O aumento da intensidade da reprogramação metabólica inerente a este efeito está associado a uma maior malignidade do tumor e a maus prognósticos (MCFATE, *et. al.*, 2008). Com os resultados obtidos comprovou-se que o butirato pode interferir com o efeito *Warburg* e diminuir o fenótipo maligno do tumor.

Para uma melhor compreensão do metabolismo do cólon e do potencial apresentado pelo butirato, pretende-se estudar o metabolismo da linha celular CCD 841 CoN na presença e ausência de butirato recorrendo aos protocolos de RMN utilizados. Assim, seria possível obter informações sobre o metabolismo no cólon saudável e a preponderância que o butirato possui nessa normalidade.

Alguns investigadores já avaliaram a hipótese de que o butirato pode interferir com o metabolismo glicolítico (BLOUIN, *et. al.*, 2011), assim como na expressão de algumas isoformas de GLUTs (LI, *et. al.*, 2006). O mesmo sucede com outros inibidores das HDAC (AMOÊDO, *et. al.*, 2011). Tanto o butirato como os inibidores das HDAC têm como função referenciada a promoção da diferenciação (LANE & CHABNER, 2009). Segundo os resultados obtidos neste trabalho e em alguns trabalhos já citados não é de descartar que as transformações metabólicas provocadas pelo butirato e outros inibidores das HDAC esteja relacionada com esta promoção da diferenciação. As células estaminais tumorais são as mais replicativas num tumor e as que apresentam o metabolismo glicolítico mais exacerbado (SELL, 2004). Com a promoção da sua diferenciação e diminuição do perfil hiperproliferativo estas possivelmente poderiam tornar-se mais suscetíveis a outras terapias ou até mesmo ao próprio efeito citotóxico dos inibidores das HDAC, como o butirato (GIANNINI, *et. al.*, 2012).

O recurso aos inibidores das HDAC para o tratamento do cancro apresenta um grande potencial com elevadas perspectivas futuras. Claramente uma melhor compreensão dos seus efeitos é necessária. Dentro desses, e como foi o tema principal desta dissertação, destaca-se o butirato e o seu potencial para o cancro do cólon. A melhor forma de obtenção deste composto no cólon em concentrações da ordem dos 20 mM é através de uma dieta rica em fibra dietética (DONOHOE, *et. al.*, 2012). Uma avaliação do efeito de uma dieta rica em fibra em animais seria uma boa abordagem para determinar se os resultados aqui apresentados se verificam *in vivo*. Desta forma, adoptando uma dieta rica em sementes integrais, como feijões e ervilhas, em algumas frutas, como banana, cereja e noz, e em alguns vegetais, como cenoura e brócolos maior o potencial para o tratamento e/ou prevenção de um dos cancros

mais incidentes e mortais a nível mundial, o cancro do cólon. Espera-se assim, que este trabalho promova uma maior curiosidade por parte da comunidade médica, assim como a sua sensibilização para a importância de uma dieta cuidada, equilibrada e rica em fibra dietética na prevenção e tratamento desta neoplasia.

5.BIBLIOGRAFIA

- ABRANTES, A. (2013). Hipóxia Tumoral - Metabonómica e Imagem, Estudo Experimental, 131–130.
- AHMAD, M. S. [et. al.] (2000). Butyrate and glucose metabolism by colonocytes in experimental colitis in mice. *Gut*, 46(4), 493–9. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1727901&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- AMOÊDO, N. D. [et. al.] (2011). Energy metabolism in H460 lung cancer cells: effects of histone deacetylase inhibitors. *PloS One*, 6(7), e22264. doi:10.1371/journal.pone.0022264
- ANDERSON J. W. [et. al.] (2009). Health benefits of dietary fiber. *Nutrition Reviews*, 67(4), 188–205. doi:10.1111/j.1753-4887.2009.00189.x
- ANDIAMIHAJA, M. [et. al.] (2009). Butyrate metabolism in human colon carcinoma cells: implications concerning its growth-inhibitory effect. *Journal of Cellular Physiology*, 218(1), 58–65. doi:10.1002/jcp.21556
- ASTIN, M., Griffin, T. [et. al.] (2011). The diagnostic value of symptoms for colorectal cancer in primary care. *British Journal of General Practice* (May), 231–243. doi:10.3399/bjgp11X572427.
- BENSINGER, S. J., & CHRISTOFK, H. R. (2012). New aspects of the Warburg effect in cancer cell biology. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 23(4), 352–61. doi:10.1016/j.semcd.2012.02.003
- BLOUIN, J. [et. al.] (2011). Butyrate elicits a metabolic switch in human colon cancer cells by targeting the pyruvate dehydrogenase complex. *Internacional Journal of Cancer*, 128, 2501–2601. doi:10.1002/ijc.25599
- BRINK, G. R. VAN DEN, & OFFERHAUS, G. J. (2007). Review The Morphogenetic Code and Colon Cancer Development. *Cancer Cell* (February). doi:10.1016/j.ccr.2007.01.003
- Brunengraber, H., & Roe, C. R. (2006). Anaplerotic molecules: current and future. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 29(2-3), 327–31. doi:10.1007/s10545-006-0320-1
- BRUNO, S. [et. al.] (1992). Features of Apoptotic Cells Measured by Flow Cytometry, *Cytometry*, 808, 795–808.
- BUCH, K., [et. al.] (2012). Determination of cell survival after irradiation via clonogenic assay versus multiple MTT Assay - A comparative study, 1–6.
- CAIRNS, R. a, HARRIS, I. S., & MAK, T. W. (2011). Regulation of cancer cell metabolism. *Nature Reviews. Cancer*, 11(2), 85–95. doi:10.1038/nrc2981
- CARVALHO, K. C. [et. al.] (2011). GLUT1 expression in malignant tumors and its use as an immunodiagnostic marker. *Clinics*, 66(6), 965–972. doi:10.1590/S1807-59322011000600008

- CASALTA-LOPES, J. [et. al.] (2011). Efflux Pumps Modulation in Colorectal Adenocarcinoma Cell Lines: The Role of Nuclear Medicine. *Journal of Cancer Therapy*, 02(03), 408–417. doi:10.4236/jct.2011.23056
- CHIRAKKAL, H., [et. al.] (2006). Upregulation of BAK by butyrate in the colon is associated with increased Sp3 binding. *Oncogene*, 25(54), 7192–200. doi:10.1038/sj.onc.1209702
- CHOPIN, V., [et. al.] (2002). Sodium butyrate induces P53-independent, Fas-mediated apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *British Journal of Pharmacology*, 135(1), 79–86. doi:10.1038/sj.bjp.0704456
- COMALADA, M., [et. al.] (2006). The effects of short-chain fatty acids on colon epithelial proliferation and survival depend on the cellular phenotype. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 132(8), 487–97. doi:10.1007/s00432-006-0092-x
- COOK, S. I., & SELLIN, J. H. (1998). Review article: short chain fatty acids in health and disease, *Aliment Pharmacol* (December 1997), 499–507.
- CORNELIA, B. (2009). Evaluation The Effect Of Some Cobalt Amino Acids Complexes Using Leukocytes As In Vitro Model For Cytotoxicity. *Bulletin UASVM Agriculture*, 66(2), 465–469.
- DASHWOOD, R. H., MYZAK, M. C., & HO, E. (2006). Dietary HDAC inhibitors: time to rethink weak ligands in cancer chemoprevention? *Carcinogenesis*, 27(2), 344–9. doi:10.1093/carcin/bgi253
- DAVEY, H. M., & KELL, D. B. (1996). Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations : the importance of single-cell analyses . *Flow Cytometry and Cell Sorting of Heterogeneous Microbial Populations : the Importance of Single-Cell Analyses*, 60(4).
- DAVIE, J. R. (2003). Inhibition of Histone Deacetylase activity by Butyrate. *Nutritional Proteomics in Cancer Prevention*, 133, 2485–2493.
- DEBERARDINIS, R. J. [et. al.] (2008). The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metabolism*, 7(1), 11–20. doi:10.1016/j.cmet.2007.10.002
- DOKMANOVIC, M., CLARKE, C., & MARKS, P. a. (2007). Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives. *Molecular Cancer Research : MCR*, 5(10), 981–9. doi:10.1158/1541-7786.MCR-07-0324
- DONALDSON, M. S. (2004). Nutrition and cancer : A review of the evidence for an anti-cancer diet. *Nutrition Journal* 21, 1–21. doi:10.1186/1475-2891-3-19
- DONOHUE, D. R., [et. al.] (2012). Article The Warburg Effect Dictates the Mechanism of Butyrate-Mediated Histone Acetylation and Cell Proliferation. *Molecular Cell*, 48(4), 612–626. doi:10.1016/j.molcel.2012.08.033
- ELMORE, S. (2007). Apoptosis: A review of Programmed Cell Death, *Toxicol Pathology* 35(4), 495–516.

- ENGSTROM, P. F., [et. al.] (2009). Colon Cancer, *Journal of the National Comprehensive Cancer Network* 7(8), 778-830.
- FAN, J. [et. al.] (2011). Tyrosine phosphorylation of lactate dehydrogenase A is important for NADH/NAD(+) redox homeostasis in cancer cells. *Molecular and Cellular Biology*, 31(24), 4938–50. doi:10.1128/MCB.06120-11
- FLEMING, M., [et. al.] (2012). Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 3(3), 153–73. doi:10.3978/j.issn.2078-6891.2012.030
- FLOCH, M. H., & HONG-CURTISS, J. (2002). Probiotics and Functional Foods in Gastrointestinal Disorders. *Current Gastroenterol reports*, 3(4):343-50
- FURTH, E. E., BRONNER, M. P., & REED, J. C. (1995). Short Communication Model. *American Journal of Pathology*, 146(1), 20–26.
- GANAPATHY, V., [et. al.] (2009). Nutrient transporters in cancer: relevance to Warburg hypothesis and beyond. *Pharmacology & Therapeutics*, 121(1), 29–40. doi:10.1016/j.pharmthera.2008.09.005
- GIANNINI, G., [et. al.] (2012). Histone deacetylase inhibitors in the treatment of cancer: overview and perspectives. *Future Medicinal Chemistry*, 4(11), 1439–60. doi:10.4155/fmc.12.80
- GIÇÇ, C. I. R., & ROWLAND, I. R. (2002). Diet and cancer: assessing the risk. *The British Journal of Nutrition*, 88 Suppl 1, S73–87. doi:10.1079/BJN2002632
- GIOVANNUCCI, E., [et. al.] (1994). Intake of Fat , Meat , and Fiber in Relation to Risk of Colon Cancer in Men Intake of Fat , Meat , and Fiber in Relation to Risk of Colon Cancer in Men ', 2390–2397.
- GLASER, K. B. (2007). HDAC inhibitors: clinical update and mechanism-based potential. *Biochemical Pharmacology*, 74(5), 659–71. doi:10.1016/j.bcp.2007.04.007
- GONÇALVES, P., [et. al.] (2009). Modulation of butyrate transport in Caco-2 cells, 325–336. doi:10.1007/s00210-008-0372-x
- GONÇALVES, P., GREGÓRIO, I., & MARTEL, F. (2011). The short-chain fatty acid butyrate is a substrate of breast cancer resistance protein. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 301(5), C984–94. doi:10.1152/ajpcell.00146.2011
- GRIVICICH, I., [et. al.] (2007). Morte Celular por Apoptose. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 53(3), 335–343.
- GUPTA, N., [et. al.] (2006). SLC5A8 (SMCT1)-mediated transport of butyrate forms the basis for the tumor suppressive function of the transporter. *Life Sciences*, 78(21), 2419–25. doi:10.1016/j.lfs.2005.10.028
- HADJIAGAPIOU, C., [et. al.] (2000). Mechanism(s) of butyrate transport in Caco-2 cells: role of monocarboxylate transporter 1. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and*

Liver Physiology, 279(4), G775–80. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11005765>

HAMER, H. M., [et. al.] (2008). Review article: the role of butyrate on colonic function. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 27(2), 104–19. doi:10.1111/j.1365-2036.2007.03562.x

HANAHAN, D., & WEINBERG, R. a. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–74. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013

HAYWOOD-SMALL, S. L., [et. al.] (2006). Phthalocyanine-mediated photodynamic therapy induces cell death and a G0/G1 cell cycle arrest in cervical cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 339(2), 569–76. doi:10.1016/j.bbrc.2005.11.046

HE, L., [et. al.] (2007). Possible mechanism for the regulation of glucose on proliferation, inhibition and apoptosis of colon cancer cells induced by sodium butyrate. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 13(29), 4015–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17663521>

HEERDE, W. L. [et. al.] (2000). Markers of apoptosis in cardiovascular tissues : focus on Annexin V, *Cardiovascular Research* 45, 549–559.

HEIDEN, M. G. [et. al.] (2001). Growth Factors Can Influence Cell Growth and Survival through Effects on Glucose Metabolism, *Molecular and Cellular Biology*, 21(17), 5899–5912. doi:10.1128/MCB.21.17.5899

HIJOVA, E., & CHMELAROVA, A. (2007). Short chain fatty acids and colonic health. *Bratisl Lek Listy*, 108(8), 354–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18203540>

Ilyas, M. [et. al.] (1997). β -Catenin mutations in cell lines established from human colorectal cancers. *Proceedings of the*, 94(September), 10330–10334. Retrieved from <http://www.pnas.org/content/94/19/10330.short>

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 : Official Publication, Society of Nuclear Medicine*, 50(11), 1820–7. doi:10.2967/jnumed.108.054098

JIANG, W. [et. al.] (2012). Dual effects of sodium butyrate on hepatocellular carcinoma cells. *Molecular Biology Reports*, 39(5), 6235–42. doi:10.1007/s11033-011-1443-5

JOSEPH, J. [et. al.] (2004). Expression profiling of sodium butyrate (NaB)-treated cells: identification of regulation of genes related to cytokine signaling and cancer metastasis by NaB. *Oncogene*, 23(37), 6304–15. doi:10.1038/sj.onc.1207852

KAPOOR, V., [et. al.] (2004). An introduction to PET-CT imaging. *Radiographics : A Review Publication of the Radiological Society of North America, Inc*, 24(2), 523–43. doi:10.1148/rg.242025724

- KIRAT, D., & KATO, S. (2006). Monocarboxylate transporter 1 (MCT1) mediates transport of short-chain fatty acids in bovine caecum. *Experimental Physiology*, 91(5), 835–44. doi:10.1113/expphysiol.2006.033837
- KUSHI, L. H., [et. al.] (2006). American Cancer Society Guidelines on Nutrition and Physical Activity for Cancer Prevention: Reducing the Risk of Cancer With Healthy Food Choices and Physical Activity. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 56(5), 254–281. doi:10.3322/canjclin.56.5.254
- LAMBERT, D. W. [et. al.] (2002). Molecular changes in the expression of human colonic nutrient transporters during the transition from normality to malignancy, 2, 1262–1269. doi:10.1038/sj/bjc/6600264
- LANE, A. a., & CHABNER, B. a. (2009). Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27(32), 5459–68. doi:10.1200/JCO.2009.22.1291
- LI, X. [et. al.] (2006). Downregulation of the Expression of GLUT1 Plays a Role in Apoptosis Induced by Sodium Butyrate in HT-29 Cell Line, 59–70.
- MACFARLANE, G. T., & GIBSON, G. R. (1997). Carbohydrate Fermentation , Energy Transduction and Gas Metabolism in the Human Large Intestine.
- 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. doi:10.1002/jcp.20166
- MAHRAOUI, L. [et. al.] (1994). Presence and differential expression of SGLT1, GLUT1, GLUT2, GLUT3 and GLUT5 hexose-transporter mRNAs in Caco-2 cell clones in relation to cell growth and glucose consumption. *The Biochemical Journal*, 298 Pt 3(1994), 629–33. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1137906&tool=pmcentrez&endertype=abstract>
- MALLOY, C. R. [et. al.] (1988). Evaluation of carbon flux and substrate selection through alternate pathways involving the citric acid cycle of the heart by ¹³C NMR spectroscopy. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(15), 6964–71. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3284880>
- MCFATE, T. [et. al.] (2008). Pyruvate dehydrogenase complex activity controls metabolic and malignant phenotype in cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(33), 22700–8. doi:10.1074/jbc.M801765200
- MURPHY, K. M., [et. al.] (2000). Bcl-2 inhibits Bax translocation from cytosol to mitochondria during drug-induced apoptosis of human tumor cells, *Cell Death and Differentiation*, 7, 102–111.
- NUNES, P. M., [et. al.] (2011). Ursodeoxycholic acid treatment of hepatic steatosis: a ¹³C NMR metabolic study. *NMR in Biomedicine*, 24(9), 1145–58. doi:10.1002/nbm.1672

- PEREIRA, S. L., [et. al.] (2011). Metabolic remodeling during H9c2 myoblast differentiation: relevance for in vitro toxicity studies. *Cardiovascular Toxicology*, 11(2), 180–90. doi:10.1007/s12012-011-9112-4
- POMARE, E. W., [et. al.] (1987). Short chain fatty acids in human large intestine , portal , hepatic and venous blood. *GUT*, 28, 1221-1227
- POTTER, J. D. (1999). Colorectal cancer: molecules and populations. *Journal of the National Cancer Institute*, 91(11), 916–32. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10359544>
- Rabkin, Z. [et. al.] (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 : Official Publication, Society of Nuclear Medicine*, 51(7), 1015–20. doi:10.2967/jnumed.109.074294
- RODRÍGUEZ-ENRÍQUEZ, S. [et. al.] (2009). Kinetics of transport and phosphorylation of glucose in cancer cells. *Journal of Cellular Physiology*, 221(3), 552–9. doi:10.1002/jcp.21885
- ROGERS, S., [et. al.] (2002). rapid communication, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 733–738.
- ROSE, D. J. [et. al.] (2007). Influence of Dietary Fiber on Inflammatory Bowel Disease and Colon Cancer: Importance of Fermentation Pattern, *Nutrition Reviews* (February), 51–62. doi:10.1301/nr.2007.feb.51
- SAURA-CALIXTO, F. (2011). Dietary fiber as a carrier of dietary antioxidants: an essential physiological function. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(1), 43–9. doi:10.1021/jf1036596
- SAWA, H., [et. al.] (2001). Histone deacetylase inhibitors such as sodium butyrate and trichostatin A induce apoptosis through an increase of the bcl-2-related protein Bad. *Brain Tumor Pathology*, 18(2), 109–14. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11908866>
- SCHARLAU, D. [et. al.] (2009). Mechanisms of primary cancer prevention by butyrate and other products formed during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre. *Mutation Research*, 682(1), 39–53. doi:10.1016/j.mrrev.2009.04.001
- SELL, S. (2004). Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Critical Reviews in Oncology/hematology*, 51(1), 1–28. doi:10.1016/j.critrevonc.2004.04.007
- Sengupta, S. [et. al.] (2006). Does butyrate protect from colorectal cancer? *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 21(1 Pt 2), 209–18. doi:10.1111/j.1440-1746.2006.04213.x
- Seo, S., [et. al.] (2009). P-glycoprotein expression affects 18 F-fluorodeoxyglucose accumulation in hepatocellular carcinoma in vivo and in vitro, *International Journal of Oncology*, 1303–1312. doi:10.3892/ijo
- Singh, B., [et. al.] (1997). Butyrate can act as a stimulator of growth or inducer of apoptosis in human colonic epithelial cell lines depending on the presence of alternative energy

- sources. *Carcinogenesis*, 18(6), 1265–70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9214612>
- SINGH, P. N., & FRASER, G. E. (1998). Dietary risk factors for colon cancer in a low-risk population. *American Journal of Epidemiology*, 148(8), 761–74. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9786231>
- TOPPING, D. L., & CLIFTON, P. M. (2001). Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiological Reviews*, 81(3), 1031–64. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11427691>
- Triantafyllidis, J. K. [et. al.] (2009). Colorectal Cancer and Inflammatory Bowel Disease : Epidemiology , Risk Factors , Mechanisms of Carcinogenesis and Prevention Strategies, *Anticancer Research*, 2738, 2727–2737.
- TWENTYMAN, P. R., & LUSCOMBE, M. (1987). A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *British Journal of Cancer*, 56(3), 279–85. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2002206&tool=pmcentrez&endertype=abstract>
- CALDAS, M. M. (2009). Imunoexpressão dos Transportadores da Glicose GLUT-1 e GLUT-2 no Adenocarcinoma do Cólon e Recto e Sua Correlação com a Clínica e o Prognóstico, 1–21.
- WARBURG, O. (1956). On the Origin of Cancer Cells. *American Association for the Advancement of Science*, 123(3191), 309–314.
- WATSON, A. J. M. (2006). An overview of apoptosis and the prevention of colorectal cancer. *Critical Reviews in Oncology/hematology*, 57(2), 107–21. doi:10.1016/j.critrevonc.2005.06.005
- YAMAUCHI, [et. al.] (2012). Colorectal cancer: a tale of two sides or a continuum? *Gut*, 61(6), 794–7. doi:10.1136/gutjnl-2012-302014
- ZHANG, Y., [et. al.] (2010). Butyrate induces cell apoptosis through activation of JNK MAP kinase pathway in human colon cancer RKO cells. *Chemico-Biological Interactions*, 185(3), 174–81. doi:10.1016/j.cbi.2010.03.035

