



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Efeitos do Crómio Hexavalente no Metabolismo Energético de uma Linha Celular do Epitélio Brônquico Humano

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Ana Margarida Urbano (Universidade de Coimbra).

Daniela Cravo Ferreira

2015

Aos meus Pais

“Amanhã é dia de nascer de novo.”

Caio Fernando Abreu

Agradecimentos

A realização desta dissertação só foi possível devido ao envolvimento e ajuda de diversas pessoas, às quais gostaria de expressar os meus sinceros agradecimentos.

À Professora Doutora Ana Margarida Urbano por me ter recebido no seu laboratório e acreditado em mim. Por tudo o que, com ela, tive oportunidade de aprender. Por todos os desafios lançados e oportunidades criadas. Por todo o acompanhamento, atenção e disponibilidade dados. Sem a sua orientação nada disto teria sido possível.

À Professora Doutora Maria Santos Sancha e ao Professor Doutor Ângelo Tomé pela simpatia e disponibilidade.

À Patrícia Abreu pela partilha de conhecimentos e pelo auxílio nos primeiros passos do desenvolvimento deste trabalho. Pela sua amizade, conselhos e disponibilidade. Sem ti esta caminhada teria sido muito mais difícil.

À Catarina Cardoso, a melhor companheira de casa, pelo apoio, carinho e amizade.

Aos meus amigos de Coimbra por todos os momentos únicos que passámos juntos e que ainda iremos passar. Obrigada por fazerem parte da minha vida e me deixarem fazer parte da vossa. Sem vocês não seria tão feliz.

Aos meus amigos da Amoreira por serem fantásticos e únicos. Por todos os bons momentos que já me proporcionaram. É com orgulho que os tenho na minha vida.

Aos meus familiares, especialmente à minha avó Natália, pelo apoio incondicional em todos os momentos. Obrigado por estarem sempre ao meu lado e pela força que me deram.

Ao Paulo por todo o amor e carinho, pelo apoio, pela força em todas as situações, pela imensa paciência e ajuda ao longo destes anos. Obrigado por nunca saíres do meu lado.

Aos meus pais porque apenas a eles devo tudo aquilo que sou e conquistei. Pela força, compreensão e paciência ao longo destes anos. Pelos valores, princípios e amor que me deram. Por me fazerem acreditar que eu consigo. Obrigada por serem um exemplo que quero seguir. Obrigado por nunca me terem largado a mão durante esta longa caminhada.

Índice

Abreviaturas	v
Sumário	ix
Abstract	xi
1. Introdução	1
1.1. Bioenergética - aspectos históricos e conceitos gerais	3
1.1.1. Respiração celular aeróbia	5
1.1.1.1. Glicólise	6
1.1.1.2. Ciclo dos ácidos tricarboxílicos	7
1.1.1.3. Fosforilação oxidativa	10
1.1.1.4. Rendimento energético	13
1.1.2. Fermentação láctica	13
1.1.2.1. Rendimento energético	14
1.1.3. Parâmetros críticos na caracterização do estado energético das células .	14
1.1.4. Cancro e bioenergética	16
1.2. Crómio hexavalente [Cr(VI)] como agente cancerígeno pulmonar	21
1.2.1. Cr(VI): aspectos gerais	21
1.2.2. Impacto do Cr(VI) no metabolismo energético celular	24
1.3. A relevância do modelo experimental em investigação científica	26
1.4. A linha celular BEAS-2B como modelo do epitélio brônquico humano	30
1.4.1. A linha celular BEAS-2B	31
1.4.1.1. O estabelecimento da linha celular BEAS-2B	32
1.4.1.2. Características da linha celular BEAS-2B	33
1.5. Objectivos	34

2. Materiais e métodos	37
2.1. Materiais gerais	39
2.2. Material biológico	40
2.3. Composição das soluções utilizadas na cultura de células	41
2.4. Equipamento	43
2.5. Cultura de células BEAS-2B	44
2.5.1. Congelamento de células	45
2.5.2. Iniciação de culturas	46
2.6. Contagem de células pelo método do azul de tripano	47
2.7. Determinação de tempos de duplicação	48
2.8. Tratamento de células com Cr(VI)	49
2.9. Tratamento de células com 2-DG	49
2.10. Ensaios de citotoxicidade	49
2.11. Avaliação de parâmetros bioenergéticos	50
2.11.1. Quantificação de glucose, de lactato, de glutamina e de amónia no meio de cultura, e dos níveis intracelulares de nucleótidos de adenina	51
2.11.1.1. Quantificação de glucose	53
2.11.1.2. Quantificação de lactato	54
2.11.1.3. Quantificação de glutamina e de amónia	55
2.11.1.4. Quantificação de nucleótidos de adenina	57
2.11.2. Quantificação de proteína em extractos celulares	58
2.12. Análise estatística	59
3. Resultados e discussão	61
3.1. Estabelecimento das condições de cultura e determinação do impacto da idade de cultura no tipo de crescimento e metabolismo energético de células BEAS-2B	63
3.1.1. Estabelecimento das condições de cultura das células BEAS-2B	63

3.1.2. Determinação do impacto da idade de cultura no tipo de crescimento e metabolismo energético de células BEAS-2B.....	66
3.2. Efeito do Cr(VI) no metabolismo energético de células BEAS-2B	69
3.2.1. Estabelecimento de protocolos.....	70
3.2.1.1. Regime de exposição ao Cr(VI).....	70
3.2.1.2. Quantificação de glucose e de lactato no meio de cultura.....	71
3.2.2. Impacto de uma exposição de 48 h a Cr(VI) no consumo de glucose e na produção de lactato.....	71
3.2.2.1. Efeito do Cr(VI) na produção de lactato na presença de um inibidor da glicólise	73
3.2.3. Impacto de uma exposição de 48 h a Cr(VI) no estado energético celular	77
3.2.3.1. Efeito do Cr(VI) nos níveis intracelulares de ATP na presença de um inibidor da glicólise	81
3.2.4. Impacto de uma exposição de longa duração a Cr(VI) no consumo de glucose	83
3.2.5. Impacto de uma exposição de longa duração a Cr(VI) no estado energético celular	84
4. Conclusões e perspectivas futuras.....	89
Referências bibliográficas.....	93

Abreviaturas

Acetil CoA	Acetil coenzima A
Ad12-SV40	Vírus híbrido do adenovírus 12 e do vírus símio 40 (do inglês “ <i>Adenovirus 12-simian virus 40</i> ”)
ADP	Adenosina difosfato (do inglês “ <i>Adenosine diphosphate</i> ”)
ALDO	Aldolase
AMP	Adenosina monofosfato (do inglês “ <i>Adenosine monophosphate</i> ”)
AT	Azul de tripano
ATP	Adenosina trifosfato (do inglês “ <i>Adenosine triphosphate</i> ”)
BSA	Albumina sérica bovina (do inglês “ <i>Bovine serum albumin</i> ”)
CO₂	Dióxido de carbono
Cr(III)	Crómio trivalente
Cr(IV)	Crómio tetravalente
Cr(V)	Crómio pentavalente
Cr(VI)	Crómio hexavalente
2-DG	2-Deoxi-D-glucose (do inglês “ <i>2-Deoxy-D-glucose</i> ”)
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês “ <i>Deoxyribonucleic acid</i> ”)
DNP	2,4-Dinitrofenol (do inglês “ <i>2,4-Dinitrophenol</i> ”)
EC	Carga energética (do inglês “ <i>Energy charge</i> ”)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês “ <i>Ethylenediamine tetra-acetic acid</i> ”)
ENO	Enolase

FADH₂/FAD	Flavina adenina dinucleótido formas reduzida/oxidada (do inglês “ <i>Flavin adenine dinucleotide</i> ”)
FCCP	Carbonilcianeto-p-trifluormetoxifenilhidrazona (do inglês “ <i>Carbonylcyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone</i> ”)
FBS	Soro fetal bovino (do inglês “ <i>Fetal bovine serum</i> ”)
FDG-PET	Tomografia por emissão de positrões com 18-fluorodeoxiglucose (do inglês “ <i>18-Fluorodeoxyglucose positron emission tomography</i> ”)
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (do inglês “ <i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i> ”)
GCL	Glutamato-cisteína ligase (do inglês “ <i>Glutamate–cysteine ligase</i> ”)
GIDH	Glutamato desidrogenase
GLS	Glutaminase
GSH	Glutationa reduzida
GTP	Guanosina trifosfato (do inglês “ <i>Guanosine triphosphate</i> ”)
HIF-1	Factor induzido por hipóxia 1
HK	Hexocinase (do inglês “ <i>Hexokinase</i> ”)
HK2	Isoforma 2 da hexocinase (do inglês “ <i>Hexokinase isoform 2</i> ”)
HPLC	Cromatografia líquida de elevada performance (do inglês “ <i>High performance liquid chromatography</i> ”)
IARC	Agência Internacional para a Investigação do Cancro (do inglês “ <i>International Agency for Research on Cancer</i> ”)
LT	Antigénio T grande (do inglês “ <i>Large T antigen</i> ”)
LDH	Lactato desidrogenase (do inglês “ <i>Lactate dehydrogenase</i> ”)

ME	Enzima málica (do inglês “ <i>Malic enzyme</i> ”)
NADH/NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido formas reduzida/oxidada (do inglês “ <i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i> ”)
NADPH/NADP⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (do inglês “ <i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i> ”)
NF-κB	Factor nuclear κB (do inglês “ <i>Nuclear factor-kappa B</i> ”)
NHBE	Células normais do epitélio bronquial humano (do inglês “ <i>Normal human bronchial epithelial</i> ”)
NTP	Programa Nacional de Toxicologia (do inglês “ <i>National Toxicology Program</i> ”)
O₂	Oxigénio molecular
PBS	Solução salina tamponizada com fosfato (do inglês “ <i>Phosphate-buffered saline</i> ”)
PCA	Ácido perclórico (do inglês “ <i>Perchloric acid</i> ”)
PDK1	Piruvato desidrogenase cinase 1 (do inglês “ <i>Pyruvate dehydrogenase kinase 1</i> ”)
PDH	Piruvato desidrogenase (do inglês “ <i>Pyruvate dehydrogenase</i> ”)
PET	Tomografia por emissão de positrões (do inglês “ <i>Positron emission tomography</i> ”)
PFK-1	6-Fosfofruto-1-cinase (do inglês “ <i>6-Phosphofructo-1-kinase</i> ”)
PGI	Fosfogluose isomerase (do inglês “ <i>Phosphoglucose isomerase</i> ”)
PGK	Fosfoglicerato cinase (do inglês “ <i>Phosphoglycerate kinase</i> ”)
PGM	Fosfoglicerato mutase
P_i	Fosfato inorgânico
PK	Piruvato cinase (do inglês “ <i>Pyruvate kinase</i> ”)

PP_i	Pirofosfato
pRB	Proteína do retinoblastoma
ROS	Espécies reactivas de oxigénio (do inglês “ <i>Reactive oxygen species</i> ”)
RP-HPLC	Cromatografia líquida de elevada performance, variante de fase reversa (do inglês “ <i>Reversed phase-high performance liquid chromatography</i> ”)
S.D.	Desvio padrão (do inglês “ <i>Standart deviation</i> ”)
SOC2	Síntese de citocromo c oxidase 2 (do inglês “ <i>Synthesis of cytochrome c oxidase 2</i> ”)
ST	Antigénio T pequeno (do inglês “ <i>Small T antigen</i> ”)
SV40	Vírus símio 40 (do inglês “ <i>Simian virus 40</i> ”)
SV40 ER	Região inicial do vírus símio 40 (do inglês “ <i>Simian virus 40 early region</i> ”)
TCA	Ácidos tricarbóxicos (do inglês “ <i>Tricarboxylic acid</i> ”)
TEA	Trietanolamina
TOOS	N-etil-N-(2 hidroxi-3-sulfopropil)m-toluidina
Trx	Tioredoxina
TPI	Triose fosfato isomerase (do inglês “ <i>Triosephosphate isomerase</i> ”)

Sumário

O crómio hexavalente [Cr(VI)] é um reconhecido agente cancerígeno pulmonar. O seu potencial para induzir o processo neoplásico foi descoberto após observação do aparecimento de diversos casos de cancro pulmonar em trabalhadores expostos a este ião. Esta descoberta promoveu a realização de estudos para observar e tentar compreender as mudanças induzidas pelo Cr(VI) ao nível celular. A desregulação do metabolismo bioenergético, uma possível mudança necessária adquirir por todas as células que sofrem transformação maligna, é uma das alterações observadas em células expostas ao Cr(VI). O consumo de glucose, de glutamina e de oxigénio (O₂), a produção de lactato e de amónia, assim como os níveis intracelulares de nucleótidos de adenina são alguns dos parâmetros bioenergéticos mais relevantes neste contexto e que parecem encontrar-se alterados após exposição das células a Cr(VI). Contudo, os estudos feitos no sentido de avaliar o efeito deste ião nos parâmetros referidos são escassos, e nem todos envolveram a utilização de um modelo representativo do epitélio brônquico humano, no qual surge a maioria dos cancros pulmonares induzidos por Cr(VI).

A linha celular BEAS-2B, estabelecida por Curtis Harris e colaboradores em 1988, tem sido extensivamente utilizada como modelo do epitélio brônquico humano em estudos relacionados com o cancro do pulmão, entre outros. Apesar desta linha celular ter sido imortalizada através de infecção viral, as células BEAS-2B retêm a maioria das características das células normais do epitélio brônquico humano e apenas promovem a formação de tumores quando em passagens elevadas.

Este trabalho teve como principal objectivo avaliar o efeito de concentrações pouco citotóxicas de Cr(VI) em alguns parâmetros do metabolismo energético de células da linha celular BEAS-2B, em condições basais e na presença de um modulador do metabolismo. Previamente, alargámos a caracterização da mesma linha celular e determinámos os efeitos das condições e idade de cultura em diferentes parâmetros, especificamente na morfologia, proliferação e metabolismo energético.

Observou-se que na ausência de revestimento, que mimetiza a matriz extracelular, o típico padrão de crescimento das culturas de células BEAS-2B se alterou, mas sem que os tempos de duplicação tenham sido afectados. Pelo contrário, os tempos de duplicação das culturas de passagem mais elevada foram superiores aos das culturas de passagem mais baixa. Adicionalmente, culturas de passagem mais elevada

apresentaram uma morfologia diferente das de passagem mais baixa. O consumo de glucose e produção de lactato não foram afectados pela idade de cultura.

A exposição a Cr(VI), tanto crónica como de longa duração, promoveu alteração para um metabolismo mais fermentativo. Esta alteração foi mais evidente para as maiores concentrações de Cr(VI). De um modo geral, observou-se um aumento no consumo de glucose e na produção de lactato. Relativamente à carga energética (EC) e aos níveis intracelulares de nucleótidos de adenina, os efeitos observados foram mais ténues, tendo-se apenas verificado um decréscimo nos níveis intracelulares de ATP após exposição de longa duração a 2 μ M de Cr(VI).

Ao incubar células com Cr(VI) na presença de um modulador de metabolismo, a 2-deoxi-D-glucose (2-DG), ocorreu um aumento na produção de lactato, mas num valor idêntico ao observado em células incubadas apenas com Cr(VI). Desta forma, concluiu-se que este efeito se deveu apenas à presença deste ião. Estranhamente, não se verificaram alterações nos níveis intracelulares de ATP nas células incubadas com 2-DG.

Palavras-chave: Cancro pulmonar, Cr(VI), BEAS-2B, bioenergética.

Abstract

Hexavalent chromium [Cr(VI)] is a known lung carcinogen. Its potential to induce the neoplastic process was discovered after the appearance of many cases of lung cancer in workers exposed to this ion. This discovery promoted many studies to observe and elucidate the changes induced at the cellular level. The deregulation of bioenergetics, a possible change suffered by all the cells that undergo a malignant transformation, is one of the changes observed in cells exposed to Cr(VI). The consumption of glucose, glutamine and oxygen (O₂), the production of lactate and ammonia, and the intracellular levels of adenine nucleotides are some of the most relevant bioenergetic parameters in this context and seem to be altered after exposure of the cells to Cr(VI). Nonetheless, studies assessing the effect of this ion in these parameters are scarce, and representative models of the bronchial epithelium, where most lung cancers induced by Cr(VI) appear, were not always used.

The BEAS-2B cell line, established by Curtis Harris and collaborators in 1988, has been extensively used as a model of human bronchial epithelium in studies related to lung cancer, among others. Although this cell line has been immortalized by viral infection, the BEAS-2B cells retain characteristics of normal human bronchial epithelial cells and only promote the formation of tumors at high passages.

This work had as main objective to evaluate the effects of concentrations of Cr(VI) nor overly cytotoxic in some bioenergetic parameters of BEAS-2B cells, under basal conditions and in the presence of a metabolic modulator. Previously, we have extended the characterization of this cell line and determined the effects of culture conditions and age on different parameters, specifically in morphology, proliferation and energy metabolism.

It was observed that in the absence of coating, which mimics the extracellular matrix, the typical growth pattern of BEAS-2B cell cultures was altered, but the doubling times were not affected. On the contrary, the doubling times of the older cultures were higher than those of younger cultures. Additionally, older cultures showed a different morphology relative to younger ones. The glucose consumption and lactate production were not affected by culture age.

Both short-term and long-term exposure to Cr(VI) promoted a more fermentative metabolism. This change was more evident for higher concentrations of Cr(VI). In general, there was an increased glucose consumption and lactate production.

Regarding the energy charge (EC) and intracellular levels of adenine nucleotides, the observed effects were more tenuous, having only a decrease in intracellular levels of ATP after a long term exposure to 2 μ M Cr(VI) been observed.

Incubation of cells with Cr(VI) in the presence of a modulator of energy metabolism, 2-deoxy-D-glucose (2-DG), led to an increased lactate production, but to a similar extent of that observed when cells were exposed to Cr(VI) only. Thus, it was concluded that this effect was due only to the presence of this ion. Intriguingly, there were no changes in ATP levels when cells were incubated with 2-DG.

Key-words: Lung cancer, Cr(VI), BEAS-2B, bioenergetics.

1. Introdução

1.1. Bioenergética - aspectos históricos e conceitos gerais

Os organismos vivos são totalmente dependentes de uma fonte constante de energia para que se consigam opor à tendência, inevitável, da natureza de decaimento para níveis energéticos menores [1].

Tal como qualquer outra transformação química, as transformações de energia necessárias à realização dos diferentes processos biológicos obedecem às leis da termodinâmica, formuladas no século XIX. A primeira lei da termodinâmica estabelece o princípio da conservação da energia, i.e., a quantidade total de energia no universo permanece constante: pode mudar de forma ou ser transportada, mas não pode ser destruída ou criada. A segunda lei da termodinâmica estabelece que o universo tem tendência para um aumento da entropia, uma vez que todos os processos implicam uma perda de energia útil [2, 3]. Da conjugação de ambas as leis conclui-se que, os organismos têm de obter energia a partir de uma fonte externa, a qual é utilizada para a sua manutenção, resistindo ao aumento da entropia. Durante o processo evolutivo, as células e organismos vivos desenvolveram mecanismos eficientes para captar a energia do sol e/ou extraí-la de moléculas oxidáveis e transferi-la para os processos que dela necessitam.

No sentido de estudar as transformações e trocas de energia das quais os organismos vivos dependem nasceu, no século XVIII, a bioenergética [4], ciência que explica o modo pelo qual as células obtêm energia para sobreviver. A bioenergética é um conjunto de reacções que permitem aos organismos converter a energia das fontes a que têm acesso em energia útil às suas células. Lavoisier e Laplace iniciaram este estudo e descobriram a respiração celular aeróbia, processo metabólico no qual há consumo de oxigénio molecular (O_2) e de moléculas oxidáveis, e produção de dióxido de carbono (CO_2) e água (H_2O). Já no início do século XX, Engelhardt descobriu que uma das moléculas com maior relevância neste processo é a adenosina trifosfato (ATP), o maior transportador de energia química em todas as células [5]. Esta molécula ocupou rapidamente um papel central no estudo da bioenergética. A oxidação de moléculas combustíveis pelos organismos vivos liberta energia que é conservada, em larga medida, sob a forma de moléculas de ATP. Desta forma, as reacções de oxidação-redução são extremamente importantes no metabolismo energético, sendo responsáveis por fornecer, em última análise, energia necessária ao trabalho realizado pelos organismos vivos [5]. A libertação de energia das moléculas de ATP envolve a

clivagem de uma das suas ligações fosfoanidrido, classificadas como ligações de alta energia, ocorrendo a sua conversão em adenosina difosfato (ADP) e fosfato inorgânico (P_i), ou em adenosina monofosfato (AMP) e pirofosfato (PP_i). As ligações de alta energia são ligações covalentes envolvendo um átomo de fósforo ou enxofre e cuja quebra liberta muita energia. Ao contrário do que a designação pode sugerir, estas ligações de alta energia não são ligações fortes [2].

Existem essencialmente dois tipos de processos metabólicos pelos quais os organismos vivos obtêm energia a partir de moléculas oxidáveis, as respirações e as fermentações, variando entre ambos o tipo de aceitador final de electrões, que é exógeno e endógeno, respectivamente. No caso das células animais, os processos utilizados são, especificamente, a respiração celular aeróbia, quando em condições aeróbias, e a fermentação láctica, quando em condições anaeróbias ou microaeróbias. Nestes processos, há transferência de electrões provenientes das oxidações para coenzimas oxidadas, como a nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) e a flavina adenina dinucleótido (FAD). Na respiração celular aeróbia, ocorre uma oxidação completa das moléculas combustíveis e o produto final da oxidação é dióxido de carbono (CO_2), molécula pobre em energia, enquanto que na fermentação láctica a oxidação das moléculas combustíveis é parcial e o produto final é uma molécula relativamente rica em energia, o ácido láctico. Desta forma, no processo fermentativo a energia extraída das moléculas oxidáveis é muito menor, comparativamente com a extraída na respiração celular (Figura 1.1.) [3]. Este assunto será mais desenvolvido nas secções 1.1.1. e 1.1.2.

Para a maioria dos organismos, a principal fonte de energia é a glucose, especificamente o enantiómero D desta molécula. Esta molécula ocupa uma posição central no metabolismo, já que esta molécula, relativamente rica em energia potencial, é também um importante precursor biossintético. No nosso organismo tem essencialmente quatro destinos: armazenamento sob a forma de polissacarídeo ou oxidação através da via das pentoses fosfato, da respiração celular aeróbia ou da fermentação láctica. O armazenamento da glucose permite à célula acumular grandes quantidades de unidades desta hexose. Assim, quando necessário, a glucose pode ser libertada rapidamente e oxidada para produzir ATP, mas também, através da via das pentoses fosfato, para produzir nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) e ribose. Na respiração celular aeróbia e na fermentação láctica, a oxidação da glucose inicia-se com a via metabólica glicólise (secção 1.1.1.1.).

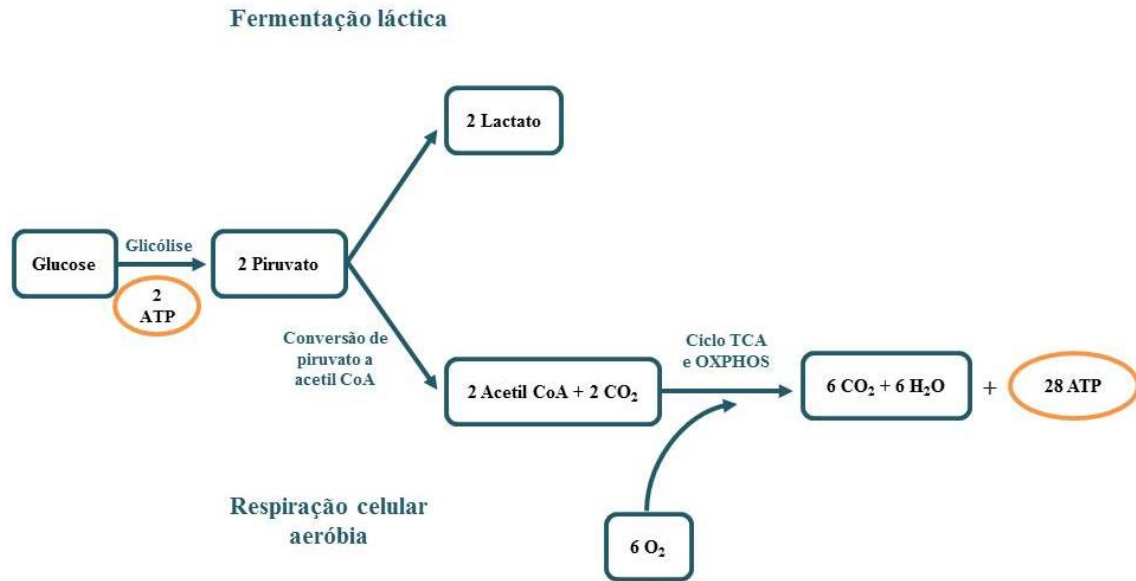


Figura 1.1. Principais vias metabólicas para geração de ATP nas células humanas, utilizando glicose como substrato. ATP, adenosina trifosfato; acetil CoA, acetil coenzima A; TCA, ácidos tricarboxílicos; OXPHOS, fosforilação oxidativa.

1.1.1. Respiração celular aeróbia

A respiração celular aeróbia engloba três vias metabólicas. Quando o substrato utilizado é a glicose, essas vias são a glicólise, o ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) e a fosforilação oxidativa (Figura 1.1.).

Das vias metabólicas anteriormente referidas, apenas a glicólise ocorre fora da mitocôndria, especificamente no citosol das células. As mitocôndrias possuem duas membranas (Figura 1.2.), a membrana mitocondrial externa, que é facilmente permeável a pequenas moléculas e iões, e a interna, que é impermeável à maioria das moléculas pequenas polares e iões. Existem, no entanto, transportadores que permitem a passagem específica destas moléculas através desta membrana. Na membrana mitocondrial interna encontram-se os componentes da cadeia respiratória e a ATP sintase. O ciclo TCA ocorre na matriz mitocondrial, onde também se encontram as enzimas nele envolvidas [2, 3].

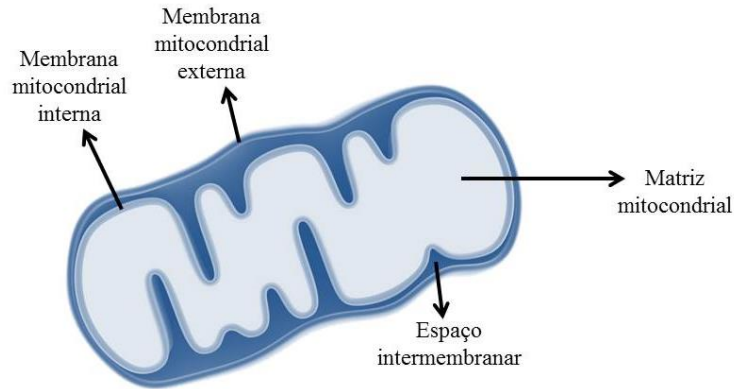


Figura 1.2. Representação esquemática da estrutura mitocondrial.

Foi apenas nos anos 50, quando foi possível isolar mitocôndrias pela primeira vez, que se compreendeu a função destes organelos intracelulares na respiração celular aeróbia e síntese de ATP. Entretanto, descobriu-se que as mitocôndrias estão também envolvidas em muitas outras funções biológicas, tais como a apoptose e manutenção do potencial redox [5].

1.1.1.1. Glicólise

Na glicólise, uma molécula de glucose é degradada enzimaticamente, originando duas moléculas de piruvato. Esta via metabólica decorre numa sequência de dez passos (Figura 1.3.), constituindo os cinco primeiros a fase preparatória. Esta fase requer o investimento de duas moléculas de ATP, mas possibilita uma oxidação mais eficaz da glucose. O ganho energético ocorre na fase seguinte, i.e., na fase de ganho energético, em que há produção de quatro moléculas de ATP. Assim, o saldo energético desta via são duas moléculas de ATP por molécula de glucose. Além da conservação de energia nas moléculas de ATP, há também conservação de uma pequena parte na forma de NADH. No entanto, a maior parte da energia permanece nas moléculas de piruvato [2, 3, 6].

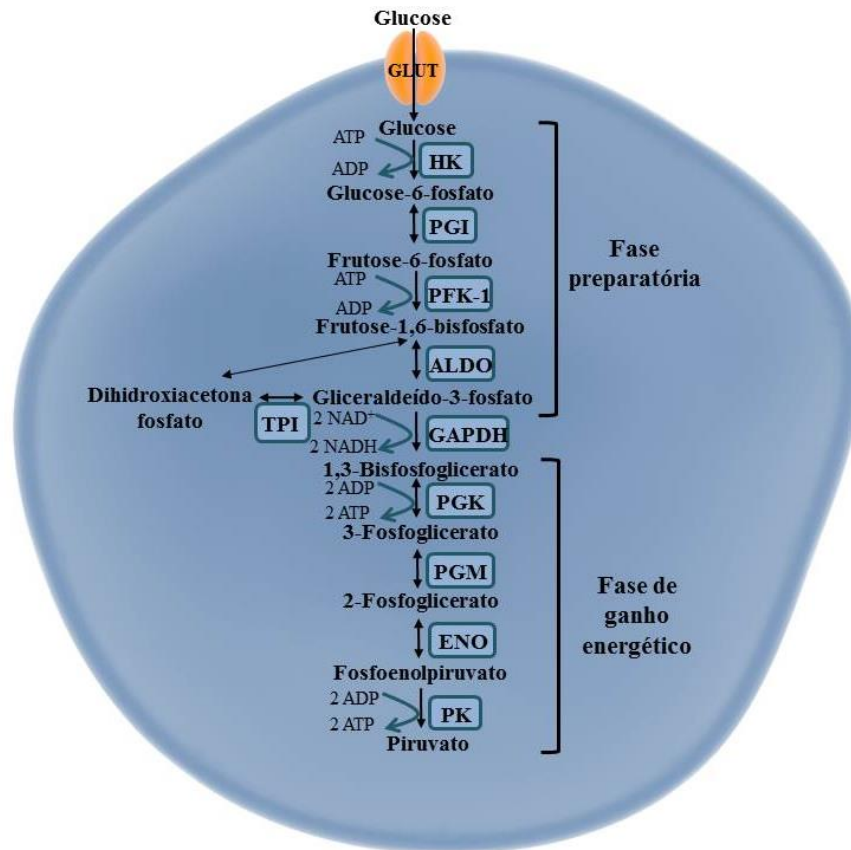


Figura 1.3. Sequência de passos da via metabólica glicólise com indicação de intermediários metabólicos e enzimas. Uma molécula de glucose é convertida em duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato na fase preparatória, e ambas as moléculas passam pela fase de ganho energético. O piruvato é o produto final desta fase. Por cada molécula de glucose convertida em duas moléculas de piruvato, são consumidas duas moléculas de ATP na fase preparatória e produzidas quatro destas moléculas na fase de ganho energético, dando um rendimento global de duas moléculas de ATP. HK, hexocinase; PGI, fosfoglucose isomerase; PFK-1, 6-fosfofruto-1-cinase; ALDO, aldolase; TPI, triose fosfato isomerase; GAPDH, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; PGK, fosfoglicerato cinase; PGM, fosfoglicerato mutase; ENO, enolase; PK, piruvato cinase.

1.1.1.2. Ciclo dos ácidos tricarboxílicos

As moléculas de piruvato não entram directamente no ciclo TCA. Antes disso, têm de ser convertidas em acetil coenzima A (acetil CoA) através de uma descarboxilação seguida de oxidação. Este passo é o elo de ligação entre a glicólise e o ciclo TCA. Para a maior parte das células, a maior fonte de acetil CoA é o piruvato que provém da glicólise, mas existem tipos celulares, tal como as células do tecido muscular cardíaco, em que a principal fonte de acetil CoA são os ácidos gordos [6].

O ciclo TCA consiste numa série cíclica de reacções (Figura 1.4.), através da qual a acetil CoA é completamente oxidada, formando CO_2 e transferindo electrões para moléculas transportadoras, especificamente NAD^+ e FAD. Esta via metabólica envolve nove passos, dos quais quatro são oxidações. Este ciclo inicia-se com a condensação do grupo acetil da acetil CoA com o oxaloacetato, um intermediário do ciclo. Em cada volta do ciclo TCA são produzidas duas moléculas de CO_2 , nos passos em que são oxidados o isocitrato e o α -cetogluturato. A energia libertada pelas oxidações é empregue na redução de três moléculas de NAD^+ e uma de FAD, e na síntese de uma molécula de ATP ou guanosina trifosfato (GTP). O número de electrões extraídos aos substratos no ciclo TCA é muito superior ao extraído na glicólise, o que, em última análise, significa uma maior produção de ATP [2, 3, 6].

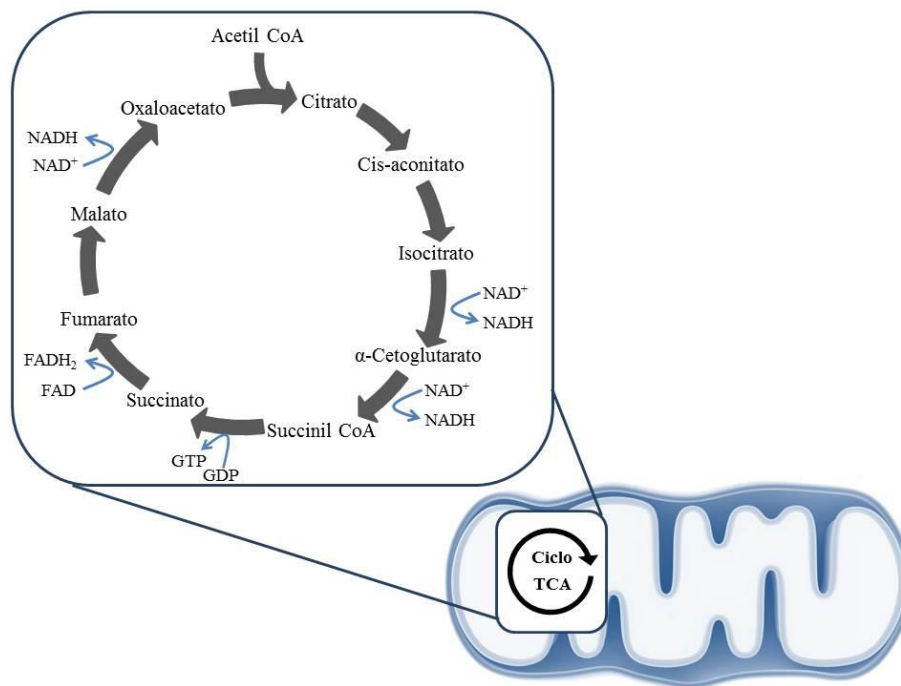


Figura 1.4. Sequência de passos do ciclo TCA com indicação dos vários intermediários. O grupo acetil da acetil CoA condensa com uma molécula de oxaloacetato formando citrato. Nas restantes reacções, cada molécula de citrato é novamente convertida em oxaloacetato, libertando-se duas moléculas de CO_2 . Em cada volta do ciclo são formadas três moléculas de NADH e uma de FADH_2 , assim como uma molécula de GTP.

O ciclo TCA é uma via anfibólica. Serve maioritariamente para produzir energia, mas, secundariamente, pode servir para formar intermediários biossintéticos

(Figura 1.5.). Para repor os intermediários do ciclo TCA utilizados em biossíntese, as células utilizam reacções anapleróticas (Figura 1.6.) [2, 5]. Em condições normais, as reacções pelas quais os intermediários do ciclo são retirados e repostos estão em equilíbrio dinâmico, mantendo as concentrações destes intermediários quase constantes [2].

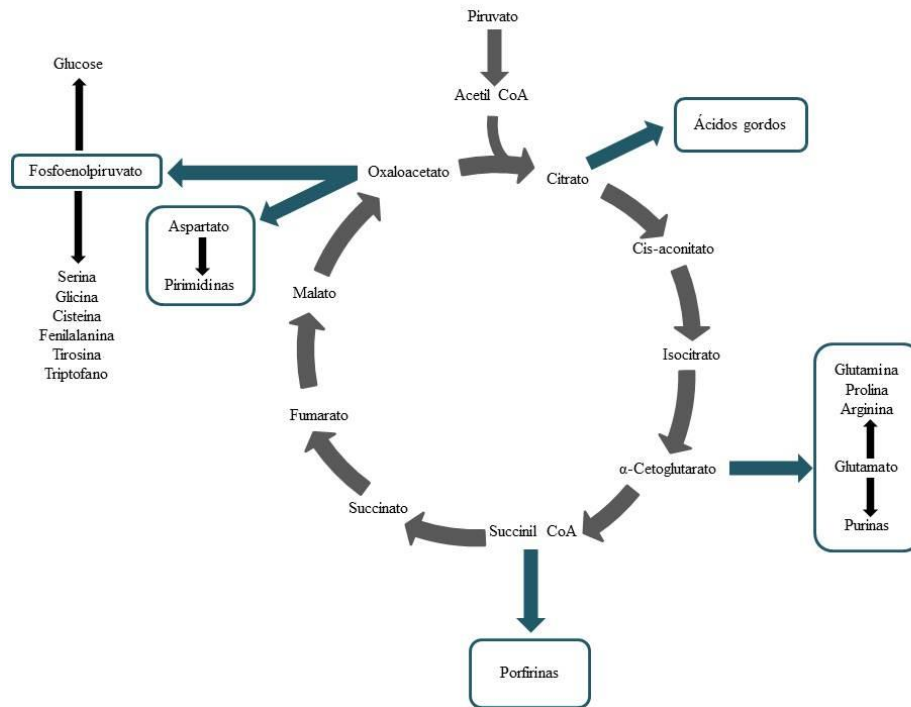


Figura 1.5. O ciclo TCA como fonte de intermediários biossintéticos.

A glutamina, o aminoácido mais importante no metabolismo energético [7], pode ser formada a partir do ciclo TCA (Figura 1.5.). Este aminoácido é extremamente importante em diversos processos biológicos. Entre estes processos, destacam-se o balanço ácido-base, síntese de proteínas e outros processos anabólicos. A glutamina constitui ainda a principal fonte de azoto para a síntese de nucleótidos na célula, e pode ser utilizada no tratamento de traumas e queimaduras, e também como suplemento para crescimento muscular e tratamento pós-cirúrgico [7, 8]. A glutamina é considerada um aminoácido não essencial, ou seja, o nosso organismo tem a capacidade de o sintetizar, por oposição aos aminoácidos essenciais, que têm de ser obtidos através da dieta.

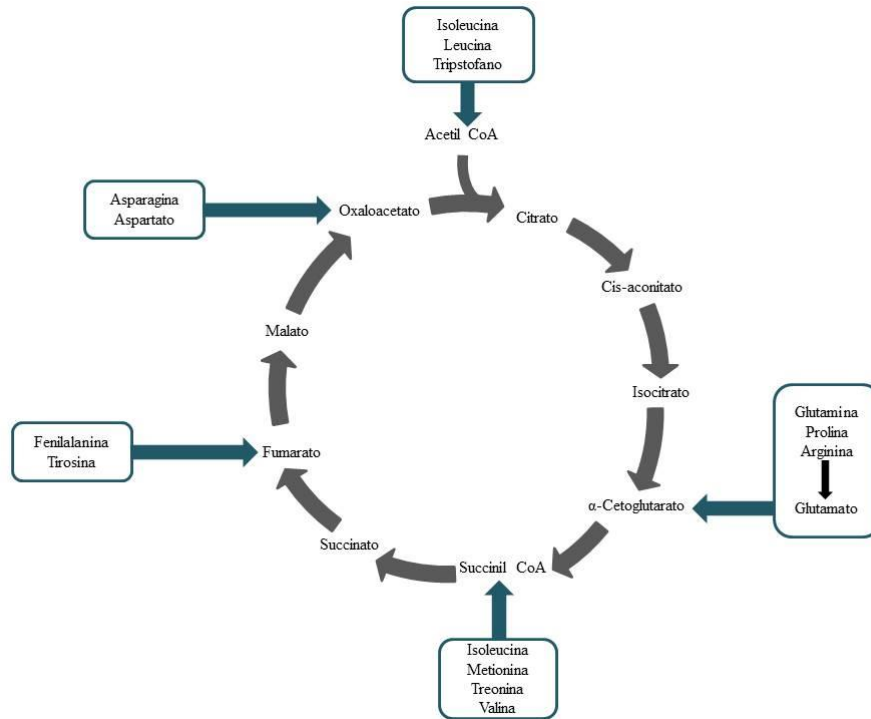


Figura 1.6. Reposição de intermediários do ciclo TCA a partir de aminoácidos.

1.1.1.3. Fosforilação oxidativa

A fosforilação oxidativa é o culminar de um longo processo de transformações oxidativas que tem como principal objectivo a produção de ATP. Os electrões provenientes das coenzimas reduzidas NADH e FADH₂ percorrem a cadeia respiratória, localizada na membrana mitocondrial interna, até ao aceitador final, o O₂.

O fluxo de electrões é exergónico, porque o O₂ possui maior afinidade por electrões do que as coenzimas reduzidas e que os transportadores intermediários. A força electromotriz dissipada é utilizada para bombear protões para o espaço intermembranar, originando um gradiente de protões. A energia armazenada no gradiente gerado, denominada força proto-motriz, apresenta dois componentes: energia potencial química, devida à diferença de concentração de H⁺ em duas regiões separadas pela membrana mitocondrial interna, e energia potencial eléctrica, resultante da separação de carga quando um protão se move através da membrana sem um contra-íão. De acordo com o modelo quimiosmótico, proposto por Peter Mitchell, quando os protões se deslocam espontaneamente a favor do seu gradiente electroquímico, a energia é disponibilizada para produzir trabalho. Nas mitocôndrias, quando os protões fluem

através de um poro de protões associado a uma ATP sintase, há síntese de ATP a partir de ADP e Pi por meio de um processo chamado fosforilação oxidativa (Figura 1.7.). Este processo é a maior fonte de ATP em células aeróbias [2, 3, 6]. O facto de a membrana mitocondrial interna ser impermeável a protões é essencial para que o gradiente protónico não seja dissipado [5].

A membrana mitocondrial interna contém os componentes da cadeia respiratória e a ATP sintase. A cadeia respiratória é composta por quatro grandes complexos proteicos (complexos I a IV), e duas unidades mais pequenas que fazem a conexão entre os quatro grandes complexos - ubiquinona e citocromo c. O complexo I catalisa simultaneamente dois processos, especificamente a transferência exergónica de um ião hidreto do NADH e um protão da matriz mitocondrial para a ubiquinona, e a transferência endergónica de protões da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar. O amital, a rotenona e a piericidina A inibem o fluxo de electrões do complexo I para a ubiquinona e, por isso, bloqueiam todo o processo de fosforilação oxidativa. O complexo II catalisa a transferência dos electrões resultantes da oxidação do succinato, pela succinato desidrogenase, no ciclo TCA, para a ubiquinona. O complexo III acopla a transferência de electrões do ubiquinol, ubiquinona reduzida, para o citocromo c com o transporte vectorial de protões da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar. O complexo IV transporta dois electrões do citocromo c para o O_2 , reduzindo-o a H_2O , e protões da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar (Figura 1.7.) [2, 5].

O consumo de O_2 e a síntese de ATP dependem da presença de um substrato oxidável, bem como de ADP e Pi. A teoria quimiosmótica explica prontamente a dependência da síntese de ATP na mitocôndria do transporte de electrões. Desta forma, é esperado que inibidores do transporte de electrões para o O_2 , como os referidos anteriormente e outros, tais como o cianeto, o monóxido de carbono e a antimicina A, bloqueiem a síntese de ATP. O inverso também se verifica, i.e., a inibição da síntese de ATP bloqueia a transferência de electrões. O acoplamento da oxidação e fosforilação pode ser demonstrado ao fornecer O_2 e substratos oxidáveis, mas não ADP, às mitocôndrias. Nestas situações, não há síntese de ATP e a transferência de electrões para o O_2 não ocorre. Usando oligomicina ou venturicidina, que se ligam à ATP sintase na mitocôndria, impedindo a síntese de ATP, também é possível demonstrar o acoplamento referido.

Certas condições e reagentes tais como o 2,4-dinitrofenol (DNP) e a carbonilcianeto-p-trifluorometoxifenilidrazina (FCCP) podem desacoplar a oxidação da fosforilação. Ambos os reagentes referidos são ácidos fracos com propriedades hidrofóbicas, o que permite que se difundam rapidamente através da membrana mitocondrial interna. Ao chegarem na matriz mitocondrial, libertam um próton, dissipando o gradiente protónico [2].

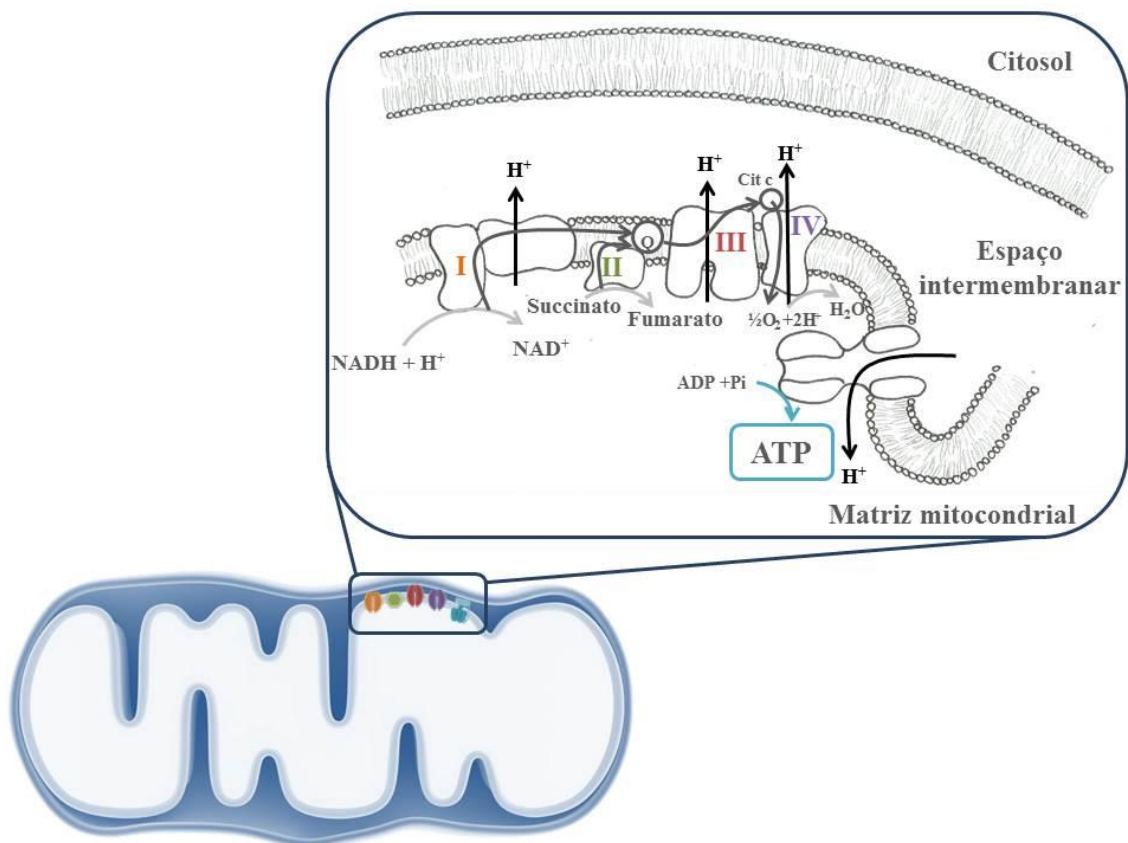


Figura 1.7. Representação esquemática do transporte de electrões e protões através da cadeia respiratória e formação de ATP pela ATP sintase. Os electrões provenientes dos complexos I e II são transportados para a ubiquinona (Q). A ubiquinona reduzida funciona como um transportador móvel de electrões. Esta vai assim transportar electrões para o complexo III que, por sua vez, os transfere para o citocromo c (Cit c). Estes electrões são transportados para o complexo IV que os transfere para o O_2 . O fluxo de electrões pelos complexos I, III e IV é acompanhado por um fluxo de protões da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar.

1.1.1.4. Rendimento energético

O rendimento total da degradação de uma molécula de glucose, por meio da respiração celular aeróbia, é cerca de 30 moléculas de ATP [9]. A glicólise tem um rendimento energético de duas moléculas de ATP e duas de NADH, a partir de uma molécula de glucose. No elo de ligação da glicólise ao ciclo TCA são geradas duas moléculas de NADH. O ciclo TCA tem um rendimento energético de duas moléculas de ATP e de FADH₂, e seis moléculas de NADH. As restantes moléculas de ATP são geradas quando os electrões das coenzimas reduzidas, NADH e FADH₂, são transferidos para o O₂. Na fosforilação oxidativa, a passagem de dois electrões do NADH e do FADH₂ para o O₂ potencia a formação de cerca de 2,5 e 1,5 moléculas de ATP, respectivamente. Já o NADH formado na glicólise potencia a formação de apenas 1,5 moléculas de ATP (Tabela 1.1.) [2].

Tabela 1.1. Rendimento energético das várias vias metabólicas envolvidas na oxidação completa de uma molécula de glucose.

	Moléculas de ATP geradas
Glicólise	2
Ciclo TCA	2
Fosforilação oxidativa	
A partir de 2 moléculas de NADH formadas na glicólise	3
A partir de 2 moléculas de NADH formadas na conversão das moléculas de piruvato a acetil CoA	5
A partir de 2 moléculas de FADH ₂ formadas no ciclo TCA	3
A partir de 6 moléculas de NADH formadas no ciclo TCA	15
Total de moléculas de ATP geradas pelo processo de respiração celular aeróbia	30

1.1.2. Fermentação láctica

A fermentação é o termo geral que define a degradação anaeróbia de moléculas combustíveis, com vista à obtenção de energia sob a forma de ATP. Pasteur foi o

primeiro cientista a observar que, em condições anaeróbias, a oxidação de glucose ocorre através de fermentação [5]. Existem diferentes tipos de fermentações que variam de acordo com o produto final. No nosso organismo, ocorre fermentação láctica, que se inicia, como já referido (secção 1.1.), pela via metabólica glicólise, seguida da redução do piruvato a lactato.

Na ausência de O₂, aceitador final de electrões, as moléculas de piruvato e de NADH produzidas não são oxidadas e o fluxo glicolítico poderia parar. De modo a evitar esta paragem, ocorre redução do piruvato a lactato permitindo que o NAD⁺ seja regenerado. A redução do piruvato é catalisada pela L-lactato desidrogenase (LDH), que forma L-lactato [2, 3] (equação 1.1.).



1.1.2.1. Rendimento energético

A fermentação láctica permite que haja produção de uma pequena, mas constante, quantidade de ATP por molécula de substrato oxidado. O rendimento em ATP sob condições anaeróbias, de duas moléculas de ATP por molécula de glucose, é muito menor que o obtido na respiração celular aeróbia. Para produzir a mesma quantidade de ATP nos dois processos, é necessário consumir perto de 15 vezes mais glucose em condições anaeróbias do que sob condições aeróbias. Porém, a fermentação láctica é um processo muito mais rápido e não requer O₂ [2].

1.1.3. Parâmetros críticos na caracterização do estado energético das células

Além do consumo de glucose, existem vários outros parâmetros bioenergéticos relevantes para a caracterização do metabolismo energético, tais como o consumo de glutamina e de O₂, a produção de lactato e de amónia, e os níveis intracelulares de nucleótidos de adenina.

A glucose, como já foi referido na secção 1.1., é a principal molécula utilizada como fonte de energia pelas células animais. Assim, os seus níveis no sangue devem permanecer sem alterações significativas de modo a assegurar um fornecimento energético constante às células [2]. Desta forma, a monitorização dos seus níveis no sangue é essencial para verificar se há homeostasia. A carência ou excesso de glucose, bem como a desregulação dos mecanismos de manutenção dos seus níveis sanguíneos, estão associados a diversas patologias, tais como a diabetes [10].

A produção de lactato é um indicador de metabolismo energético anaeróbio. Geralmente, sob exercício físico intenso, a quantidade de lactato em circulação aumenta, o que também se verifica em diversas patologias [11]. Deste modo, a quantificação da produção de lactato é essencial para ter uma percepção do modo pelo qual ocorre o metabolismo da glucose e para detectar eventuais patologias.

A glutamina, um dos aminoácidos mais abundantes no nosso organismo, está envolvida em vários processos biológicos já brevemente referidos na secção 1.1.1.2. Desta forma, a quantificação do consumo de glutamina é essencial para verificar se os seus níveis sanguíneos são adequados para a manutenção destes processos. O produto primário do metabolismo da glutamina é a amónia, a qual é tóxica para as células, inibindo o crescimento celular [12]. Assim, também a quantificação da amónia é essencial para verificar se esta não se encontra presente em níveis demasiado citotóxicos.

O ATP é essencial para que as células possam levar a cabo a maioria dos processos biológicos dependentes de energia, como já foi descrito na secção 1.1. Assim, os seus níveis devem ser mantidos constantes. Os níveis de nucleótidos de adenina são um importante indicador do estado bioenergético. Neste contexto, a EC, calculada de acordo com a equação de Atkinson (equação 1.2.), é um parâmetro particularmente importante. Um valor de EC elevado promove o anabolismo, processo redutivo em que há biossíntese e gasto de ATP, enquanto que um valor de EC baixo promove o catabolismo, processo oxidativo em que há geração de ATP [9, 13, 14].

$$\text{Carga energética} = \frac{[\text{ATP}] + \frac{1}{2}[\text{ADP}]}{[\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}]} \quad (1.2.)$$

Um dos melhores parâmetros para avaliar a respiração celular aeróbia é o consumo de O_2 . A taxa de consumo de O_2 é um parâmetro que permite avaliar a função mitocondrial, uma vez que o O_2 é maioritariamente consumido nestes organelos. Especificamente, esta taxa permite determinar o tipo de metabolismo energético adoptado pelas células [15, 16].

1.1.4. Cancro e bioenergética

Os cientistas têm, ao longo do tempo, tentado combater as doenças que assolam o Mundo. Há, no entanto, diversas que ainda se mantêm sem cura. Entre estas, estão certos tipos de cancro que afectam milhões de pessoas todos os anos. Só em 2012, estes foram responsáveis pela morte de 8,2 milhões de pessoas em todo o Mundo [17].

O processo pelo qual células normais sofrem transformação neoplásica decorre em várias fases. O entendimento completo do modo como as substâncias cancerígenas actuam e a forma como determinadas alterações genéticas vão promover este processo é essencial. Hanahan e Weinberg têm contribuído muito para esse entendimento. Em 2000 definiram, pela primeira vez, um conjunto de competências que são aparentemente adquiridas por todas as células que sofrem processos de transformação maligna. As características então definidas foram as seguintes: capacidade de sustentar a sinalização proliferativa, de escapar à acção de supressores de crescimento, de resistir à morte celular, de adquirir imortalidade replicativa, de induzir a angiogénese, de activar a invasão e a metastização [18]. A aquisição destas competências permite a proliferação descontrolada, sobrevivência e disseminação para outros tecidos, que caracteriza todas as células cancerígenas. A ordem pela qual são adquiridas varia entre os diferentes tipos de cancro, assim como o momento em que são adquiridas durante o processo de tumorigénese. Contribuem para a aquisição destas competências as seguintes características essenciais: instabilidade genómica, mutações e inflamação. Mais recentemente, em 2011, estes dois investigadores acrescentaram duas novas capacidades ao conjunto já definido: capacidade de evitar a destruição pelo sistema imunitário e de desregular o metabolismo energético celular [19]. Tornou-se, assim, mais óbvio que o metabolismo energético tem um papel importante não só na saúde, mas também em determinadas patologias, tal como o cancro. Esta apreciação do papel essencial de alterações bioenergéticas no cancro foi o culminar de uma série de observações

iniciadas, no século passado, por Otto Warburg. Este bioquímico relatou uma inesperada característica metabólica apresentada pelas células cancerígenas, que deu origem ao termo efeito de Warburg. Na presença de quantidades de O₂ adequadas, as células cancerígenas dependem mais da fermentação do que as células normais das quais derivaram [19, 20]. Claramente, esta reprogramação terá de providenciar vantagens às células cancerígenas, caso contrário não ocorreria. De modo a compensar a reprogramação metabólica sofrida pelas células cancerígenas, pouco eficiente em termos energéticos, ocorre um maior consumo de glucose, necessário para assegurar níveis adequados de ATP [21]. Este fenótipo tem sido explorado na clínica, com grande sucesso, por uma técnica de imagem, tomografia por emissão de positrões (PET), utilizando 18-fluordeoxiglucose (18-FDG) (Figura 1.8.) [22].

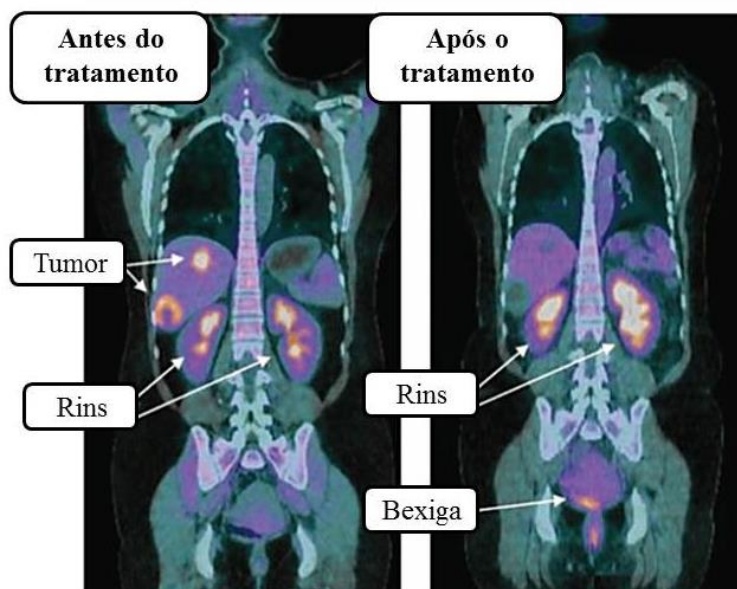


Figura 1.8. Diminuição do consumo de glucose por células tumorais, visualizado através da técnica de imagem PET utilizando 18-FDG, indicando resposta à terapia anticancerígena. As imagens resultam da fusão de imagens de FDG-PET e tomografia computadorizada (CT). Antes do tratamento é visível um grande consumo de 18-FDG (imagem da esquerda) que praticamente desaparece após 4 semanas de tratamento (imagem da direita). O excesso de 18-FDG é excretado pela urina, razão pela qual os rins e bexiga se encontram marcados. Adaptado de [30].

Além do aumento do consumo de glucose, o fenótipo bioenergético adoptado pelas células cancerígenas é também caracterizado por um aumento do consumo de glutamina [23-25] e aumento da produção de lactato [20]. A elevada taxa de produção

de lactato evita a acumulação de piruvato nas células, dado que a velocidade de conversão de piruvato a lactato pela LDH é superior à da conversão do piruvato em acetil CoA pela piruvato desidrogenase (PDH) [26]. A enzima LDH (secção 1.1.2.) ao catalisar a conversão de piruvato a lactato, regenera o NAD^+ . O lactato produzido é excretado pela célula através de transportadores existentes na membrana celular [27]. O aumento do consumo de glutamina deve-se à sua utilização para repor, anapleroticamente, intermediários do ciclo TCA que foram desviados para a síntese de compostos celulares. O malato, um intermediário do ciclo TCA, pode ser convertido em piruvato, fora da mitocôndria, pela enzima málica (ME). Nesta reacção há também produção de uma molécula de NADPH (Figura 1.9.). O piruvato assim produzido pode ser convertido em lactato [23, 25] ou em acetil-CoA [28]. A glutamina, pode ainda ser convertida em glutationa (GSH), um importante antioxidante, por acção das enzimas glutaminase (GLS) e glutamato cisteína ligase (GCL) (equação 1.3.) [21].

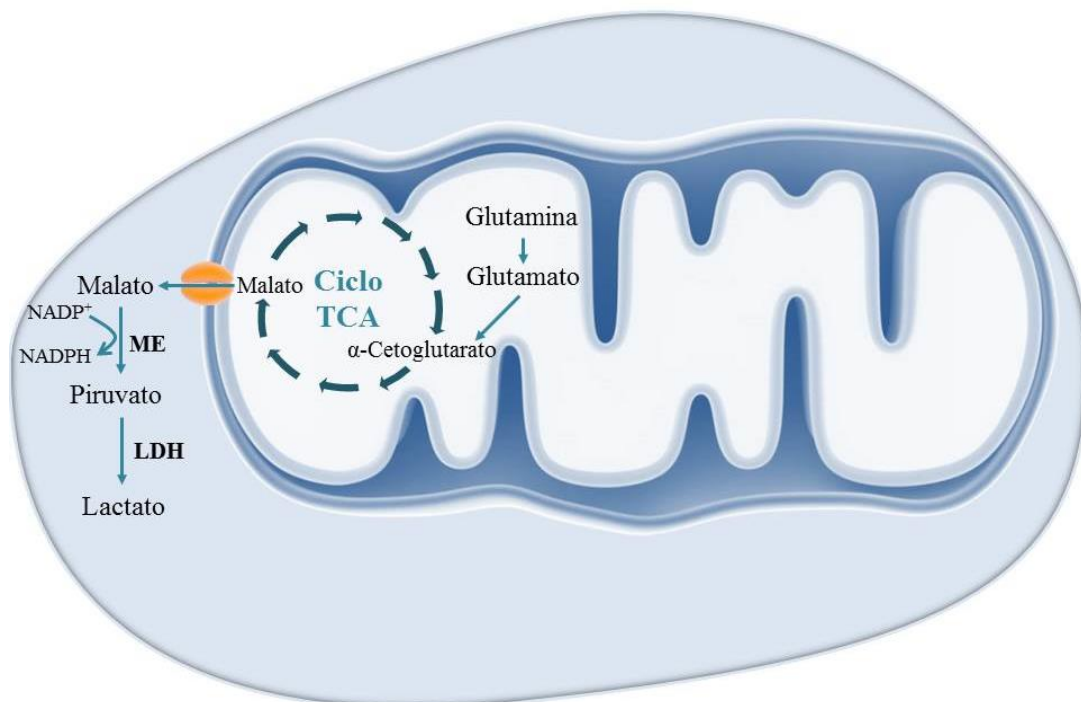


Figura 1.9. O metabolismo da glutamina permite repor intermediários do ciclo TCA e produzir NADPH. A glutamina pode ser convertida em malato, um intermediário do ciclo TCA. O malato, no exterior da mitocôndria, pode ser convertido em piruvato pela enzima málica (ME), produzindo NADPH. O piruvato é convertido por acção da enzima LDH em lactato, que é facilmente excretado pela célula.



As alterações características do efeito Warburg podem surgir através da activação de determinados oncogenes [29, 30]. Similarmente, a inibição [31], ou activação de determinadas proteínas [32], pode também promover o aparecimento destas alterações. Estes oncogenes e proteínas vão ser discutidos ao longo desta secção.

O oncogene *MYC* quando expresso tem a capacidade de promover a transcrição de genes glicolíticos e glutaminólicos e estimular a biogénese mitocondrial [33, 34]. Estas descobertas estabeleceram que o Myc é um regulador importante do metabolismo. Recentemente, sugeriu-se que um dos papéis do Myc é a amplificação dos programas de expressão génica [35]. Em ratos modificados geneticamente para sobreexpressar *MYC* em hepatócitos, verificou-se um aumento da taxa de fermentação láctica e o aparecimento de tumores no fígado. A inibição da expressão de *MYC* levou à diminuição da taxa de fermentação láctica [36]. A expressão do oncogene *RAS* promove um aumento da glicólise, embora o mecanismo pelo qual isso ocorre ainda não esteja definido [37]. Além destes oncogenes, também o oncogene *AKT*, quando expresso, tem a capacidade de promover um aumento da taxa de fermentação láctica [38]. Além disso, está envolvido na regulação de vários processos, tais como a apoptose, proliferação e metabolismo [39]. A proteína p53 tem, entre outros, um importante papel no controlo do ciclo celular identificando danos no ácido desoxirribonucleico (DNA). Sempre que o genoma se encontra danificado, a proteína p53 vai impedir que o processo de divisão celular continue e a célula permanece na fase G1. A progressão para a fase S ocorre apenas caso o DNA seja reparado. Nos casos em que o dano é irreparável, é induzida morte celular por apoptose [40]. Porém, quando inactivada, a proteína p53 não induz morte celular mesmo na presença de danos no DNA. Consequentemente, as células com danos no DNA prosseguem no ciclo celular, acumulando mutações e alterações a nível cromossómico. A proteína p53 actua a diferentes níveis para reprimir a glicólise, nomeadamente através da prevenção da activação alostérica da enzima glicolítica 6-fosfofruto-1-cinase (PFK-1) [31] e através da inibição da sinalização por AKT [41]. Simultaneamente, a p53 aumenta o fluxo através da cadeia respiratória ao aumentar os níveis da proteína *Synthesis of Cytochrome c Oxidase 2* (SCO2) [42]. A SCO2 é uma chaperone essencial para a construção do complexo IV (citocromo c oxidase) da cadeia

transportadora de electrões. Este catalisa a transferência de electrões do citocromo c para O₂, permitindo que o gradiente protónico, através da membrana mitocondrial interna se mantenha, condição necessária para que a produção de ATP através do processo respiratório ocorra. Na ausência da proteína SCO2, o complexo citocromo c oxidase não é formado correctamente. Consequentemente, ocorre um desvio para um metabolismo mais fermentativo, de modo a haver uma eficiente produção de ATP [42]. Desta forma, mutações que inactivem o gene que codifica a proteína p53, o *TP53*, como é comumente observado em tumores, promovem a alteração para um metabolismo fermentativo [43].

Em 2008, observou-se uma outra interligação entre a reprogramação metabólica e a proteína p53. Especificamente, verificou-se um aumento na taxa de fermentação láctica aquando da activação do factor de transcrição NF-κB, a qual ocorreu após inactivação de p53 [44].

Na maioria dos cancros humanos, verificam-se elevados níveis de factor induzido por hipóxia 1α (HIF-1α) que podem ser induzidos por determinadas alterações genéticas nas células cancerígenas, mas também devido à existência de locais de hipóxia no próprio tumor [32, 45]. O factor induzido por hipóxia 1 (HIF-1) é um factor de transcrição envolvido na modulação do metabolismo celular em resposta à quantidade de O₂ disponível [32]. É constituído por duas subunidades, HIF-1α e HIF-1β, sendo a subunidade HIF-1α sensível aos níveis de O₂. Esta é continuamente produzida, mas a sua estabilidade é regulada pela disponibilidade de O₂ presente [46]. Na presença de níveis normais de O₂, esta subunidade sofre uma modificação pós-tradução (é ubiquitinada) e, consequentemente, degradada. Em períodos de carência de O₂, a enzima responsável por modificar a HIF-1α é inactivada, devido à privação de O₂ ou à existência de espécies reactivas de oxigénio (ROS) geradas pela mitocôndria [47]. Desta forma, o HIF-1 é transportado para o núcleo onde promove a activação dos genes que codificam a LDH e a piruvato desidrogenase cinase 1 (PDK1), entre outros [48]. A PDK1 é responsável pela inibição da PDH através de fosforilação. Desta forma, a conversão de piruvato a acetil-CoA é inibida. A activação das enzimas LDH e PDK1 vai claramente impedir que o piruvato prossiga para o ciclo TCA [32]. Em 2007, descobriu-se que o Myc cooperava com o HIF-1 promovendo o aumento da expressão das enzimas PDK1 e hexocinase 2 (HK2), estando esta última envolvida no primeiro passo da glicólise, promovendo a alteração para um metabolismo fermentativo [49].

1.2. Crómio hexavalente [Cr(VI)] como agente cancerígeno pulmonar

Em 2012 verificaram-se 1,8 milhões de novos casos de cancro do pulmão, cerca de 13% do total de casos de cancro diagnosticados. Este tipo de cancro é a principal causa de morte por cancro no sexo masculino, quer em países desenvolvidos (416 700 mortes), quer em desenvolvimento (682 000 mortes), e no sexo feminino, em países desenvolvidos (209 900 mortes) [17]. A elevada mortalidade associada ao cancro do pulmão deve-se ao facto deste ser detectado, na maioria dos casos, num estado já avançado em que os tratamentos disponíveis são geralmente paliativos [50].

O crómio hexavalente [Cr(VI)] é reconhecido como um agente cancerígeno pulmonar por numerosas agências internacionais, tais como a Agência Internacional para a Investigação do Cancro (IARC) [51] e Programa Nacional de Toxicologia (NTP) [52]. No entanto, existem algumas suspeitas de que o Cr(VI) também possa promover cancro em tecidos do sistema nervoso central e gastrointestinal. Porém, ainda não existem dados suficientes que suportem estas suspeitas [53, 54].

1.2.1. Cr(VI): aspectos gerais

Constituindo um dos elementos mais abundantes da crosta terrestre, o crómio existe em vários estados de oxidação (-II a +VI), o que ilustra bem a sua enorme versatilidade [55]. Após a sua descoberta, no século XVIII, por Vauquelin, rapidamente se começou a compreender as suas potencialidades. Entre a ampla gama de aplicações deste elemento, pode referir-se o curtimento de peles, o acabamento de metais, a produção de pigmentos, de aço inoxidável, de conservantes de madeira e de soluções para limpeza de vidros, entre muitas outras [55].

As enormes potencialidades apresentadas pelo crómio levaram a que as indústrias refractária, química e metalúrgica passassem a empregá-lo amplamente. À medida que a sua aplicação industrial se intensificou, os efeitos adversos provocados pela sua aplicação foram-se manifestando [56]. Os compostos de crómio eram reconhecidos como agentes irritantes para a pele provocando eczemas e dermatite de contacto, mas o mais preocupante era a possibilidade destes serem agentes cancerígenos. De facto, parecia haver uma relação entre a exposição ocupacional ao crómio e um aumento da incidência de cancro do pulmão nos trabalhadores [55].

Em 1890, David Newman detectou um tumor maligno num trabalhador exposto a crómio, mas é provável que, na altura, não tenha tido a percepção da importância da sua observação [57]. Seguiram-se vários estudos na tentativa de pôr em evidência uma possível relação entre a exposição a este elemento e um aumento da incidência de cancro. Esta relação foi claramente estabelecida por vários estudos epidemiológicos. Machle e Gregorius foram os primeiros investigadores a realizar um estudo epidemiológico no qual demonstraram uma elevada taxa de mortalidade por cancro pulmonar em trabalhadores expostos a crómio [58]. Seguiram-se diversos estudos com o objectivo de determinar concretamente se existiria algum estado de oxidação particular que fosse responsável por este efeito cancerígeno [59, 60].

A determinação do estado de oxidação do crómio responsável pelo efeito cancerígeno foi alvo de debate ao longo de várias décadas, tendo este sido sempre centrado entre dois estados de oxidação, os estados trivalente [Cr(III)] e hexavalente [Cr(VI)], dado que são os estados de oxidação mais estáveis e relevantes em sistemas biológicos [59, 61]. Os resultados obtidos revelaram-se, inicialmente, muito contraditórios relativamente aos efeitos provocados por cada um destes estados de oxidação. Por exemplo, diversos estudos epidemiológicos revelaram que trabalhadores expostos exclusivamente a Cr(III) não apresentavam uma incidência aumentada de cancro [62], logo seria de esperar que fosse o Cr(VI) o responsável pelos efeitos cancerígenos. No entanto, *in vitro*, o Cr(III) tinha mais tendência do que o Cr(VI) para reagir com proteínas, ácidos nucleicos e outras biomoléculas, alterando as funções normais destas e causando danos nos sistemas biológicos [53]. O facto de os dois estados de oxidação formarem complexos distintos explica esta aparente contradição. Assim, embora o Cr(III) tenha, na realidade, uma maior capacidade para interagir com biomoléculas, os complexos que forma são geralmente octaédricos e a pH fisiológico encontram-se carregados positivamente, não conseguindo atravessar a membrana das células [63]. Por outro lado, sob condições fisiológicas, o Cr(VI) apresenta-se maioritariamente na forma de oxianião $(\text{CrO}_4)^{2-}$ [63]. Este ião apresenta uma estrutura tetraédrica, o que lhe permite entrar através de canais aniónicos não-selectivos, tal como ocorre com complexos tetraédricos aniónicos de fosfatos e sulfatos [64]. O Cr(VI) tem um forte potencial oxidativo e, conseqüentemente, reduz-se rapidamente a Cr(III) no interior das células [55]. O Cr(III) é então o ião que vai formar complexos com ácidos nucleicos, proteínas e outras biomoléculas [65]. Concluiu-se, desta forma, que o Cr(VI) é indubitavelmente o ião cancerígeno. As espécies intermediárias reactivas da redução

do Cr(VI) a Cr(III), especificamente o crómio pentavalente [Cr(V)] e tetravalente [Cr(IV)], podem também induzir efeitos prejudiciais nas células [64, 66].

Enquanto o Cr(VI) existente no ambiente tem origem, quase totalmente, nas actividades humanas, o Cr(III) ocorre naturalmente na natureza [67]. O Cr(III) apresenta baixa toxicidade e, quando ingerido oralmente ou inalado, é excretado através da urina. A sua absorção através da pele parece não ocorrer [68]. Actualmente, sabe-se que o Cr(III), em baixas concentrações, é um ião essencial para o nosso organismo [55, 61]. Por outro lado, a exposição a Cr(VI) induz uma reacção alérgica caracterizada por dermatite, e a sua ingestão leva na maioria dos casos à morte, uma vez que a dose letal é relativamente baixa [55]. O nosso organismo tem a capacidade de reduzir uma grande parte do Cr(VI) antes da sua entrada nas células, reduzindo manifestamente o potencial cancerígeno deste ião [53]. Essa redução ocorre essencialmente nos pulmões e no estômago. Porém, esta capacidade pode revelar-se insuficiente para impedir a entrada deste ião nas células, caso a quantidade de Cr(VI) seja muito elevada e/ou a exposição prolongada. Exemplo disso é a inalação ocupacional de partículas contendo Cr(VI) que se vão acumular nas bifurcações existentes na árvore brônquica. A partir destas bifurcações ocorre uma lenta libertação de Cr(VI) que, pelas razões acima referidas, pode por fim escapar aos mecanismos extracelulares de defesa e entrar nas células (Figura 1.10.). De facto, a maioria dos tumores pulmonares associados à exposição a Cr(VI) encontram-se justamente nos locais onde este ião se acumula, especificamente nas bifurcações já referidas [69, 70].

A população geral pode estar em risco devido à dispersão no ambiente destes agentes cancerígenos através da deposição de lixo contendo Cr(VI), emissão de gases de combustão e fumo de tabaco, entre outras fontes [55, 67]. Os efeitos adversos associados à exposição a Cr(VI) levaram à necessidade de implementar medidas para diminuir os riscos para a saúde pública. Pelo facto deste ião ter diversas aplicações foi necessário que as medidas implementadas não comprometessem a sua utilização. Foram implementadas medidas de segurança com vista à diminuição dos níveis de crómio aos quais os trabalhadores são expostos. Porém, no que toca à exposição ambiental, é muito mais difícil controlar os níveis de crómio aos quais a população é efectivamente exposta. Apesar de terem vindo a ser desenvolvidas várias estratégias para diminuir a poluição por compostos de crómio, os resíduos contendo crómio não são facilmente biodegradáveis [63]. Compreende-se, assim, a razão pela qual inúmeros investigadores tentam compreender os mecanismos de acção pelos quais o Cr(VI) promove o processo

cancerígeno. Apesar de inúmeros estudos ainda muito pouco se sabe. Além disso, há muitos resultados contraditórios. Um dos factores que contribui para este problema é a utilização de modelos experimentais pouco adequados aos estudos em questão.

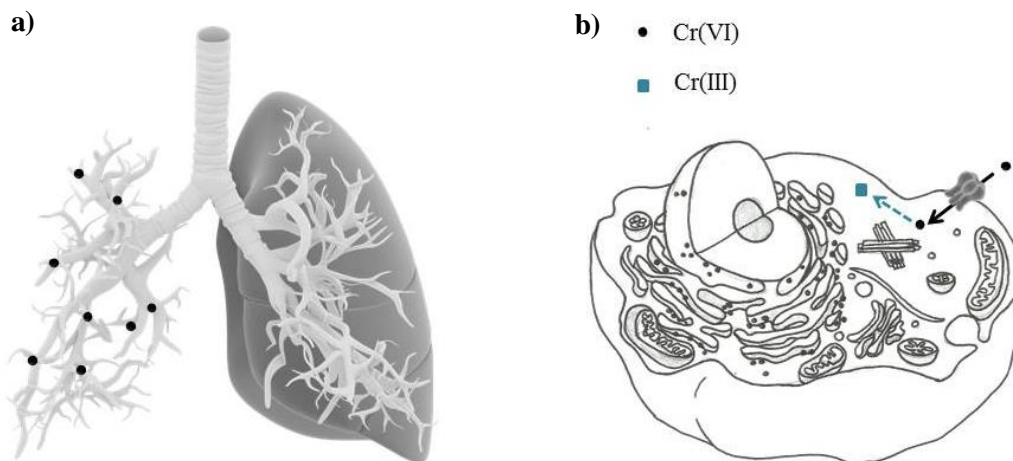


Figura 1.10. Representação esquemática dos locais de acumulação de Cr(VI) nas bifurcações da árvore brônquica (a) e entrada deste nas células, através de canais não selectivos (b). No interior das células, o Cr(VI) é reduzido a Cr(III).

1.2.2. Impacto do Cr(VI) no metabolismo energético celular

Foram realizados já muitos estudos para tentar verificar se as células expostas a Cr(VI) exibem as capacidades descritas por Hanahan e Weinberg (secção 1.1.4.). Recentemente, a desregulação do metabolismo energético celular tem merecido particular atenção. Na verdade, os primeiros estudos com vista à determinação do efeito do Cr(VI) no metabolismo energético celular datam já do século passado [71]. Logo nestes estudos, ficou demonstrado um efeito no metabolismo celular como consequência directa de uma exposição a Cr(VI). Todos os estudos posteriores, alguns dos quais realizados no nosso laboratório [66, 72], revelaram alterações ao nível bioenergético, mais concretamente ao nível do consumo de glucose, de glutamina e de O_2 , da produção de lactato e de amónia, e dos níveis intracelulares de nucleótidos de adenina [66, 72-88].

Os efeitos do Cr(VI) ao nível do consumo de O_2 e de glucose, e da produção de lactato foram estudados pela primeira vez no nosso laboratório, em 2011, na linha

celular PC-12, uma linha celular derivada de células de feocromocitoma da medula supra-renal de rato (linha celular PC-12). Uma exposição de 6 horas a Cr(VI) levou a alterações em todos os parâmetros estudados. Especificamente, observou-se um aumento do consumo de glucose e da produção de lactato e uma diminuição do consumo de O₂ [66]. Mais tarde, realizaram-se outros dois estudos nos quais se verificou o efeito do Cr(VI) nos mesmos parâmetros, mas em células de uma linha celular imortalizada derivada de epitélio brônquico humano normal (linha celular BEAS-2B) [72, 73]. Apesar dos regimes de exposição utilizados nos estudos terem sido diferentes os resultados obtidos foram, na sua globalidade, semelhantes. Em ambos os estudos, observou-se decréscimo no consumo de O₂ e aumento na produção de lactato. No estudo em que se avaliou o consumo de glucose observou-se um aumento deste [72].

O impacto do Cr(VI) no consumo de O₂ foi avaliado em vários estudos, para além dos realizados no nosso laboratório, tendo-se verificado, em todos eles, um efeito inibitório [74-83]. Estes estudos variaram entre si não só relativamente ao tempo de exposição e concentração/dose, mas também ao nível dos sistemas utilizados: mitocôndrias de rim, coração ou fígado de rato, fibroblastos de gengiva humana, hepatócitos e timócitos de rato, células de uma linha celular derivada de hepatócitos embrionários humanos (linha celular L-02) e de uma linha celular derivada de fibroblastos de pulmão de hamsters chineses (linha celular V79) e fibroblastos do prepúcio de crianças.

Anteriormente foi referida a tendência das células cancerígenas consumirem mais glutamina relativamente às células normais das quais derivaram (secção 1.1.4.). No único estudo em que se avaliou o impacto do Cr(VI) no consumo de glutamina, tendo sido realizado no nosso laboratório, verificou-se aumento deste parâmetro [72].

É importante determinar o modo como o estado energético da célula vai ser afectado por alterações no metabolismo energético causadas pela exposição a Cr(VI), ou seja, se a célula vai ter capacidade de gerar níveis suficientes de ATP para a sua manutenção, funcionamento e proliferação. Relativamente ao impacto do agente cancerígeno Cr(VI) na *pool* de adenilatos das células todos os estudos realizados até à data [72, 74, 76, 79, 80, 83-87], menos um [88], sugeriram que a exposição a Cr(VI) causa um decréscimo dos níveis de ATP e aumento dos níveis de ADP e AMP, tendo-se verificado, conseqüentemente, uma diminuição da EC. As condições em que estes estudos foram efectuados diferiram entre si ao nível da concentração/dose e duração da exposição ao agente cancerígeno, assim como nos sistemas utilizados (fibroblastos de

gingiva humana, células da linha celular derivada de fibroblastos de rim de hamsters (linha celular BHK), células V79, células L-02, células BEAS-2B, hepatócitos, tímócitos e mitocôndrias de rim de rato).

Resumidamente, verificou-se que as células expostas a Cr(VI) apresentam alterações no metabolismo energético semelhantes às que são geralmente observadas em células que sofrem processos de transformação maligna.

1.3. A relevância do modelo experimental em investigação científica

O progresso da ciência constrói-se com base no conhecido método científico. Muitos apontam Aristóteles como o primeiro seguidor deste paradigma, o que comprova a sua persistência ao longo do tempo. Segundo este método, toda a investigação científica tem origem em observações que levam à formulação de questões. A resposta a estas, ou o surgimento de novas questões, ocorre após um processo de concepção e realização de experiências, seguido da análise e interpretação dos resultados obtidos.

O planeamento das experiências a realizar é crucial para o sucesso de todo o processo, pois só realizando experiências relevantes para o problema em causa se poderão tirar conclusões sólidas dos resultados obtidos. Este planeamento adquire particular relevância quando os estudos estão, de algum modo, relacionados com o ser humano. Nestes estudos, a utilização de modelos humanos seria, naturalmente, a situação ideal. No entanto, numa fase inicial, a utilização destes modelos é geralmente inviável, pelos riscos que poderão advir para a saúde dos indivíduos envolvidos. Contudo, em determinadas situações, tais como o desenvolvimento de compostos para utilização humana, esta abordagem torna-se inevitável a partir de uma determinada fase do estudo [89].

Os estudos epidemiológicos e as análises *post-mortem* são exemplos de estudos realizáveis no Homem, cujos resultados se podem complementar. Todavia, estes estudos têm algumas desvantagens. O grande problema associado à utilização de amostras de tecido *post-mortem* prende-se com as alterações que estas sofrem devido às mudanças entre as condições *pre-* e *post-mortem*. Para serem consideradas como modelos, a diferença entre ambas as condições não pode ser significativa ao ponto de provocar alterações nas amostras recolhidas e comprometer os resultados obtidos [90].

A epidemiologia é utilizada para identificação de perigos e avaliação de riscos. Os estudos epidemiológicos procuram determinar causas a partir da observação e avaliação do aparecimento de sintomas no Homem, em substituição de experiências controladas em laboratório. Em alguns casos particulares, este tipo de estudo é de difícil aplicação, como é o caso do cancro. O cancro pode ter períodos de latência muito longos, durante os quais os indivíduos estão frequentemente expostos a diversos agentes cancerígenos. Deste modo, torna-se difícil estabelecer uma relação causa-efeito [91]. Estes problemas exigiram que fossem encontradas alternativas, tendo-se, então, optado pela utilização de modelos animais. No entanto, a utilização de animais em experiências laboratoriais levanta sempre inúmeras questões bioéticas, o que levou à diminuição da utilização destes modelos em investigação científica [92]. Além disso, mesmo os animais pertencentes a uma mesma espécie apresentam diferenças entre si, tal como a nível comportamental, levantando algumas questões relativamente à validade dos resultados. Não devem ainda ser desprezadas as inúmeras diferenças entre os restantes animais e o Homem, o que condiciona a extrapolação de resultados de um sistema para outro. Acrescem-se ainda, os elevados custos inerentes à manutenção dos animais, aliados à necessidade de espaço para os manter [92].

A combinação de todas as dificuldades acima referidas instigou os cientistas a tentar utilizar tecidos *in vitro*, ou seja, fora do organismo. Desde cedo, foram feitas várias tentativas de crescer e manter explantes de tecidos em cultura. Porém, o crescimento e divisão celular estavam limitados às células que se desagregavam do explante, dado que o tecido diferenciado não podia sofrer divisão celular e, portanto, até 1907, nenhum cientista foi bem-sucedido. Nesse ano, estabeleceu-se, com sucesso, uma cultura de neuroblastos de sapo [93]. Segundo o cientista responsável, o método por ele desenvolvido iria permitir o estudo e observação continuada das células ao longo do tempo. Desta forma, a necessidade de utilizar tecidos de animais em diferentes estádios de desenvolvimento era eliminada. Além disso, seria possível verificar o comportamento das células fora do ambiente no qual se encontravam no organismo vivo. Contudo, o tempo durante o qual as células, que migravam do tecido, cresciam e se mantinham viáveis era limitado.

A utilização de tecidos de sapo, um animal de sangue frio, dispensava incubação. No entanto, rapidamente se tentou utilizar tecidos de animais de sangue quente. As células que constituem estes últimos são semelhantes às células humanas ao nível do desenvolvimento, o que seria mais vantajoso do ponto de vista clínico [94]. Em

1912, Alexis Carrel utilizou tecido conjuntivo de pinto na tentativa de determinar as condições que iriam permitir a sobrevivência ilimitada das células deste. No artigo publicado, o autor afirmava que uma fonte regular de nutrientes aliada a condições de assepsia durante o manuseamento das culturas possibilitaria o crescimento ilimitado e manutenção das células do tecido [95]. Ainda no mesmo estudo, Carrel introduziu o termo passagem das culturas, processo em que as células dos tecidos são transferidas para frascos suplementados com meio de cultura novo, com o objectivo de promover o aumento do período de vida destas.

A observação da formação de monocamadas constituídas pelas células desagregadas dos tecidos em cultura levou à introdução da expressão cultura de células [94]. À cultura de células obtidas directamente de tecidos de organismos vivos dá-se a designação de cultura primária. As células são obtidas por desagregação mecânica ou enzimática de explantes de tecidos, ou por migração a partir de um tecido isolado [94]. A cultura obtida é depois transferida para um frasco provido de um meio específico para o seu crescimento e proliferação. Deste modo, iriam então formar-se as monocamadas referidas ou, no caso de não necessitarem de ligação a um substrato para sobreviver, iriam manter-se em suspensão. Posteriormente, quando é feita passagem celular, a cultura primária passa a designar-se linha celular.

Em 1951, Henrietta Lacks apresentou-se num hospital, onde acabou por falecer devido a um adenocarcinoma do colo do útero em estado avançado. Na mesma altura, George Otto Gey, médico do Hospital Johns Hopkins, tentava estabelecer uma cultura de células cancerígenas com origem no colo do útero, tendo na sua posse cerca de trinta amostras deste tecido cancerígeno. No entanto, nenhuma destas amostras se revelou promissora. Porém, utilizando o tecido obtido de uma biópsia realizada a Henrietta, verificou algo extraordinário. Em cultura, as células apresentavam um rápido crescimento, muito distinto do que se verificou com as restantes amostras. Gey deu a estas células o nome de HeLa, em homenagem a Henrietta Lacks, tornando-se na primeira linha celular estabelecida [96]. As características cancerígenas destas células permitiram, de facto, que permanecessem continuamente em cultura. Actualmente, esta é ainda uma das linhas celulares mais conhecida.

No início dos anos sessenta, Hayflick e Moorhead publicaram um estudo no qual contrariavam totalmente as afirmações de Carrel acerca da possível imortalização das células em cultura se esta fosse devidamente acondicionada. Nesse estudo utilizaram fibroblastos humanos e verificaram que em todas as culturas existia um número

limitado de divisões [97]. Esta observação deu origem ao termo limite de Hayflick [98], o qual foi explicado em 1971 por Olovnikov. A teoria de Olovnikov baseava-se no facto de, na ausência de um mecanismo responsável por manter os terminais cromossómicos, estes cromossomas iriam ser perdidos durante a replicação de DNA linear, o que é conhecido actualmente como o problema da replicação dos terminais cromossómicos [98]. Olovnikov acreditava que esta situação estaria de certa forma relacionada com o limite de Hayflick. No entanto, a sua hipótese foi posta de lado durante cerca de vinte anos [99]. Presentemente, sabe-se que o limite de Hayflick se deve ao encurtamento dos telómeros que protegem as extremidades dos cromossomas, o que está relacionado com o processo de envelhecimento [100].

A percepção de que a morte celular não é necessariamente o resultado de uma má prática de cultura permitiu fazer uma importante distinção ao nível das linhas celulares. Foram definidos dois tipos distintos de linhas celulares: linha celular contínua, cujas culturas têm um período de vida ilimitado; e linha celular finita, cujas culturas têm um tempo de vida limitado. A particularidade das linhas celulares contínuas serem imortais permite a realização de experiências por períodos de tempo prolongados, o que de outra forma seria impossível. Inicialmente, as células de linhas celulares imortalizadas eram obtidas através de biópsias de tumores, tal como a já referida linha celular HeLa. Posteriormente, foram desenvolvidas estratégias de imortalização celular não envolvendo transformação maligna. Nomeadamente, a infecção das células com certos genes virais [94] ou o aumento da expressão do gene da telomerase, responsável pela manutenção dos telómeros [101]. Contudo, ambos os processos de imortalização levam a que algumas das características originais *in vivo* sejam alteradas, como por exemplo, o número de cromossomas [94, 102].

Um dos parâmetros de maior importância na cultura de células é o meio no qual as células são mantidas, uma vez que é este que vai providenciar todos os nutrientes necessários para o seu crescimento e proliferação. Inicialmente, recorria-se a meios de origem natural, como extractos embrionários, soro, plasma ou ainda misturas destes [94]. A criação de meios artificiais foi iniciada por Warren Lewis, em 1911 [103]. Lewis criou diversas soluções suplementadas e avaliou o crescimento de diversos tecidos de embrião de pinto, concluindo que o sal inorgânico NaCl era um elemento essencial. A formulação de um meio de cultura específico para células de mamíferos, que permitisse a divisão celular mesmo após várias passagens celulares, foi conseguida somente nos anos cinquenta por Eagle [104]. Em alguns tipos celulares, o soro tem a

capacidade de promover diferenciação terminal [94]. As células que passam por este processo perdem, evidentemente, a capacidade de dar origem a outros tipos celulares, uma vez que progridem para uma linhagem celular específica. Deste modo, nos anos que se seguiram, foram feitas várias tentativas de formular meios de cultura desprovidos de soro. Ham foi bastante activo nesta área, tendo criado um meio totalmente sintético para cultura de células de hamster chinês [105]. A formulação de meios desprovidos de soro específicos para células humanas iniciou-se apenas no final do século passado.

Os progressos feitos no campo da cultura celular até aos dias de hoje são enormes. A utilização generalizada desta técnica tem por base a grande vantagem de existir consistência nos resultados. Presentemente, pode-se afirmar que esta técnica é uma das mais importantes ferramentas utilizadas rotineiramente para o estudo em áreas distintas como toxicologia, genómica, farmacologia, imunologia e carcinogénese [94].

1.4. A linha celular BEAS-2B como modelo do epitélio brônquico humano

Uma vez que o Cr(VI) se acumula nas bifurcações da árvore brônquica, onde surge a maioria dos casos de cancro do pulmão associados a uma exposição a este ião, é importante estudar o seu efeito em células do epitélio brônquico humano. Contudo, o acesso a este tipo de tecido é bastante limitado, o que dificulta a realização de estudos *in vivo*. A utilização de tecido pulmonar de origem animal seria uma opção, porém as limitações já referidas na secção 1.3. tornam esta opção inviável. É, assim, imprescindível a utilização de linhas celulares contínuas representativas deste tipo de tecido.

As células de tecidos normais do epitélio brônquico humano (NHBE) derivam dos tecidos que constituem o principal local de origem de cancro do pulmão [106]. Contudo os efeitos promovidos pelo soro, já referidos na secção 1.3., são também evidentes em células NHBE em cultura, especificamente a ocorrência de diferenciação terminal [107]. Por outro lado, na presença de meios desprovidos de soro, estas entram num estado de senescência celular em cerca de quatro semanas [106]. Este processo consiste na perda da capacidade de divisão pelas células, que adoptam um estado de paragem permanente do ciclo celular [94]. O estudo das várias fases de desenvolvimento neoplásico requer um período de tempo alargado, pelo que houve a

necessidade de imortalizar células NHBE em cultura. A linha celular resultante desta imortalização foi designada por linha celular BEAS-2B.

O facto de existirem poucas linhas celulares estabelecidas para estudos relacionados com o cancro do pulmão incitou John Pierce Wise a estabelecer uma nova linha celular. Em 2004, um grupo liderado por John Pierce Wise estabeleceu uma linha celular contínua derivada de fibroblastos bronquiais humanos primários (PHBF) através da indução da expressão do gene que codifica a telomerase humana, hTERT, nestas células. A linha celular estabelecida foi designada WHTBF-6 [108]. Segundo Wise, o facto da linha celular BEAS-2B ter as proteínas p53 e do retinoblastoma (pRB) inactivadas (secção 1.4.1.1.) iria dificultar o entendimento dos mecanismos pelos quais o processo cancerígeno é induzido. Contudo, também a linha celular WHTBF-6, devido ao método pelo qual a sua imortalização foi conseguida, dificulta o entendimento destes mecanismos. De facto, as células normais não apresentam uma expressão contínua de telomerase durante todo o seu período de vida, ao contrário do que acontece com esta linha celular. Deste modo, o que se pode concluir é que, apesar de ambas as linhas constituírem modelos importantes no estudo de cancro do pulmão, ambas apresentam desvantagens inerentes ao processo de imortalização utilizado.

1.4.1. A linha celular BEAS-2B

A utilização da linha celular BEAS-2B em estudos relacionados com o cancro do pulmão é importante. Porém, esta pode também ser utilizada em muitos outros tipos de estudos. Por exemplo, observou-se em 1998 que a bactéria *Streptococcus pneumoniae* tem a capacidade de se ligar a células BEAS-2B. A pneumonia é uma patologia causada por este organismo e, com a informação obtida neste estudo, puderam ser adoptadas novas estratégias que bloqueassem a infecção provocada por este [109]. Em 2002, foi conduzida uma outra experiência com o objectivo de verificar o efeito de partículas libertadas de incineradores municipais nestas células. Os resultados demonstraram que, para uma concentração de 100 µg/mL, estas partículas eram altamente tóxicas para células da linha celular BEAS-2B [110].

1.4.1.1. O estabelecimento da linha celular BEAS-2B

Em 1988, um grupo do National Cancer Institute, em Maryland, liderado por Curtis Harris, tentou imortalizar células NHBE colocando em prática três métodos distintos. Este grupo induziu a expressão de genes virais em células NHBE através de duas abordagens diferentes, infecção das células com vírus e transfecção de genes virais. Para o processo de infecção viral foram seleccionadas as linhas celulares Vero e COS-1 [106]. A linha celular COS-1 foi estabelecida a partir da imortalização, com o vírus SV40, de fibroblastos de rins de macaco da linha celular CV-1. Nas células da linha celular Vero, também de rins de macacos, foi induzido o crescimento de um vírus híbrido do adenovírus 12 e do vírus símio 40 (Ad12-SV40) [106]. Para a transfecção de genes virais utilizaram-se plasmídeos contendo os genes presentes na SV40 ER [106]. A transfecção foi feita através de coprecipitação com fosfato de estrôncio em substituição da coprecipitação com fosfato de cálcio, dado que este último provoca a lise das células NHBE [111]. Das três abordagens testadas, apenas uma, a infecção com um vírus híbrido Ad12-SV40, permitiu o estabelecimento de uma linha celular imortalizada, designada linha celular BEAS-2B [106].

Nos anos 60, Sweet e Hilleman descobriram o vírus símio 40 (SV40) em rins de macaco Rhesus [112]. Mais tarde, a capacidade do vírus de transformar culturas primárias de células humanas de rim viria a ser demonstrada por Shein e Enders [113]. O genoma do vírus SV40 codifica apenas sete proteínas, três das quais são estruturais (VP1, 2 e 3), duas estão envolvidas no ciclo de vida viral (antigénio T grande (LT) e antigénio T pequeno (ST)), e as restantes não têm função conhecida (17 kT e agnoproteína).

Ambos os antigénios, LT e ST, encontram-se numa região do genoma do vírus SV40 definida como região inicial (SV40 ER). O antigénio ST é responsável por estimular a proliferação celular e facilitar a transformação das células pelo antigénio LT. Por sua vez, o antigénio LT, após infecção viral, vai interagir com as proteínas celulares p53 (secção 1.1.4.) e pRB. A proteína pRB está envolvida na regulação da progressão das células no ciclo celular, controlando a transição da fase G1 para a fase S, funcionando como um ponto de controlo [114, 115]. Da interacção do antigénio LT com as proteínas p53 e pRB, resulta a inactivação de ambas, havendo perda da capacidade de controlar a proliferação celular. Deste modo, o processo de proliferação celular passa a

ocorrer de modo descontrolado [112]. O antigénio LT promove ainda a replicação do DNA viral ao ligar-se à origem de replicação do mesmo [112].

Para o estabelecimento da linha celular BEAS-2B, transferiram-se explantes de epitélio brônquico humano para caixas de cultura suplementadas com meio. O meio de cultura utilizado foi o meio LHC-9, um meio desprovido de soro, especificamente formulado para o crescimento de células do epitélio brônquico. As células NHBE que se desintegraram dos explantes foram depois transferidas para novas caixas de cultura onde se promoveu infecção com um vírus híbrido Ad12-SV40. Uma vez atingida a confluência, realizou-se novamente passagem, desta vez para frascos de cultura. A mudança do meio de cultura era feita duas vezes por semana. Este procedimento foi repetido várias vezes até se verificar a formação de colónias transformadas e a senescência das células normais. De modo a acelerar o processo de senescência das células normais, expôs-se as células a soro fetal bovino (FBS) [106].

A partir das colónias transformadas, obtiveram-se três estirpes celulares (BEAS-2A, BEAS-2B e BEAS-2C), as quais foram transferidas para caixas de cultura para a realização de ensaios clonogénicos. Cada uma destas colónias alcançou aproximadamente 1 centímetro de diâmetro em cerca de 4 semanas. Por outro lado, no mesmo intervalo de tempo, as células NHBE utilizadas como controlo já se encontravam num estado senescente [106]. Curtis Harris procedeu ainda à determinação dos tempos de duplicação para as várias estirpes celulares. De um modo geral, verificou-se que, a partir da trigésima duplicação, ocorria uma diminuição na proliferação celular. Apenas a estirpe BEAS-2B mostrou ter uma proliferação contínua durante o período em que se mantiveram as culturas [106].

1.4.1.2. Características da linha celular BEAS-2B

Embora a linha celular BEAS-2B tenha sido estabelecida a partir de células do epitélio brônquico humano normal, deixa de poder classificar-se como normal, uma vez que sofreu transformação por infecção com genes virais. As características desta linha celular, que constitui um modelo do epitélio brônquico humano [106], vão ser apresentadas ao longo desta secção.

As células da linha celular BEAS-2B são aderentes, crescendo em monocamadas. Para isso, necessitam de aderir a um substrato (secção 2.5.). A expressão

dos antigénios ST e LT, cuja importância no processo de imortalização celular já foi referida na secção 1.4.1.1., é observada em células BEAS-2B através de imunofluorescência indirecta. Relativamente à morfologia, estas células são semelhantes às células epiteliais normais e não apresentam persistência viral, i.e., não produzem os vírus com as quais foram imortalizadas [106].

Tal como acontece com as células NHBE, também as células da linha celular BEAS-2B conservam a capacidade de sofrer diferenciação terminal em resposta à presença de soro. O mesmo ocorre quando é atingida uma confluência elevada. Adicionalmente, quando é atingida uma confluência elevada, começa a ocorrer morte celular devido à falta de nutrientes.

A injeção de células desta linha celular em ratos atímicos não promoveu a formação de tumores, pelo menos até à passagem 25 [107].

O processo de imortalização ao qual estas células foram sujeitas pode causar instabilidade genómica, havendo a necessidade de serem realizadas análises genéticas para determinar eventuais alterações. Estas análises permitem decidir pela utilização ou não das células. Aquando do estabelecimento da linha celular BEAS-2B, Curtis Harris procedeu à sua análise citogenética, concluindo que, até pelo menos à passagem 29, as células da linha celular BEAS-2B apresentavam um cariótipo aproximadamente diplóide [106]. Recentemente, foi realizado no nosso laboratório um estudo em que se analisou a expressão de alguns genes envolvidos no controlo do ciclo celular e metabolismo bioenergético [116]. Concluiu-se que esta é uma linha celular estável capaz de manter a integridade do ciclo celular e metabolismo bioenergético durante o período em que foi realizado o estudo. Ainda neste estudo, foi possível observar alterações cromossómicas de base inerentes à linha celular, alterações essas que variaram ao longo das passagens [116]. Outro estudo permitiu concluir que a partir da passagem 21 as células começam a adquirir alterações genéticas responsáveis pelo fenótipo cancerígeno [117].

1.5. Objectivos

Na primeira parte deste trabalho, o principal objectivo foi estabelecer as condições de cultura da linha celular BEAS-2B e determinar o efeito das condições e idade de cultura na morfologia, proliferação e metabolismo energético destas células.

Na segunda parte deste trabalho, o principal objectivo foi estudar o impacto do Cr(VI) no metabolismo energético das células referidas acima, em condições basais e na presença de um modulador do metabolismo.

Foram avaliados os seguintes parâmetros:

- ✓ Concentração de glucose e glutamina no meio de cultura entre duas passagens;
- ✓ Influência da matriz extracelular na morfologia e tempo de duplicação de células BEAS-2B;
- ✓ Impacto da idade de cultura na morfologia, no tempo de duplicação e no metabolismo energético de células BEAS-2B;
- ✓ Citotoxicidade de diferentes concentrações de Cr(VI);
- ✓ Impacto de uma exposição de 48 h a concentrações baixas de Cr(VI) no consumo de glucose, na produção de lactato, nos níveis intracelulares de nucleótidos de adenina e na carga energética;
- ✓ Impacto de uma exposição de 48 h a concentrações baixas de Cr(VI) na produção de lactato e nos níveis intracelulares de ATP, em condições basais e na presença de 2-DG;
- ✓ Impacto de uma exposição de longa duração a concentrações baixas de Cr(VI) no metabolismo energético, especificamente no consumo de glucose, nos níveis intracelulares de nucleótidos de adenina e na carga energética.

2. Materiais e Métodos

2.1. Materiais gerais

Todos os materiais utilizados no trabalho experimental descrito nesta dissertação encontram-se listados na Tabela 2.1., com indicação do respectivo fabricante, referência e distribuidor.

Tabela 2.1. Materiais utilizados no trabalho experimental descrito nesta dissertação.

Material	Fabricante	Referência	Distribuidor
Reagentes Gerais			
Ácido perclórico a 70% (PCA)	Sigma-Aldrich® Química	244252	Sigma-Aldrich® Química, S.L., Sintra, Portugal
Albumina sérica bovina (BSA, ≥ 96%)		A9647	
Cloreto de potássio (KCl, ≥ 99%)		P5405	
Cloreto de sódio (NaCl, 99-101.5%)		S9625	
2-Deoxi-D-glucose (2-DG, ≥ 99,9%)		D3179	
Dicromato de potássio (K ₂ Cr ₂ O ₇ , mínimo 99,5%)		P2588	
Dimetil sulfoxido (DMSO, ≥ 99,9%)	Fisher Scientific	10213810	Fisher Scientific, Porto Salvo, Portugal
Fosfato de potássio monobásico (KH ₂ PO ₄ , ≥ 99%)	Sigma-Aldrich® Química	P5379	Sigma-Aldrich® Química, S.L., Sintra, Portugal
Fosfato de sódio dibásico (Na ₂ HPO ₄ , ≥ 99%)		S0876	
Gelatina de pele de bovino		G9391	
Hidróxido de potássio (KOH, ≥ 85%)		221473	
Hidróxido de sódio (NaOH, ≥ 98,0%)		71689	
Meio Gibco® LHC-9	Life Technologies	12680-013	Alfagene®, Carcavelos, Portugal
Reagente de Bradford	Bio-Rad Laboratories Lda.	500-0006	Bio-Rad Laboratories Lda., Amadora, Portugal
Solução de azul de tripano 0,4% (m/v)	Sigma-Aldrich® Química	T8154	Sigma-Aldrich® Química, S.L., Sintra, Portugal
Solução de tripsina de pâncreas de suíno a 2,5% (m/v)		T4549	
Soro fetal bovino (FBS)	Life Technologies	10106-169	Alfagene®, Carcavelos, Portugal
Triton ×-100	Sigma-Aldrich® Química	T8787	Sigma-Aldrich® Química, S.L., Sintra, Portugal

(Continuação)

Kits de quantificação enzimática de metabolitos			
<i>Kit</i> glucose RTU	bioMérieux S.A.	61270	bioMérieux S.A., Linda-a-Velha, Portugal
<i>Kit</i> L-lactate	Randox Laboratories Lda.	LC2389	Irlandox Laboratorios Quimica Analitica Lda., Porto, Portugal
<i>Kit</i> L-glutamate/ammonia (Rapid)	Megazyme International Ireland Lda.	K-GLNAM	Megazyme International Ireland Lda., Bray, Irlanda
Material de cultura de células			
Material de plástico descartável utilizado rotineiramente na cultura de células	Orange Scientific	–	Frilabo, Maia, Portugal

2.2. Material biológico

Todas as experiências foram realizadas com a linha celular BEAS-2B (Figura 2.1.). Esta linha celular foi adquirida à *European Collection of Cell Cultures* (ECACC, Reino Unido, N° catálogo: 95102433) sob a forma de suspensão celular criopreservada.

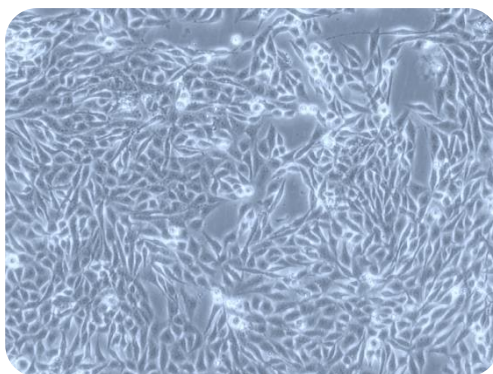


Figura 2.1. Micrografia de uma monocamada de células da linha celular BEAS-2B, na passagem 11. Esta linha celular imortal foi estabelecida a partir de tecido do epitélio brônquico humano por infecção com um vírus híbrido Ad12-SV40. Imagem obtida com uma objectiva de ampliação 10×.

2.3. Composição das soluções utilizadas na cultura de células

A cultura de células da linha celular BEAS-2B requer uma variedade de soluções, as quais devem ser devidamente esterilizadas, por autoclavagem a 121 °C e à pressão de 1,39 atm ou por filtração utilizando filtros com porosidade de 0,2 µm. Neste trabalho, foram esterilizadas por filtração as soluções aquosas de albumina sérica bovina (BSA) a 2% (m/v), as soluções de 2-deoxi-D-glucose (2-DG) a 20 mM e as soluções de dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) a 100 µM. Todas as restantes soluções foram esterilizadas por autoclavagem. Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura.

- **Solução salina tamponizada com fosfato (PBS)**

- 1,37 M de NaCl
- 27 mM de KCl
- 100 mM de Na_2HPO_4
- 20 mM de KH_2PO_4

O pH desta solução foi ajustado a 7,4 utilizando soluções de NaOH e HCl.

As soluções de trabalho foram preparadas a partir de soluções stock dez vezes concentradas (PBS 10×), por diluição com água.

- **Solução de tripsina de pâncreas de suíno a 0,25% (m/v)**

- 90 mL de PBS
- 10 mL de solução de tripsina de pâncreas de suíno a 2,5% (m/v)

- **Solução aquosa de gelatina de pele de bovino a 2% (m/v)**

- 2 g de gelatina de pele de bovino
- 100 mL de água

Dissolveu-se a gelatina lentamente e autoclavou-se a solução resultante. Após autoclavagem, deixou-se arrefecer a solução lentamente.

- **Solução aquosa de BSA a 2% (m/v)**

- 1 g de BSA
- 50 mL de água

- **Solução de revestimento**

- 25 mL de solução aquosa de gelatina de pele de bovino a 2% (m/v)
- 22,5 mL de PBS
- 2,5 mL de solução aquosa de BSA a 2% (m/v)

A solução de revestimento assim obtida continha gelatina a 1% (m/v) e BSA a 0,1% (m/v), em PBS 0,45×

- **Solução de 2-DG a 20 mM**

- 16,4 mg de 2-DG
- 5 mL de meio LHC-9

- **Solução de $K_2Cr_2O_7$ a 100 μ M**

- 1,5 mg de $K_2Cr_2O_7$
- 50 mL de água

2.4. Equipamento

Todo o equipamento utilizado no trabalho experimental descrito nesta dissertação encontra-se listado na Tabela 2.2., com indicação do respectivo fabricante, modelo e distribuidor.

Tabela 2.2. Equipamentos utilizados no trabalho experimental descrito nesta dissertação.

Equipamento	Fabricante	Modelo	Distribuidor
Autoclave de bancada	Prestige Medical	Omega Media	Ezequiel Panão Jorge, Electromédica, Coimbra, Portugal
Balança analítica	Acculab	ALC-810.2	Sartorius, S.A., Lisboa, Portugal
Balança de precisão		ALC-210.4	
Câmara de fluxo laminar vertical	Kojair	BW-100	Frilabo, Lda., Porto, Portugal
Centrífuga de bancada	MPW Medical Instruments®	MPW-350R	MPW Medical Instruments®, Varsóvia, Polónia
Coluna de HPLC	Merck Millipore	5 µm Lichrospher 100 RP-18 column	Merck Millipore, Oeiras, Portugal
Espectrofotómetro de visível	Thermo Scientific	Genesys 20	VWR, International, Lisboa, Portugal
Incubadora de CO ₂	Sanyo	COM-19 AIC(UV)	Sanyo, San Diego, EUA
Medidor de pH	HANNA Instruments	HI110	Normax-Fábrica de vidros científicos, Lda., Marinha Grande, Portugal
Microcentrífuga	Eppendorf	Minispin	VWR, International, Lisboa, Portugal
Microscópio óptico	Olympus	CKX 41	Olympus, Center Valley, EUA
Sistema de HPLC	Beckman Coulter, Inc.	Beckman System Gold® HPLC system	Beckman Coulter, Inc., Carnaxide, Portugal
Sistema de purificação de água	Millipore S.A.	Simplicity	Interface, Equipamento e Técnica Lda., Amadora, Portugal
Termobloco	Biogen Científica	AccuBlock Digital Dry Bath	Biogen Científica, Madrid, Espanha

2.5. Cultura de células BEAS-2B

As culturas de células da linha celular BEAS-2B foram crescidas em monocamadas. As culturas foram sempre manuseadas sob condições de assepsia, numa câmara de fluxo laminar. Estas foram mantidas numa incubadora em ambiente estritamente controlado a 37 °C e numa atmosfera contendo 5% (v/v) CO₂/95% (v/v) ar.

Excepto indicação em contrário, as culturas de células BEAS-2B foram estabelecidas em frascos ou caixas de cultura de seis poços previamente revestidos com uma mistura contendo gelatina a 1% (m/v) e BSA a 0,1% (m/v) em PBS 0,45×. Para tal, o processo de passagem celular por nós realizado foi o seguinte (considerando culturas a crescer em frascos de cultura de 75 cm²) (Figura 2.2.): removeu-se o meio de cultura e lavou-se a monocamada de células, de seguida tripsinizou-se para individualizar as células e soltá-las do substrato. A tripsina tem a capacidade de digerir proteínas intercelulares, assim como as proteínas que estabelecem a ligação das células ao substrato (Figura 2.3.) [102]. Este último passo foi sempre seguido ao microscópio óptico de modo a detectar atempadamente o momento em que ocorria este desprendimento e assegurar que não havia disrupção da integridade estrutural da membrana celular. Seguidamente, adicionou-se PBS e centrifugou-se a suspensão de células a 590 g durante 7 minutos. Ressuspendeu-se o sedimento num volume apropriado de meio de cultura novo, recolheu-se um pequeno volume da suspensão e procedeu-se à contagem das células (secção 2.6.). O meio de cultura utilizado foi o LHC-9, um meio desprovido de soro, dado que na presença de soro as células BEAS-2B sofrem diferenciação terminal [106]. O mesmo processo ocorre quando atingida confluência elevada, motivo pelo qual a passagem celular foi sempre realizada antes que esta fosse atingida [118]. Por fim, calculou-se o volume de suspensão necessário para preparar uma nova cultura com a densidade celular desejada. Para esta linha celular, a ECACC recomenda uma densidade celular no novo frasco entre 3 e 10 × 10³ células/cm² [118]. À excepção dos casos em que é referido o contrário, as culturas foram preparadas com uma densidade celular de 2000 células/cm² em recipientes de cultura variados.

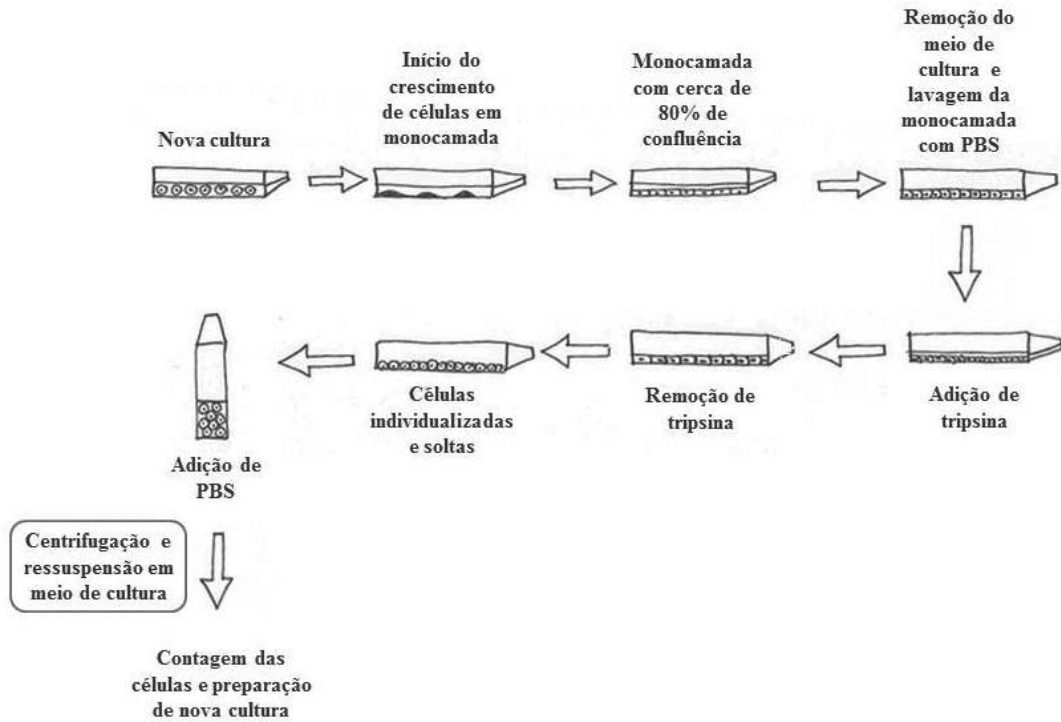


Figura 2.2. Representação das etapas de manutenção de culturas de células BEAS-2B. Antes de ser atingida uma confluência excessiva, fez-se a passagem celular. O meio de cultura foi removido e a monocamada de células foi lavada com PBS. Seguidamente tripsinizou-se, ressuspendeu-se a cultura em PBS e centrifugou-se a suspensão de células obtida. Ressuspendeu-se o sedimento resultante em meio de cultura e, após contagem celular (secção 2.5.), preparou-se uma nova cultura.



Figura 2.3. Representação do modo de actuação da tripsina em células a crescer em monocamada. A tripsina promove a individualização das células e o seu desprendimento da superfície de crescimento, permitindo obter uma suspensão de células individualizadas.

2.5.1. Congelamento de células

A realização de sucessivas passagens de culturas de células animais aumenta a probabilidade de ocorrer deriva genética, em que há eliminação de genes ao acaso. De

forma a minimizar este fenómeno, devem-se manter stocks de baixa passagem, o que só é possível através da criopreservação [119]. Esta técnica é uma estratégia de conservação, a uma temperatura de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, que permite armazenar células de linhas celulares contínuas e finitas viáveis durante longos períodos de tempo. Posteriormente, quando necessário, as células podem ser descongeladas e utilizadas. Além da vantagem referida, a manutenção de células criopreservadas assegura que, se ocorrer algum acidente que resulte na morte das células em cultura, tal como a sua contaminação, a linha celular não seja perdida [120].

O processo de congelamento das células seria letal para estas na ausência de um agente crioprotector, tal como o dimetil sulfoxido (DMSO). Esta pequena molécula é capaz de interagir com lípidos membranares, o que permite a sua fácil difusão para o interior das células. A presença de DMSO permite que a redução de temperatura e consequente desidratação das células seja gradual, minimizando a formação de cristais de gelo intracelulares, alterações de pH e desnaturação de proteínas. No entanto, este agente é tóxico para as células e, por isso, deve ser adicionado numa proporção nunca superior a 10% (v/v) [102, 121].

Foram, normalmente, preparadas no nosso laboratório alíquotas de 1 mL contendo entre 1 e 4 milhões de células. Para proceder ao congelamento de três alíquotas de células, preparou-se um frasco de 175 cm^2 e, antes que fosse atingida confluência excessiva, removeu-se o meio de cultura e lavou-se a monocamada de células duas vezes com PBS. Seguidamente tripsinizou-se (secção 2.5.) e ressuspendeu-se a cultura em PBS. A suspensão celular obtida foi centrifugada a 590 g durante 7 minutos. O sedimento foi ressuspendido numa solução composta por meio de cultura LHC-9, FBS e DMSO numa proporção de 7:2:1. As alíquotas preparadas foram colocadas num recipiente de congelação e mantidos a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante, pelo menos, 5 h. Seguidamente, transferiu-se as alíquotas para um contentor de azoto líquido, onde permaneceram até ser necessária a sua utilização.

2.5.2. Iniciação de culturas

De modo a iniciar uma nova cultura de células, descongelou-se e transferiu-se uma alíquota de células para um frasco de 75 cm^2 , contendo meio de cultura (15 mL). Após 24 h, substituiu-se o meio de cultura, de modo a remover o DMSO e células

mortas. Alternativamente, poderia ter sido feita uma centrifugação, imediatamente após o descongelamento da alíquota de células, de modo a sedimentar as células, possibilitando a remoção do DMSO, que ficaria no sobrenadante. Porém, a realização deste procedimento imediatamente após o descongelamento poderia ser demasiado agressivo para as células, pelo que, no nosso laboratório, se optou pelo procedimento anteriormente descrito.

2.6. Contagem de células pelo método do azul de tripano

O processo de contagem celular foi feito com recurso a um microscópio óptico, a um hemocitómetro e ao corante azul de tripano (AT). Este método foi utilizado tanto na rotina de cultura de células como na preparação de culturas para a realização de experiências.

O AT é um corante comumente utilizado na avaliação da morte celular. A membrana plasmática das células vivas, que se encontra intacta, impede a penetração do corante e, por isso, as células permanecem incolores. Pelo contrário, o corante penetra rapidamente nas células cuja membrana se encontra danificada, ficando o seu citoplasma corado de azul, permitindo uma fácil identificação ao microscópio [121, 122].

As amostras para a contagem celular foram preparadas adicionando solução de AT a 0,4% (m/v) em PBS a um pequeno volume de suspensão celular, numa proporção adequada (e.g., 100 µL de suspensão celular e 20 µL de AT). Para determinar a densidade celular das suspensões preparadas, encheram-se as duas câmaras de contagem de um hemocitómetro com a suspensão, tendo-se contado o número de células de acordo com o esquema apresentado no Figura 2.4. Para cada suspensão, foram sempre realizadas, no mínimo, duas contagens, tendo sido feita uma terceira no caso de os resultados das duas contagens apresentarem uma diferença superior a 10%.

O volume de suspensão necessário para a preparação de uma nova cultura foi calculado a partir da concentração de células na suspensão celular preparada.

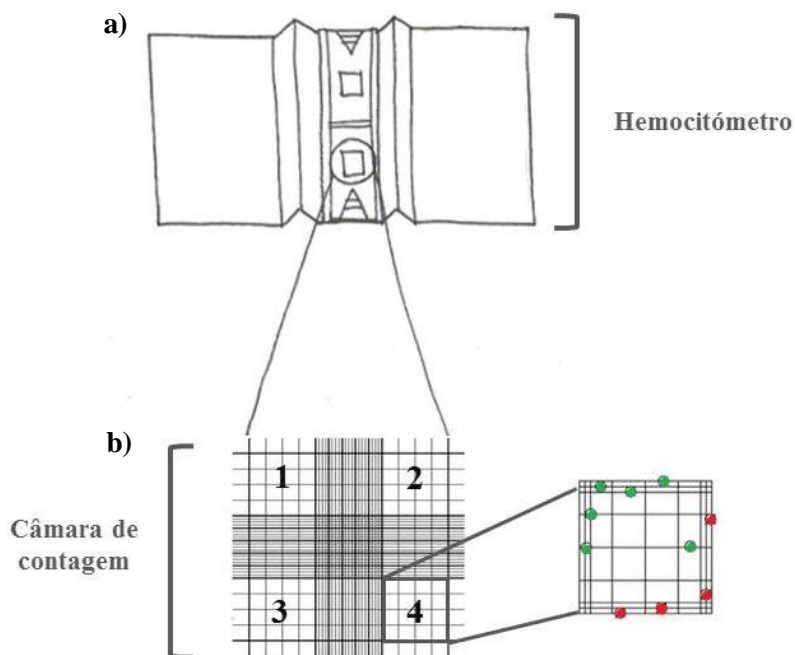


Figura 2.4. Procedimento adoptado para a determinação da densidade celular em suspensões de células BEAS-2B, utilizando um hemocitómetro (a). A suspensão celular é colocada em ambas as câmaras de contagem do hemocitómetro (b). São apenas contabilizadas as células presentes nos quadrados numerados. Os círculos a verde indicam as células contabilizadas, e a vermelho as que devem ser excluídas da contagem. Cada quadrado numerado possui um volume de 1×10^{-4} mL. A densidade celular na suspensão de células é calculada a partir da seguinte equação: células/mL = $x \times \frac{\text{factor de diluição}}{10^{-4} \text{ mL}}$, em que o x corresponde à média obtida em cada quadrado (1, 2, 3 e 4).

2.7. Determinação de tempos de duplicação

Para a determinação de tempos de duplicação da linha celular BEAS-2B, as culturas foram monitorizadas ao longo de três dias, durante os quais foram feitas contagens das células através do método do azul de tripano (secção 2.6.). Para isso, prepararam-se triplicados de cada cultura em avaliação em caixas de cultura de seis poços.

Para cada determinação, removeu-se o meio dos poços e lavou-se a monocamada de células com PBS. Todos os vestígios de PBS foram removidos com uma micropipeta. Colocaram-se 300 μ L de tripsina nos poços e, seguidamente, PBS num volume adequado à densidade celular observada ao microscópio óptico. As suspensões foram transferidas para tubos de microcentrífuga e mantidos em gelo até à contagem celular.

Os tempos de duplicação foram determinados através da divisão do logaritmo neperiano de 2 pelo declive da recta que relaciona o logaritmo neperiano do número total de células e o tempo decorrido desde a preparação das culturas.

Todas as determinações de tempos de duplicação foram realizadas em culturas em fase de crescimento exponencial.

2.8. Tratamento de células com Cr(VI)

O tratamento das células com Cr(VI) foi feito usando uma solução de dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) contendo 100 μ M de Cr(VI). Este tratamento foi sempre realizado 24 h após o estabelecimento das culturas, para permitir a adesão das células ao substrato.

O volume total de solução de $K_2Cr_2O_7$ mais veículo de adição (água ultrapura) foi sempre o mesmo. Às culturas controlo, estabelecidas e processadas em paralelo, adicionou-se um volume de veículo de adição equivalente ao volume total.

2.9. Tratamento de células com 2-DG

O tratamento das células com 2-DG foi feito com uma solução de 2-DG de 20 mM. No momento da adição, as células já tinham aderido ao substrato.

O volume total de solução de 2-DG mais veículo de adição (meio de cultura LHC-9) foi sempre o mesmo. Às culturas controlo, estabelecidas e processadas em paralelo, adicionou-se um volume de veículo de adição equivalente ao volume total.

2.10. Ensaios de citotoxicidade

Os efeitos citotóxicos do Cr(VI) e da 2-DG foram determinados em culturas de células BEAS-2B preparadas em caixas de cultura de seis poços. Em todas as experiências, foram preparados tetraplicados de culturas para cada condição analisada.

Os tratamentos foram feitos de acordo com os esquemas apresentados nas Figuras 2.5. e 2.6. No final de cada tratamento, o meio de cultura foi removido e a

monocamada de células foi lavada com PBS. Seguidamente, adicionaram-se 300 μL de tripsina e, quando as células já estavam redondas, um volume de PBS ajustado à densidade das culturas, normalmente compreendido entre 300 e 500 μL . As suspensões foram transferidas para tubos de microcentrífuga e mantidas em gelo até à contagem celular através do método do azul de tripano (secção 2.6.).

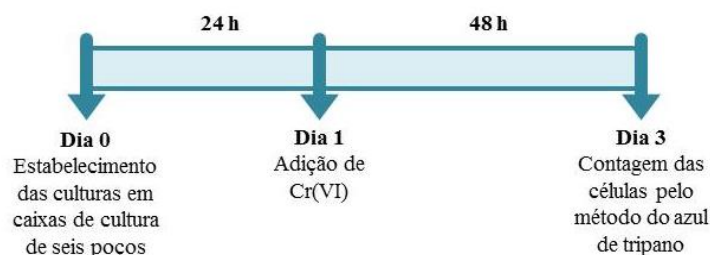


Figura 2.5. Regime de exposição para avaliação da citotoxicidade do Cr(VI) em culturas de células BEAS-2B.

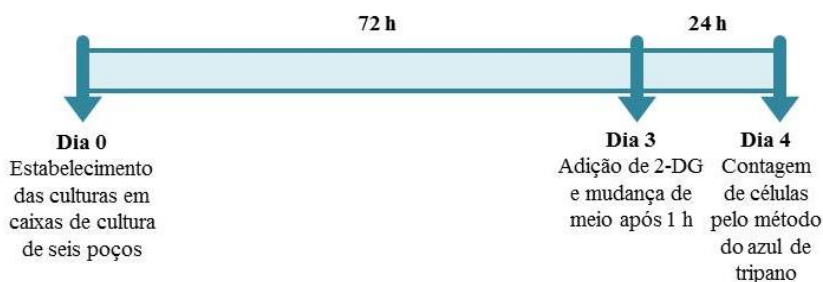


Figura 2.6. Regime de exposição para avaliação da citotoxicidade da 2-DG. As culturas foram incubadas com 2-DG durante 1 h. Após este período o meio de cultura foi renovado. Para que o efeito da incubação fosse visível na morte celular, a contagem foi feita apenas 24 horas após a exposição à 2-DG.

2.11. Avaliação de parâmetros bioenergéticos

Existe uma panóplia de métodos para a avaliação de parâmetros bioenergéticos, cada um com as suas vantagens e as suas limitações. Para uma mesma aplicação, podem existir métodos mais adequados, por exemplo, em termos de sensibilidade e tempo consumido, mas menos vantajosos no que diz respeito, por exemplo, aos custos e equipamentos necessários. Nas secções seguintes descrevem-se os métodos seleccionados para quantificação de glucose, de lactato, de glutamina, e de amónia no meio de cultura e dos níveis intracelulares de nucleótidos de adenina.

2.11.1. Quantificação de glucose, de lactato, de glutamina e de amónia no meio de cultura e dos níveis intracelulares de nucleótidos de adenina

Neste trabalho, as quantificações de glucose, de lactato, de glutamina e de amónia no meio de cultura foram realizadas à temperatura ambiente com *kits* comerciais baseados em reacções enzimáticas. Este tipo de ensaios é bastante específico e tem custos relativamente baixos. De um modo geral, o protocolo utilizado foi o recomendado pelo fabricante.

As amostras de meio recolhidas para análise foram colocadas durante 15 minutos a 80 °C, de modo a inactivar determinadas enzimas que mantêm alguma actividade fora do ambiente celular. Quando não foram imediatamente analisadas, foram armazenadas a -20 °C até à sua análise. Para a determinação das taxas de uptake e excreção, utilizou-se como valor de referência amostras de meio novo, que foram processadas de igual modo.

Os níveis intracelulares de nucleótidos de adenina foram quantificados através de cromatografia líquida de elevada performance (HPLC), mais concretamente através da variante de fase reversa (RP-HPLC).

Para a monitorização dos níveis de glucose entre passagens, foram preparados tetraplicados de culturas de células BEAS-2B com uma densidade celular de 2000 células/cm² em caixas de cultura de seis poços. Os níveis de glutamina entre passagens foram monitorizados numa única experiência, tendo-se para isso preparado uma cultura com uma densidade celular de 2000 células/cm² numa caixa de cultura de seis poços.

Para a determinação dos efeitos do Cr(VI) no metabolismo energético, foram preparados tetraplicados de culturas de células BEAS-2B com uma densidade celular de 7000 células/cm² em caixas de cultura de seis poços. As culturas foram expostas a diferentes concentrações de Cr(VI) durante 48 h. Após esta exposição, o meio de cultura foi substituído por novo meio, contendo igual concentração de Cr(VI). Após 14 h, foram recolhidas amostras de meio para análise (Figura 2.7. e 2.8.). Para as exposições de longa duração, as culturas em análise foram preparadas a partir de culturas expostas cronicamente a Cr(VI) (Figura 2.8.). Nestas culturas, adicionou-se Cr(VI) 24 h após a passagem das células e fez-se um segundo tratamento 72 h após o primeiro, com

renovação do meio de cultura, assegurando assim a presença de Cr(VI) durante o período entre passagens.

Para a determinação dos efeitos do Cr(VI) no metabolismo energético na presença de um inibidor da glicólise, as culturas foram expostas a diferentes concentrações de 2-DG durante 4 h (Figura 2.9.).

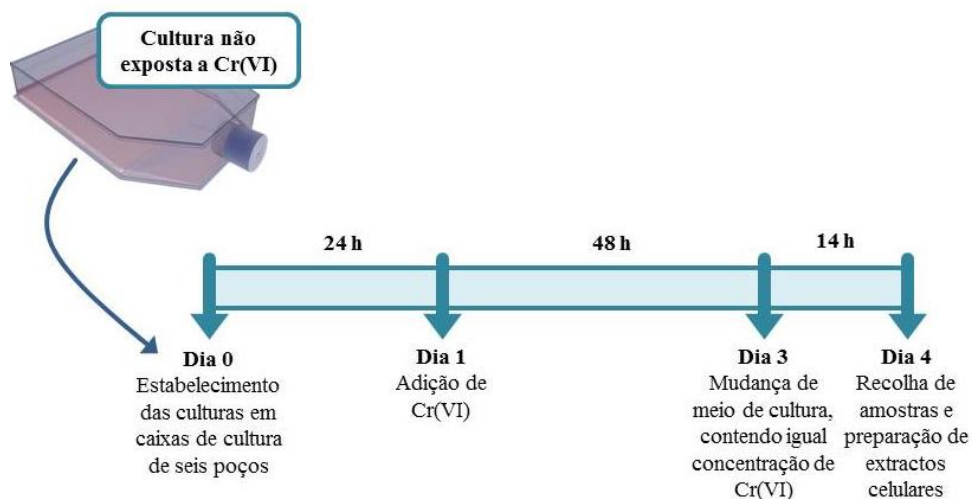


Figura 2.7. Representação esquemática do procedimento adoptado para a determinação do efeito do Cr(VI) no consumo de glicose, na produção de lactato, nos níveis intracelulares de nucleótidos de adenina e na carga energética. As experiências foram preparadas a partir de culturas não expostas a Cr(VI).

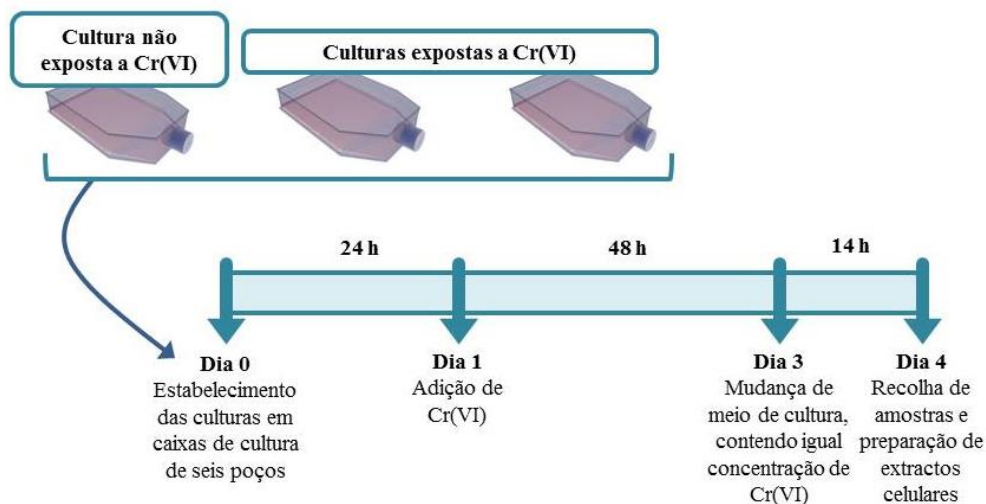


Figura 2.8. Representação esquemática do procedimento adoptado para a determinação do efeito do Cr(VI), após exposição de longa duração, no consumo de glicose, nos níveis intracelulares de nucleótidos e na carga energética. As experiências foram preparadas a partir de culturas expostas cronicamente a diferentes concentrações de Cr(VI). Para isso adicionou-se Cr(VI), aos frascos de cultura, 24 h após a passagem das células e, novamente, 72 h após a primeira adição, assegurando a exposição das culturas a Cr(VI) durante o período entre passagens.

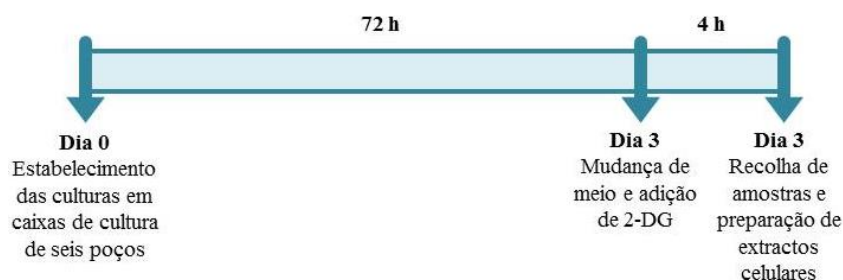
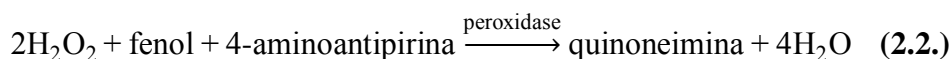
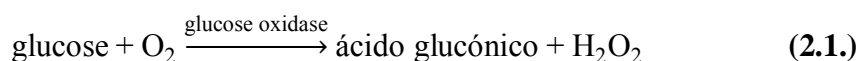


Figura 2.9. Representação esquemática do procedimento adoptado para determinação do efeito da 2-DG na produção de lactato e nos níveis intracelulares de ATP.

2.11.1.1. Quantificação de glucose

O *kit* Glucose RTU da BioMérieux foi o escolhido para a determinação enzimática da glucose presente no meio de cultura. Com este *kit*, a determinação das concentrações de glucose baseia-se na quantificação da quinoneimina que é formada de acordo com a seguinte sequência de reacções (equações 2.1. e 2.2.):



A quinoneimina é um produto colorido cuja absorvância a 505 nm é directamente proporcional à concentração de glucose presente nas amostras.

A 4-aminoantipirina, o fenol e as enzimas glucose oxidase e peroxidase encontram-se no reagente fornecido no *kit*, reagente esse que contém ainda ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) como agente quelante e tampão fosfato (pH 6,6).

No protocolo facultado pelo fornecedor, é indicado o uso de reagente não diluído. No entanto, no nosso laboratório e por uma questão de economia, utilizou-se reagente diluído 1:1 com água, tendo-nos certificado que os resultados não eram afectados por este processo.

Com vista à construção de uma curva padrão (A_{505} vs concentração de glucose), prepararam-se seis soluções de glucose com concentrações compreendidas entre 0 e 22,2 mM, por diluição de uma solução concentrada de glucose. Para a quantificação de glucose, procedeu-se de acordo com o procedimento descrito na Tabela 2.3. Após a

leitura das absorvâncias a 505 nm, num espectrofotómetro de visível, calculou-se a concentração deste nutriente em cada amostra recorrendo à curva padrão.

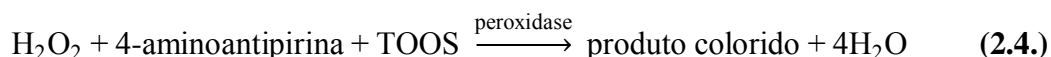
Tabela 2.3. Procedimento para a quantificação de glucose, utilizando o *kit* Glucose RTU da BioMérieux.

	Branco	Amostra/Padrão
Água ultrapura (µL)	30 ¹	—
Amostra ou padrão (µL)	—	30 ¹
Reagente diluído com água (1:1) (µL)	1000	1000
Misturar e ler a absorvância a 505 nm após 20 minutos de incubação à temperatura ambiente		

¹ Nas experiências preliminares para estabelecimento das condições de cultura (secção 3.1.1.) foram usados 10 µL para a quantificação de glucose.

2.11.1.2. Quantificação de lactato

Para a determinação enzimática do L-lactato presente no meio de cultura utilizou-se o *kit* L-Lactate da Randox. Com este *kit*, a determinação das concentrações de L-lactato baseia-se na quantificação de um produto colorido que é formado de acordo com a seguinte sequência de reacções (equações 2.3. e 2.4.):



A absorvância a 550 nm do produto colorido gerado é directamente proporcional à concentração de lactato presente nas amostras.

A 4-aminoantipirina e as enzimas lactato oxidase, peroxidase e ascorbato oxidase encontram-se no reagente fornecido no *kit*, todas na forma liofilizada. O tampão, também fornecido no *kit*, tem na sua constituição a substância tampão N-etil-N-(2 hidroxi-3-sulfopropil)m-toluidina (TOOS).

No protocolo facultado pelo fornecedor é indicado o uso de reagente não diluído, preparado através da restituição das enzimas liofilizadas pela adição de 6 mL de

tampão. No entanto, no nosso laboratório e por uma questão de economia, utilizou-se reagente diluído 1:1 com água, tendo-nos certificado que os resultados não eram afectados por este processo.

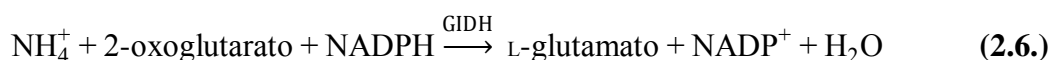
Com vista à construção de uma curva padrão (A_{550} vs concentração de lactato), prepararam-se três soluções de lactato de concentrações compreendidas entre 0 e 12,21 mM, por diluição de uma solução concentrada de lactato fornecida no *kit*. Para a quantificação de lactato, procedeu-se de acordo com o procedimento descrito na Tabela 2.4. Após a leitura das absorvâncias a 550 nm, num espectrofotómetro de visível, calculou-se a concentração deste metabolito em cada amostra recorrendo à curva padrão.

Tabela 2.4. Procedimento para a quantificação de lactato, utilizando o *kit* L-lactate da Randox.

	Branco	Amostra/Padrão
Água ultrapura (μL)	20	—
Amostra ou padrão (μL)	—	20
Reagente diluído com água (1:1) (μL)	1000	1000
Misturar e ler a absorvância a 550 nm após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente		

2.11.1.3. Quantificação de glutamina e de amónia

O *kit* L-Glutamine/Ammonia (Rapid) da Megazyme foi o escolhido para a quantificação de L-glutamina e de amónia presente no meio de cultura. Com este *kit*, a determinação das concentrações de ambos os metabolitos baseia-se na quantificação de NADPH, de acordo com a seguinte sequência de reacções (equações 2.5. e 2.6.):



A quantidade de NADPH consumido é, de acordo com a estequiometria da equação 2.6., igual à quantidade de amónia na amostra. Deste modo, o que é

quantificado é o consumo de NADPH, através da diminuição da absorvância a 340 nm, devido à sua conversão em NADP⁺.

O reagente fornecido com o *kit* contém 2-oxoglutarato, NADPH e as enzimas glutaminase e glutamato desidrogenase (GIDH). Os tampões fornecidos são acetato de sódio (pH 4,9) e trietanolamina (TEA; pH 8,0).

Para a quantificação de glutamina e amónia, procedeu-se de acordo com o procedimento descrito na Tabela 2.5. Após a leitura das absorvâncias a 340 nm (Tabela 2.5., A₁), adicionou-se GIDH e, após 4 minutos de incubação, leram-se novamente os valores de absorvância a 340 nm (Tabela 2.5., A₂). As concentrações de amónia foram determinadas de acordo com a equação 2.7., usando um coeficiente de extinção molar para o NADH a 340 nm de 6300 M⁻¹ cm⁻¹. As concentrações de glutamina foram determinadas de acordo com as equações 2.8. e 2.9., usando novamente um coeficiente de extinção molar para o NADH a 340 nm.

$$\Delta A_{\text{amónia}} = (A_1 - A_2)_{\text{amónia}} - (A_1 - A_2)_{\text{branco}} \quad (2.7.)$$

$$\Delta A_{(\text{L-glutamina+amónia})} = (A_1 - A_2)_{\text{L-glutamina}} - (A_1 - A_2)_{\text{branco}} \quad (2.8.)$$

$$\Delta A_{\text{L-glutamina}} = \Delta A_{(\text{L-glutamina+amónia})} - \Delta A_{\text{amónia branco}} \quad (2.9.)$$

Tabela 2.5. Procedimento para a quantificação de glutamina e amónia, utilizando o *kit* L-Glutamine/Ammonia (Rapid) da Megazyme.

	Amónia		Glutamina	
	Branco	Amostra	Branco	Amostra
Tampão acetato de sódio (µL)	—	—	100	100
Amostra (µL)	—	50	—	50
Solução de glutaminase (µL)	—	—	10	10
Misturar e incubar durante 5 minutos à temperatura ambiente				
Água ultrapura (µL)	910	860	800	750
Tampão TEA (µL)	150	150	150	150
Solução de NADPH (µL)	100	100	100	100
Misturar e ler a absorvância (A₁) a 340 nm após 4 minutos de incubação à temperatura ambiente				
Solução de GIDH (µL)	10	10	10	10
Misturar e ler a absorvância (A₂) a 340 nm após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente				

2.11.1.4. Quantificação de nucleótidos de adenina

Para a quantificação dos níveis intracelulares de nucleótidos de adenina removeu-se de cada poço o meio de cultura e lavou-se a monocamada de células com PBS. Destruiu-se a membrana celular utilizando um ácido forte, especificamente 300 μL de ácido perclórico (PCA) 0,3 M, permitindo que todo o material intracelular fosse libertado e que, por centrifugação a 12100 g durante 5 minutos, as fracções proteicas sedimentassem. A sedimentação das proteínas assegurou que não ocorria degradação enzimática dos nucleótidos de adenina presentes nos sobrenadantes e facilitou a separação da fracção proteica da fracção contendo os nucleótidos de adenina. Seguidamente, os sobrenadantes foram transferidos para tubos de microcentrífuga e o PCA foi neutralizado com 35 μL de hidróxido de potássio (KOH) 3 M [123]. O KOH forma um sal insolúvel com o PCA, o perclorato de potássio (KClO_4). Para favorecer a formação deste sal, os tubos de microcentrífuga foram colocados em gelo durante 15 minutos e depois centrifugados a 12100 g durante 5 minutos, promovendo a precipitação do sal e a sua separação dos nucleótidos de adenina, que permaneceram nos sobrenadantes. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos de microcentrífuga e armazenados a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ até à sua análise.

Neste trabalho, utilizou-se HPLC, especificamente a variante RP-HPLC (Figura 2.10.) para quantificar nucleótidos de adenina, tendo a detecção de nucleótidos sido realizada utilizando um detector UV. A HPLC tem por base a passagem de uma amostra por uma coluna de aço preenchida com um material adsorvente, o qual constitui a fase estacionária, adequado à separação da amostra em análise. Através da coluna faz-se passar um eluente, que constitui a fase móvel, a pressões elevadas, permitindo uma separação rápida e eficaz. À saída da coluna, os componentes da mistura detectáveis vão aparecer como um pico no registo gráfico. O RP-HPLC é a variante de HPLC mais utilizada na determinação dos níveis de nucleótidos de adenina. Esta variante apresenta vantagens comparativamente com outras técnicas, designadamente uma elevada eficiência e capacidade de distinção entre compostos quimicamente semelhantes. Nesta técnica, os nucleótidos de adenina vão ficar ligados à fase estacionária, hidrofóbica, e ao fazer-se passar a fase móvel, hidrofílica, pela coluna, os nucleótidos de adenina vão eluir por ordem decrescente do número de grupos fosfato, devido ao aumento da hidrofobicidade da molécula [124].

Para as quantificações foram injectados no sistema 20 μL de amostra.

Após a determinação da concentração dos nucleótidos de adenina, calculou-se a carga energética das células de acordo com a equação 1.2. (secção 1.1.3.) [13].

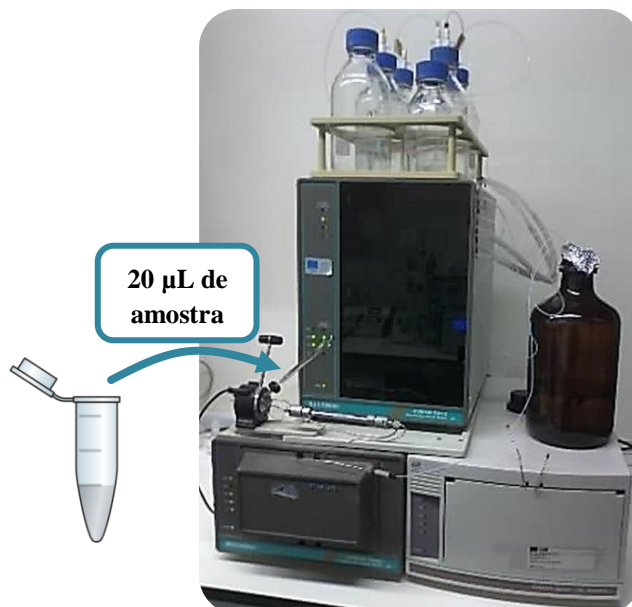


Figura 2.10. Sistema de HPLC Beckman System Gold®, com coluna Lichrospher 100 RP-18 de 5 µm, utilizado nas quantificações dos nucleótidos de adenina.

2.11.2. Quantificação de proteína

Para normalização dos resultados obtidos na quantificação dos parâmetros bioenergéticos referidos anteriormente (secção 2.11.1.), fez-se a quantificação da proteína total presente nos lisados celulares recorrendo ao método de Bradford. Para tal, foi utilizado o reagente do *kit* Protein Assay da Bio-Rad. O método de Bradford baseia-se na alteração do comprimento de máxima absorção (de 465 para 595 nm) do corante Comassie Brilliant Blue G-250 quando este interage com os aminoácidos básicos e aromáticos presentes nas proteínas, sob condições acídicas. Inicialmente o corante tem cor vermelho-acastanhada, mas quando se liga às proteínas adquire cor azul [125].

Os extractos celulares foram preparados de acordo com o procedimento indicado na secção 2.11.1.4. Após a sedimentação das fracções proteicas, os sedimentos foram ressuspensos em 200 µL NaOH 0,03 M. Esta ressuspensão foi necessária para

solubilizar as proteínas, para que pudessem ser quantificadas, e para neutralizar o ácido, dado que este interfere com o reagente de Bradford.

Com vista à construção de uma curva padrão (A_{595} vs concentração de proteína), prepararam-se soluções de BSA de concentrações compreendidas entre 0 e 10 $\mu\text{g/mL}$, por diluição de uma solução concentrada de BSA. Para a quantificação de proteína, procedeu-se de acordo com o procedimento indicado na Tabela 2.6. A concentração de proteína em cada extracto foi calculada recorrendo à curva padrão, após a leitura das absorvâncias a 595 nm, num espectrofotómetro de visível.

Tabela 2.6. Procedimento para quantificação de proteína, utilizando o reagente do *kit* Protein Assay da Bio-Rad.

	Branco	Extracto/Padrão
Água ultrapura (μL)	800	720
Extracto ou padrão (μL)	—	80
Reagente (μL)	200	200
Misturar e ler a absorvância a 595 nm após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente		

2.12. Análise estatística

As análises estatísticas foram efectuadas usando o software GraphPad Prism 5.00 para *Windows* (GraphPad Software Inc, Califórnia, EUA). A relevância estatística das diferenças entre grupos foi examinada usando o teste *t-student paired* ou, nas experiências em que foram comparados mais de dois grupos, o método *one-way ANOVA* seguido de um teste de comparações múltiplas (*Bonferroni* ou *Dunnett*). Os resultados foram apresentados como média \pm desvio de padrão (S.D.). Foram consideradas como estatisticamente significativas as diferenças com $p < 0,05$.

3. Resultados e Discussão

3.1. Estabelecimento das condições de cultura e determinação do impacto da idade de cultura no tipo de crescimento e metabolismo energético de células BEAS-2B

Todas as experiências descritas nesta dissertação foram realizadas utilizando a linha celular BEAS-2B. Antes de dar início ao nosso estudo propriamente dito, levámos a cabo um conjunto de experiências com vista a estabelecer as condições de cultura das células BEAS-2B e determinar o impacto da idade de cultura no crescimento e metabolismo energético destas mesmas células. Os resultados obtidos neste estudo preliminar encontram-se nas duas secções que se seguem.

3.1.1. Estabelecimento das condições de cultura das células BEAS-2B

O fornecedor da linha celular BEAS-2B recomenda que a densidade inicial esteja compreendida entre 3 e 10×10^3 células/cm² e as passagens sejam realizadas quando as culturas estiverem sub-confluentes. Recomenda ainda a utilização do meio de cultura BEGM e o revestimento dos recipientes de cultura com uma mistura de fibronectina, colagénio e BSA dissolvidos em BEGM [118].

No nosso laboratório, foram introduzidas algumas modificações, essencialmente por uma questão de custo, tendo-nos certificado previamente que estas não afectavam o crescimento e proliferação das células BEAS-2B. Especificamente, o meio de cultura utilizado é o meio LHC-9, também desprovido de soro. Para este estudo, fomos verificar se seria possível fazer apenas uma passagem por semana, para culturas estabelecidas com uma densidade inicial de 2000 células/cm². Para tal, monitorizámos os níveis de glucose e glutamina no meio de cultura no intervalo entre passagens, de acordo com o procedimento esquematizado na Figura 3.1. Tal como esperado, os níveis de glucose ao 7º dia (cerca de 2 mM), eram significativamente inferiores aos iniciais, de cerca de 6 mM (meio novo) (Figura 3.2.), tendo-se observado o mesmo relativamente aos níveis de glutamina, que diminuíram de 5 mM (meio novo) para 3 mM (7º dia) (Resultados não apresentados). Contudo, não nos pareceu que tenha ocorrido uma alteração significativa na taxa de crescimento da cultura. A confluência das culturas, tal como visualizado ao microscópio óptico (Figura 3.3.), também não nos pareceu excessiva e o número de células mortas em cultura manteve-se baixo. Em face destes

resultados, concluiu-se que este intervalo entre passagens não comprometia a qualidade das culturas, tendo sido este o procedimento adoptado na rotina de cultura de células.

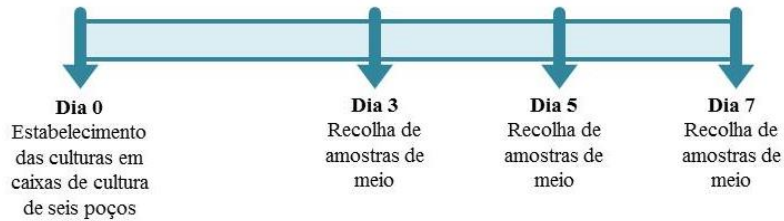


Figura 3.1. Representação esquemática do protocolo utilizado para determinação da concentração de glicose e glutamina existente entre passagens. Para a quantificação de glicose foi sempre recolhida uma amostra de meio de cada poço em cada dia indicado. Já para a quantificação de glutamina foi apenas recolhida uma amostra de meio no dia 7.

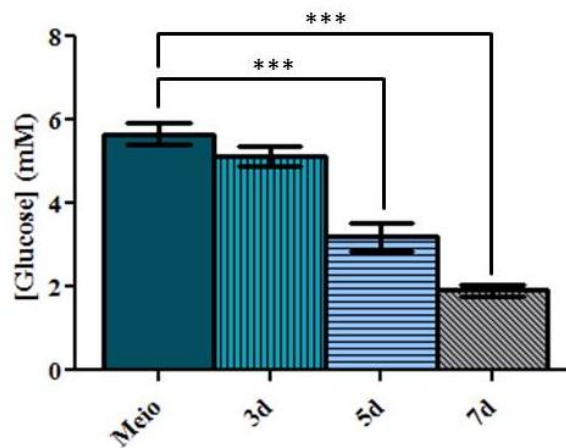


Figura 3.2. Níveis de glicose existentes no meio de cultura no intervalo entre passagens. As amostras de meio foram obtidas em diferentes dias (d) após a preparação das culturas (xd, dias após a preparação da cultura). A concentração de glicose foi determinada usando o *kit* Glucose RTU (secção 2.11.1.1.). Os resultados apresentados correspondem à média \pm S.D. de três experiências independentes, utilizando em todas elas tetraplicados de culturas. Os dados foram estatisticamente tratados no programa *GraphPad Prism 5.00*, utilizando o método *one-way ANOVA*, seguido do teste de comparações múltiplas *Dunnnett*: *** $p < 0.001$.

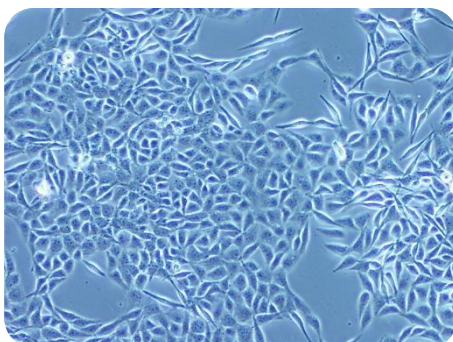


Figura 3.3. Micrografia de células da linha celular BEAS-2B, na passagem 18, a crescer em monocamada, 7 dias após o estabelecimento da cultura com uma densidade inicial de 2000 células/cm². Imagem obtida com uma objectiva de ampliação 10×.

Outra diferença relativamente ao procedimento indicado pelo fornecedor é o revestimento por nós utilizado (secção 2.3.). Desde sempre se optou, no nosso laboratório, por utilizar uma solução composta por gelatina a 1% (m/v) e BSA a 0,1% (m/v), em PBS 0,45×. Nestas experiências preliminares, fomos ainda verificar o que aconteceria às células se fossem crescidas na ausência de qualquer revestimento. Os parâmetros por nós investigados foram a morfologia e o tempo de duplicação. Tal como visualizado ao microscópio óptico, a ausência de revestimento leva à perda do típico padrão de crescimento das células epiteliais, semelhante aos pavimentos em pedra (Figura 3.4.a), e à formação de focos de células (Figura 3.4.b).

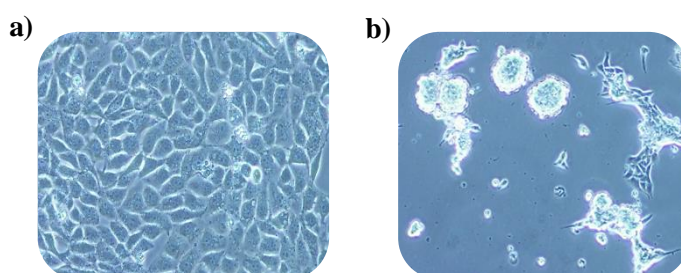


Figura 3.4. Micrografia de células da linha celular BEAS-2B a crescer sobre diferentes superfícies (a-superfície com revestimento; b-superfície sem revestimento). O revestimento (secção 2.3.) é composto por gelatina a 1% (m/v) e BSA a 0,1% (m/v), em PBS 0,45×. Imagem obtida com uma objectiva de ampliação 20× (a) e 10× (b).

Embora a ausência de revestimento tenha afectado visivelmente a morfologia e padrão de crescimento das culturas, os tempos de duplicação destas não foram afectados, sendo ambos de aproximadamente 24 h (Figura 3.5.).

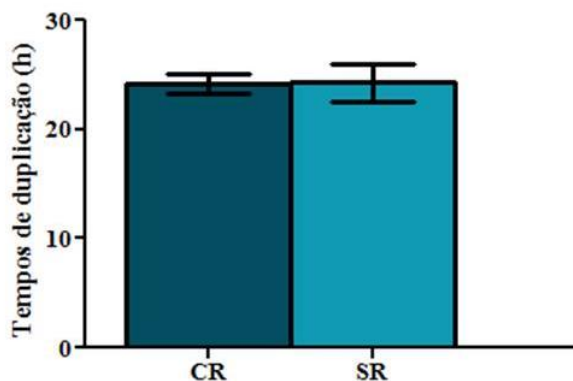


Figura 3.5. Tempos de duplicação das culturas de células BEAS-2B crescidas sobre superfícies com (CR) e sem (SR) revestimento. O revestimento é composto por gelatina a 1% (m/v) e BSA a 0,1% (m/v), em PBS 0,45×. Os números totais de células utilizados para o cálculo dos tempos de duplicação foram obtidos através do método do azul de tripano (secção 2.6.). Os resultados apresentados correspondem à média \pm S.D. de quatro experiências independentes, utilizando em todas elas triplicados de culturas para cada condição analisada. Os dados foram estatisticamente tratados no programa *GraphPad Prism 5.00*, utilizando o teste *t de Student emparelhado*. Não se observaram diferenças estatisticamente significativas.

3.1.2. Determinação do impacto da idade de cultura no tipo de crescimento e metabolismo energético de células BEAS-2B

Como o processo de imortalização utilizado no estabelecimento da linha celular BEAS-2B poderá causar alguma instabilidade genética, antes de proceder ao nosso estudo do impacto do Cr(VI) no metabolismo energético destas células, levámos a cabo um conjunto de experiências preliminares. Especificamente, fomos verificar se a idade de cultura afecta o tipo de crescimento e metabolismo energético de células BEAS-2B.

Para determinar o impacto da idade de cultura nestes parâmetros foram mantidas, em paralelo, culturas em passagens significativamente diferentes. Avaliou-se, para ambas, a morfologia, os tempos de duplicação, o consumo de glucose e a produção de lactato. Tal como visualizado ao microscópio óptico (Figura 3.6.), com o aumento da idade da cultura as células tornaram-se maiores e perderam a típica forma de diamante. Adicionalmente, o *crisscrossing* tornou-se mais frequente.

Verificou-se que existem diferenças estatisticamente significativas nos tempos de duplicação de culturas de baixa e elevada passagem (24 e 19 h, respectivamente). As células com uma idade de cultura mais elevada têm uma taxa de crescimento superior (Figura 3.7.).

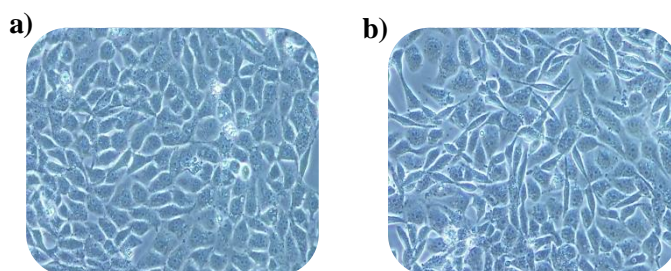


Figura 3.6. Micrografia de células da linha celular BEAS-2B com diferentes idades de cultura (a-passagem 16; b-passagem 43). Observa-se que nas células com idade de cultura mais elevada o *crisscrossing* é mais frequente e o seu tamanho é superior ao das células de idade de cultura mais baixa. Imagem obtida com uma objectiva de ampliação 20× (a) e 10× (b).

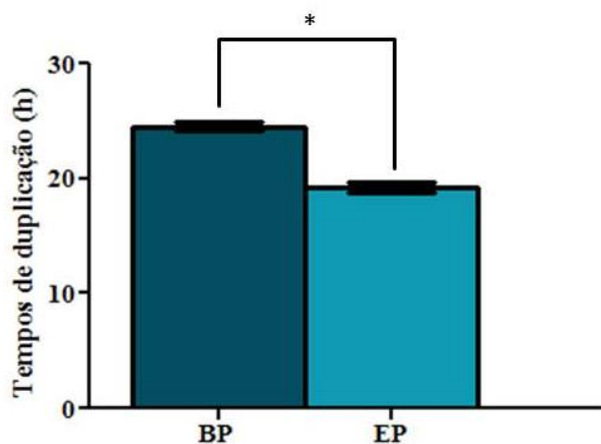


Figura 3.7. Tempos de duplicação de culturas de células BEAS-2B com diferentes idades (BP-baixas passagens; EP-elevadas passagens). Os números totais de células utilizados para os cálculos dos tempos de duplicação foram obtidos através do método do azul de tripano (secção 2.6.). Os resultados apresentados correspondem à média \pm S.D. de três experiências independentes, utilizando em todas elas triplicados de culturas para cada condição analisada. Os dados foram estatisticamente tratados no programa *GraphPad Prism 5.00*, utilizando o teste *t de Student emparelhado*: * $p < 0.05$.

Os valores obtidos para ambos os parâmetros foram semelhantes para as culturas de ambas as idades (cerca de 9 μmol glucose/4 dias/ 10^6 células e 18 μmol lactato/4 dias/ 10^6 células) (Figuras 3.8. e 3.9.). Concluiu-se que, pelo menos para as idades de cultura testadas, e ao nível destes dois parâmetros, o metabolismo celular não é afectado.

Destas experiências concluiu-se que culturas de passagens mais elevadas têm um tempo de duplicação inferior às culturas de passagens mais baixas. De maior importância, no âmbito deste trabalho, é o facto de o metabolismo energético não ser afectado para as idades de culturas testadas, pelo menos em termos do consumo de glucose e da produção de lactato.

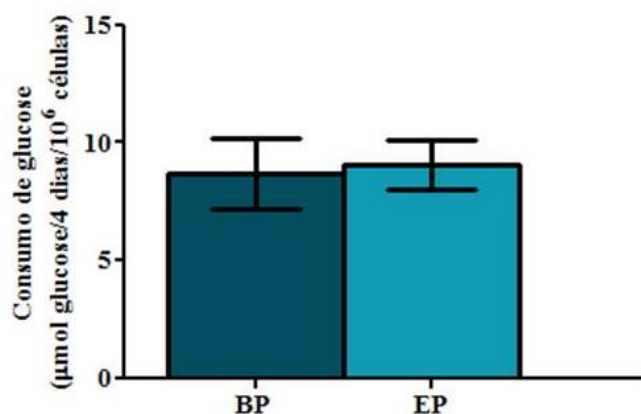


Figura 3.8. Consumo de glucose por culturas de células BEAS-2B, com diferentes idades de cultura (BP-baixas passagens; EP-elevadas passagens). As amostras de meio foram recolhidas 96 h após a preparação das culturas. Para a quantificação de glucose no meio de cultura utilizou-se o *kit* Glucose RTU (secção 2.11.1.1.). Os resultados foram normalizados em termos do número total de células determinado recorrendo ao método do azul de tripano (secção 2.6.). Os resultados apresentados correspondem à média \pm S.D. de três experiências independentes, utilizando em todas elas tetraplicados de culturas para cada condição analisada. Os dados foram estatisticamente tratados no programa *GraphPad Prism 5.00*, utilizando o teste *t de Student emparelhado*. Não se observaram diferenças estatisticamente significativas.

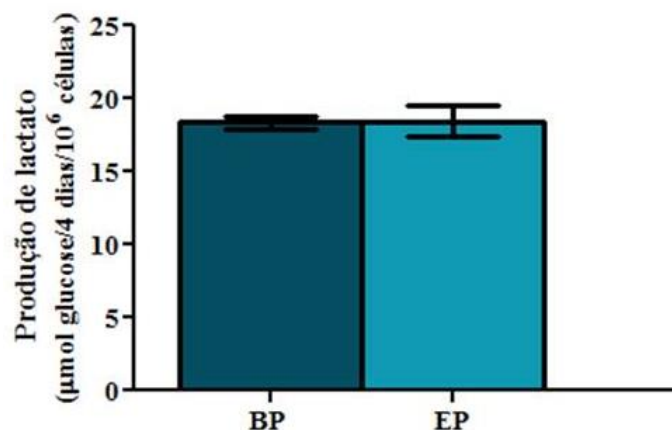


Figura 3.9. Produção de lactato por culturas de células BEAS-2B, com diferentes idades de cultura (BP-baixas passagens; EP-elevadas passagens). As amostras de meio foram recolhidas 96 h após a preparação das culturas. Para a quantificação de lactato no meio de cultura utilizou-se o *kit* L-lactate (secção 2.11.1.2.). Os resultados foram normalizados em termos do número total de células determinado recorrendo ao método do azul de tripano (secção 2.6.). Os resultados apresentados correspondem à média \pm S.D. de três experiências independentes, utilizando em todas elas tetraplicados de culturas para cada condição analisada. Os dados foram estatisticamente tratados no programa *GraphPad Prism 5.00*, utilizando o teste *t* de *Student emparelhado*. Não se observaram diferenças estatisticamente significativas.

3.2. Efeito do Cr(VI) no metabolismo energético de células BEAS-2B

Tal como referido na secção 1.2.2., foram relatados vários estudos em que se observaram alterações, promovidas por exposição a Cr(VI), em vários parâmetros bioenergéticos. Porém, o fenótipo bioenergético induzido por Cr(VI) no seu principal alvo *in vivo* ainda está muito incompletamente estabelecido. Pretendeu-se com o presente estudo colmatar, ainda que parcialmente, esta falha. O objectivo desta segunda parte do trabalho foi, então, avaliar o efeito do Cr(VI) no metabolismo energético, em condições basais e na presença de um modulador do metabolismo, especificamente no consumo de glucose, na produção de lactato, nos níveis intracelulares de nucleótidos de adenina e na carga energética. Para isso foi necessário estabelecer previamente os protocolos a seguir, os quais são apresentados nas secções seguintes.

3.2.1. Estabelecimento de protocolos

3.2.1.1. Regime de exposição ao Cr(VI)

Os resultados obtidos em estudos envolvendo concentrações de Cr(VI) demasiado citotóxicas devem ser interpretados com cuidado, uma vez que estes não irão traduzir o que ocorre em situações reais. Assim, era importante garantir que as concentrações de Cr(VI) usadas no presente estudo não seriam excessivamente citotóxicas. Com esse intuito, avaliou-se o efeito das seguintes concentrações de Cr(VI) na viabilidade celular: 0,1, 1 e 2 μM de Cr(VI).

A incubação das culturas, durante 48 h, com 0,1, 1 e 2 μM de Cr(VI) provocou 5, 8 e 16% de morte celular, respectivamente (Figura 3.10.). Apesar das diferenças observadas serem estatisticamente significativas, nenhuma destas concentrações foi excessivamente citotóxica. Foram, então, seleccionadas duas concentrações de Cr(VI), 1 e 2 μM , para a avaliação do seu impacto no metabolismo energético de células BEAS-2B em exposições de curta duração (48 h). Na avaliação do seu impacto em exposições de longa duração, seleccionaram-se as concentrações de 0,1 e 2 μM de Cr(VI).

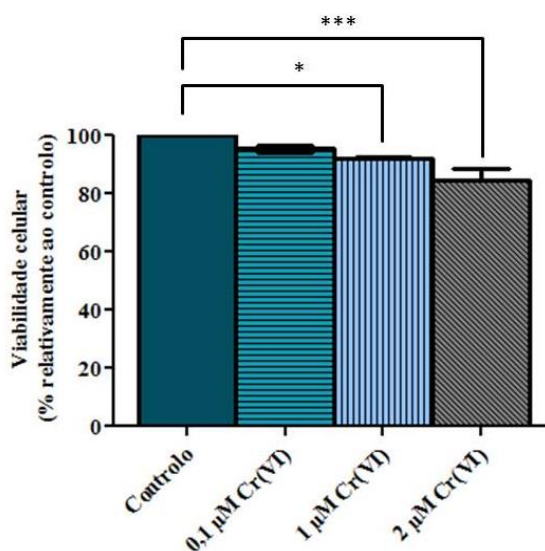


Figura 3.10. Efeito do Cr(VI) na viabilidade celular de células BEAS-2B expostas, durante 48 h, a 0,1, 1 e 2 μM de Cr(VI). A viabilidade celular é apresentada como percentagem relativamente ao controlo, i.e., células não expostas a Cr(VI). A contagem de células foi feita utilizando o método do azul de tripano (secção 2.6.). Os resultados apresentados correspondem à média \pm S.D. de três experiências independentes, utilizando em todas elas tetraplicados de culturas para cada condição analisada. Os dados foram estatisticamente tratados no programa *GraphPad Prism 5.00*, utilizando o método *one-way ANOVA*, seguido do teste de comparações múltiplas *Bonferroni*: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

3.2.1.2. Quantificação de glucose e de lactato no meio de cultura

Para a quantificação de glucose e de lactato no meio de cultura celular foi necessário determinar previamente qual a densidade celular inicial, assim como o intervalo de monitorização do seu consumo/produção que permitiria a sua quantificação. Para tal, testaram-se três densidades celulares (4000, 6000 e 8000 células/cm²) e quatro intervalos de monitorização (4, 6, 8 e 14 h). Atendendo aos resultados obtidos (Resultados não apresentados), optou-se pela utilização de uma densidade celular inicial de 7000 células/cm² e um intervalo de monitorização de 14 h.

3.2.2. Impacto de uma exposição de 48 h a Cr(VI) no consumo de glucose e na produção de lactato

O impacto de uma exposição de 48 h a 1 e 2 µM de Cr(VI) no consumo de glucose e na produção de lactato por células da linha celular BEAS-2B está sumariado nas Figuras 3.11. e 3.12., respectivamente.

Os resultados obtidos em três experiências independentes mostraram um efeito estimulatório dependente da dose no consumo de glucose. Especificamente, observou-se uma estimulação de 13 e 20% para exposições a 1 e 2 µM, respectivamente (Figura 3.11.). Esta estimulação foi estatisticamente significativa para ambas as concentrações. Nas culturas controlo, o consumo de glucose permaneceu basicamente constante entre as experiências, com um valor médio de 34 pmol glucose/min/µg proteína.

Estes resultados estão de acordo com os obtidos em outro estudo realizado no nosso laboratório com células PC-12, em que também se observou um aumento no consumo de glucose nas células incubadas com Cr(VI) [66]. Neste estudo as células foram incubadas com 1, 2 e 5 µM de Cr(VI) durante 6 h [66].

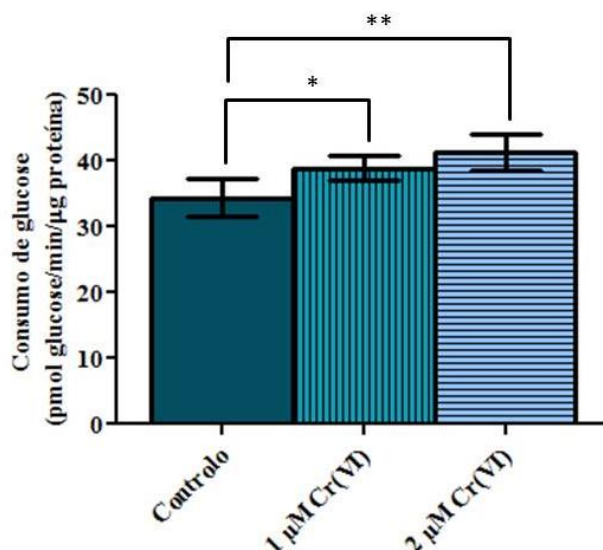


Figura 3.11. Efeito do Cr(VI) no consumo de glucose por culturas de células BEAS-2B expostas a este ião durante 48 h. Para a quantificação de glucose no meio de cultura, utilizou-se o *kit* Glucose RTU (secção 2.11.1.1.). Os resultados foram normalizados em termos de proteína total determinada recorrendo ao método de Bradford (secção 2.11.2.). Os resultados apresentados correspondem à média \pm S.D. de três experiências independentes, utilizando em todas elas tetraplicados de culturas para cada condição analisada. Os dados foram estatisticamente tratados no programa *GraphPad Prism 5.00*, utilizando o método *one-way ANOVA*, seguido do teste de comparações múltiplas *Bonferroni*: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

As culturas utilizadas para determinar o efeito do Cr(VI) no consumo de glucose foram também utilizadas para determinar o efeito deste ião na produção de lactato (assim como nos níveis intracelulares de nucleótidos de adenina, secção 3.2.3). Observou-se um efeito estimulatório na produção de lactato em cerca de 6 e 18% para exposições a 1 e 2 μM , respectivamente (Figura 3.12.). Esta estimulação foi estatisticamente significativa apenas para a concentração de 2 μM de Cr(VI). Nas culturas controlo, a produção de lactato permaneceu basicamente constante entre as experiências, com um valor médio de 41 pmol lactato/min/ μg proteína.

Existem dois estudos descritos na literatura nos quais se avaliou o impacto do Cr(VI) na produção de lactato pela mesma linha celular utilizada neste trabalho [73] e também por células PC-12 [66]. Verificou-se em ambos um efeito estimulatório neste parâmetro, tal como foi observado no presente estudo. No estudo em que foram utilizadas células BEAS-2B, estas foram incubadas com 1 μM de Cr(VI) durante 48 h, após as quais o meio foi substituído por meio novo, sem Cr(VI), tendo o consumo sido determinado num período de 4 horas [73]. No outro estudo, utilizando células PC-12, estas foram incubadas com 1, 2 e 5 μM Cr(VI) durante 6 h [66]. Neste último estudo, o

impacto do Cr(VI) na produção de lactato foi dependente da dose. Este impacto foi menos pronunciado que o observado neste trabalho para as mesmas concentrações, o que poderá dever-se ao facto da exposição ter sido substancialmente mais curta.

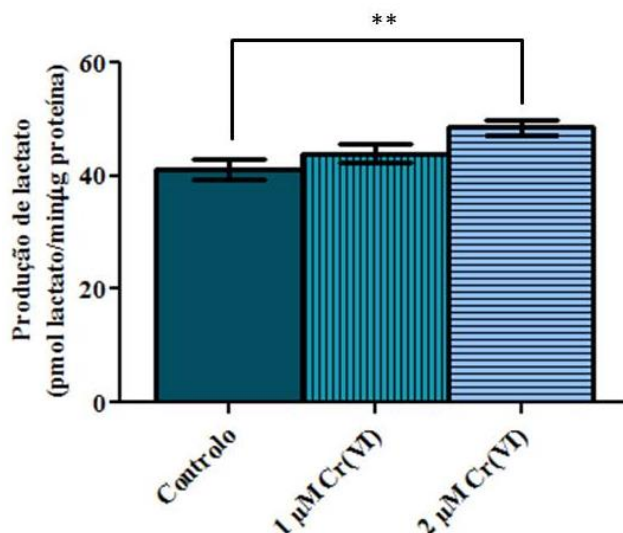


Figura 3.12. Efeito do Cr(VI) na produção de lactato por culturas de células BEAS-2B expostas a este ião durante 48 h. Para a quantificação de lactato no meio de cultura utilizou-se o *kit* L-lactate (secção 2.11.1.2.). Os resultados foram normalizados em termos de proteína total determinada recorrendo ao método de Bradford (secção 2.11.2.). Os resultados apresentados correspondem à média \pm S.D. de três experiências independentes, utilizando em todas elas tetraplicados de culturas para cada condição analisada. Os dados foram estatisticamente tratados no programa *GraphPad Prism 5.00*, utilizando o método *one-way ANOVA*, seguido do teste de comparações múltiplas *Bonferroni*: $**p < 0.01$.

3.2.2.1. Efeito do Cr(VI) na produção de lactato na presença de um inibidor da glicólise

Tendo os resultados por nós obtidos sugerido que culturas expostas a Cr(VI) estão mais dependentes da fermentação láctica para regenerar ATP do que as células normais das quais derivaram (secção 3.2.2.), decidimos verificar se seriam mais ou menos sensíveis à presença de um inibidor da glicólise, especificamente a 2-DG.

Tal como referido na secção 1.1.4., as células cancerígenas têm tendência a depender mais do processo fermentativo para regenerar ATP do que as células normais das quais derivaram, o que implica que, para obter a mesma quantidade de energia em

forma de ATP, têm de oxidar mais glucose. Consequentemente, a sua taxa de transporte para o interior das células é superior ao de células normais (secção 1.1.4.). Esta particularidade tem vindo a ser estudada como alvo para terapia anticancerígena selectiva. De facto, existem vários estudos realizados no sentido de desenvolver compostos que interfiram com este elevado transporte e/ou consumo de glucose. A 2-DG, um análogo sintético da glucose e modulador do metabolismo, tem vindo a ser utilizada em vários estudos *in vitro* e *in vivo*, sozinha ou em combinação com outros fármacos, com o objectivo de avaliar o seu efeito quer em células normais, quer em células cancerígenas [73, 126-128]. Ao carbono C2 da glucose está ligado um grupo hidroxilo, o qual é substituído por um átomo de hidrogénio na 2-DG [129]. Ao entrar na célula, a 2-DG é fosforilada, pela enzima hexocinase (HK), originando 2-deoxi-D-glucose-6-fosfato (2-DG-6-P), um inibidor competitivo da enzima fosfoglucose isomerase (PGI) [130]. Uma vez que esta enzima não a consegue metabolizar a 2-DG-6-P esta acumula no interior das células (Figura 3.13.) [131-133]. Esta acumulação promove a inibição não competitiva da enzima HK [134]. A 2-DG vai, então, interferir com a glicólise e, como tal, também os processos respiratório e fermentativo são afectados [129].

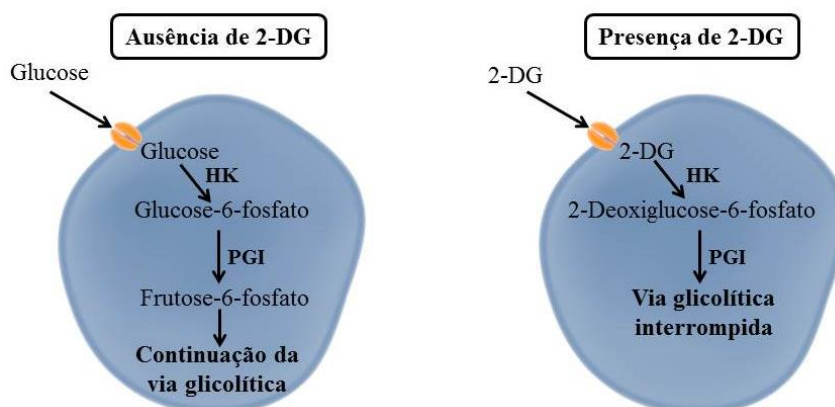


Figura 3.13. Efeito provocado pela 2-DG no metabolismo energético celular. Ao entrar na célula, a 2-DG é fosforilada, pela enzima HK, originando 2-DG-6-P. A 2-DG-6-P não sofre mais nenhuma reacção, uma vez que a enzima PGI não a metaboliza. Consequentemente, há acumulação de 2-DG-6-P no interior da célula. A 2-DG-6-P é um inibidor não competitivo e competitivo da enzima HK e da enzima PGI, respectivamente, ficando a via glicolítica interrompida.

No presente estudo, avaliou-se o efeito da presença deste modulador do metabolismo no impacto que o Cr(VI) tem na produção de lactato.

Realizaram-se três experiências independentes para seleccionar a concentração de 2-DG mínima necessária para ocorrer um decréscimo significativo da produção de lactato. As culturas foram expostas a 0,1, 1 e 10 mM de 2-DG. Foi também realizada uma experiência em que se usou uma concentração de 0,01 mM de 2-DG, porém não se verificou qualquer efeito no parâmetro analisado (Resultados não apresentados).

As concentrações de 0,1, 1 e 10 mM de 2-DG provocaram um decréscimo da produção de lactato de 4, 34 e 76%, respectivamente (Figura 3.14.). Este efeito foi estatisticamente significativo para as concentrações de 1 e 10 mM de 2-DG (Figura 3.14.). Testes de citotoxicidade revelaram que estas concentrações de 2-DG não eram excessivamente citotóxicas para as células BEAS-2B (Resultados não apresentados). Com base nestes resultados, optou-se por utilizar uma concentração de 5 mM de 2-DG nas experiências subsequentes.

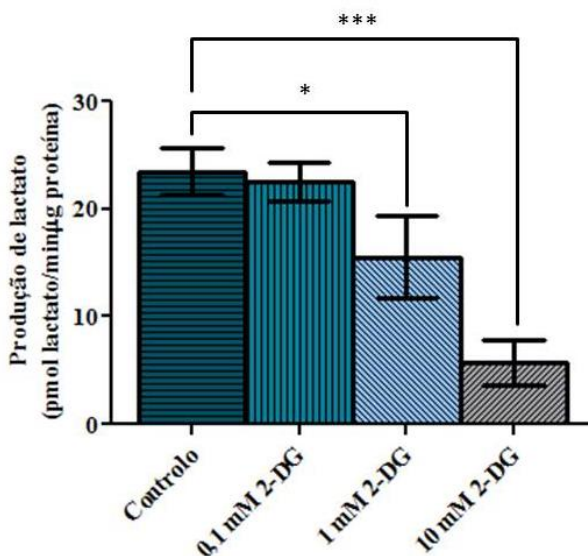


Figura 3.14. Efeito da 2-DG na produção de lactato por culturas de células BEAS-2B expostas a este composto durante 4 h. Para a quantificação de lactato no meio de cultura, utilizou-se um *kit* comercial (secção 2.11.1.2.). Os resultados foram normalizados em termos de proteína total determinada recorrendo ao método de Bradford (secção 2.11.2.). Os resultados apresentados correspondem à média \pm S.D. de três experiências independentes, utilizando em todas elas tetraplicados de culturas para cada condição analisada. Os dados foram estatisticamente tratados no programa *GraphPad Prism 5.00*, utilizando o método *one-way ANOVA*, seguido do teste de comparações múltiplas *Dunnett*: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

Após a selecção das concentrações de 2-DG e Cr(VI), as culturas foram incubadas com 2 μ M de Cr(VI) durante 48 h. Após este período, o meio de cultura foi renovado e as culturas foram incubadas durante 4 h com 5 mM de 2-DG, de acordo com o esquema apresentado na Figura 3.15.

Tal como seria de esperar, verificou-se uma diminuição acentuada na produção de lactato na presença de 2-DG (Figura 3.16.). Esta diminuição foi essencialmente a mesma em culturas controlo e em culturas expostas a Cr(VI) (cerca de 40% do respectivo controlo), conclui-se que, pelo menos nas condições testadas, o Cr(VI) não tem qualquer influência na inibição da fermentação láctica produzida pela 2-DG.

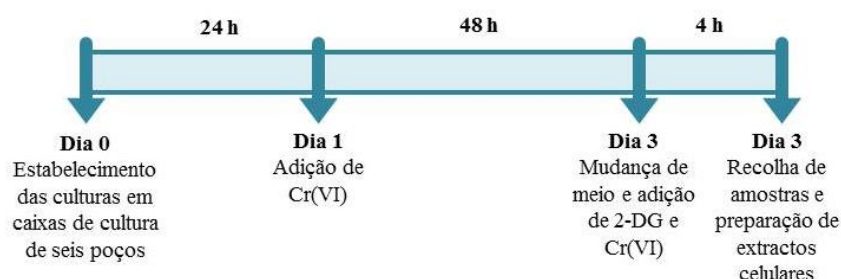


Figura 3.15. Regime de exposição das culturas de células BEAS-2B com 2-DG e Cr(VI) para verificar se células expostas a Cr(VI) são mais ou menos sensíveis à presença de 2-DG. A mudança de meio realizada (Dia 3) foi acompanhada da adição de 2-DG e, novamente, Cr(VI). Este último foi adicionado apenas às culturas expostas exclusivamente a Cr(VI).

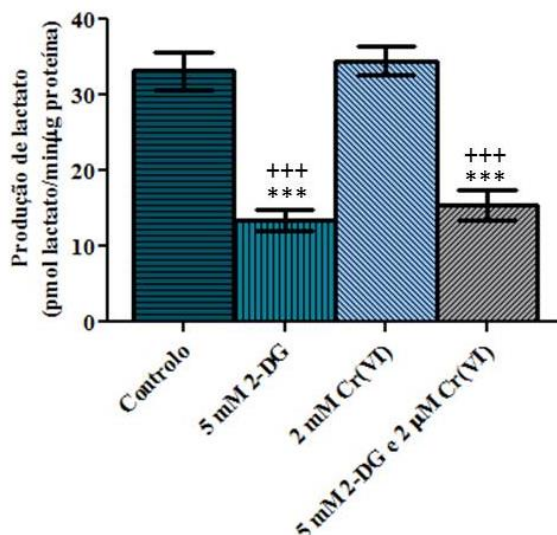


Figura 3.16. Efeito do Cr(VI) na produção de lactato por culturas de células BEAS-2B expostas a este ião sob condições basais e condições em que a glicólise foi inibida. Para a quantificação de lactato no meio de cultura utilizou-se o *kit* L-lactate (secção 2.11.1.2.). Os resultados foram normalizados em termos de proteína total determinada recorrendo ao método de Bradford (secção 2.11.2.). Os resultados apresentados correspondem à média \pm S.D. de três experiências independentes, utilizando em todas elas tetraplicados de culturas para cada condição analisada. Os dados foram estatisticamente tratados no programa *GraphPad Prism 5.00*, utilizando o método *one-way ANOVA*, seguido do teste de comparações múltiplas *Bonferroni*: *** $p < 0.001$ relativamente ao controlo; +++ $p < 0.001$ relativamente a culturas expostas a 2 μ M de Cr(VI).

3.2.3. Impacto de uma exposição de 48 h a Cr(VI) no estado energético celular

As culturas utilizadas na determinação do efeito do Cr(VI) no consumo de glucose e produção de lactato (secção 3.2.2.) foram também utilizadas para determinar o efeito deste ião no estado energético celular, especificamente nos seus níveis intracelulares de nucleótidos de adenina e na sua EC. Os resultados obtidos em três experiências independentes mostraram que, apesar das diferenças observadas ao nível do consumo de glucose e da produção de lactato (secção 3.2.2.), a EC das culturas expostas a Cr(VI) não foi afectada por nenhuma das concentrações de Cr(VI) utilizadas (Figura 3.17.). Estes resultados não estão de acordo com os obtidos em vários estudos descritos na literatura nos quais se observou um decréscimo na EC após incubação de células com Cr(VI) [74, 76, 86]. No estudo realizado no nosso laboratório foram usadas células PC-12 incubadas com 1, 2 e 5 μ M de Cr(VI) durante 6 h [66]. Nos restantes

estudos, foram utilizados diferentes modelos biológicos, concentrações de Cr(VI) superiores, a variar entre 3 a 2000 μM , e tempos de incubação menores, entre 10 a 120 minutos. Todos os estudos apontam para um decréscimo da EC dependente da dose e do tempo de exposição [74, 76, 86].

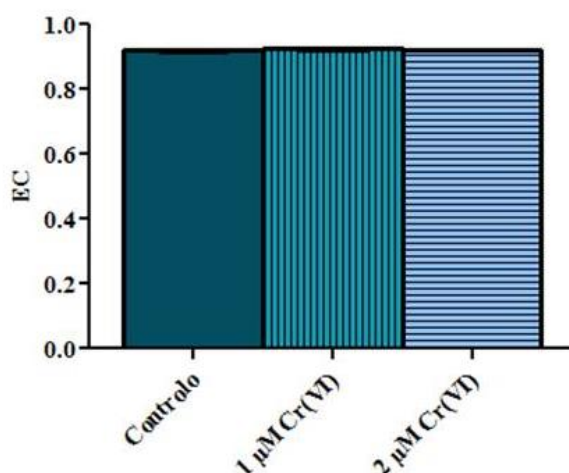


Figura 3.17. Efeito do Cr(VI) na carga energética de células BEAS-2B expostas a este ião durante 48 h. A carga energética foi calculada de acordo com a equação de Atkinson (equação 1.2). Os resultados apresentados correspondem à média \pm S.D. de três experiências independentes, utilizando para todas elas tetraplicados de culturas para cada condição analisada. Os dados foram estatisticamente tratados no programa *GraphPad Prism 5.00*, utilizando o método *one-way ANOVA*, seguido do teste de comparações múltiplas *Bonferroni*. Não se observaram diferenças estatisticamente significativas.

Relativamente aos níveis intracelulares de ATP, observou-se um aumento dependente da dose, embora muito ténue (Figura 3.18.) e sem significado estatístico. Estes resultados são consistentes com os obtidos noutra estudo em que foram incubadas células L-02, durante 12 e 36 h, com 8, 16 e 32 μM de Cr(VI). Porém, noutros estudos, utilizando modelos e regimes de exposição diferentes, obteve-se um resultado oposto [74, 76, 79, 80, 83-88]. No único estudo em que se utilizaram células BEAS-2B e um regime de exposição semelhante (1 μM de Cr(VI) durante 48 h, seguido por um período de monitorização de 4 h na ausência de Cr(VI)), verificou-se um decréscimo nos níveis de ATP [73].

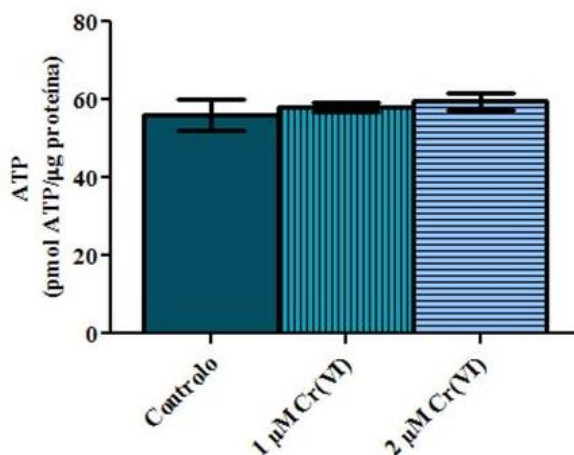


Figura 3.18. Efeito do Cr(VI) nos níveis intracelulares de ATP de células BEAS-2B expostas a este ião durante 48 h. Para a quantificação de ATP utilizou-se o sistema de RP-HPLC (secção 2.11.1.4.). Os resultados foram normalizados em termos de proteína total determinada recorrendo ao método de Bradford (secção 2.11.2.). Os resultados apresentados correspondem à média \pm S.D. de três experiências independentes, utilizando para todas elas tetraplicados de culturas para cada condição analisada. Os dados foram estatisticamente tratados no programa *GraphPad Prism 5.00*, utilizando o método *one-way ANOVA*, seguido do teste de comparações múltiplas *Bonferroni*. Não se observaram diferenças estatisticamente significativas.

Para a concentração de 2 μ M de Cr(VI), os níveis de ADP aumentaram cerca de 10%, relativamente ao controlo, embora sem significado estatístico (Figura 3.19.). Estes resultados são consistentes com os obtidos anteriormente noutros estudos envolvendo concentrações bastantes elevadas de Cr(VI), compreendidas entre 125 e 2000 μ M [76, 85, 86]. Pelo contrário, para a concentração inferior, ocorreu um decréscimo nos níveis de ADP em cerca de 5% (Figura 3.19.). Novamente, esta diferença não foi estatisticamente significativa.

Nos níveis de AMP, observou-se um aumento dependente da dose, embora muito ténue (Figura 3.20.) e sem significado estatístico. Estes resultados estão de acordo com os obtidos em estudos anteriores, embora nestes tenham sido usadas concentrações de Cr(VI) bastante superiores às usadas no presente trabalho [76, 85, 86].

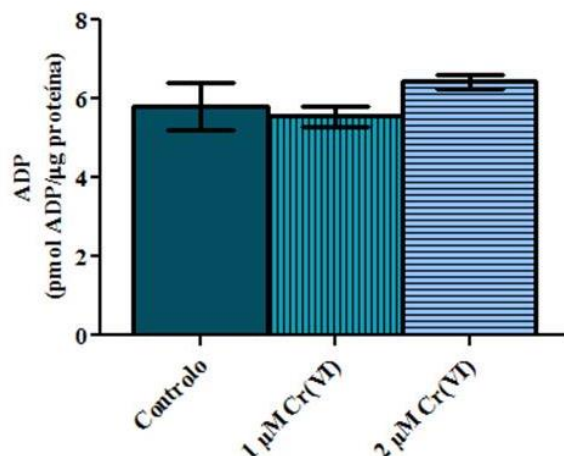


Figura 3.19. Efeito do Cr(VI) nos níveis intracelulares de ADP de células BEAS-2B expostas a este ião durante 48 h. Para a quantificação de ADP utilizou-se o sistema de RP-HPLC (secção 2.11.1.4.). Os resultados foram normalizados em termos de proteína total determinada recorrendo ao método de Bradford (secção 2.11.2.). Os resultados apresentados correspondem à média \pm S.D. de três experiências independentes, utilizando para todas elas tetraplicados de culturas para cada condição analisada. Os dados foram estatisticamente tratados no programa *GraphPad Prism 5.00*, utilizando o método *one-way ANOVA*, seguido do teste de comparações múltiplas *Bonferroni*. Não se observaram diferenças estatisticamente significativas.

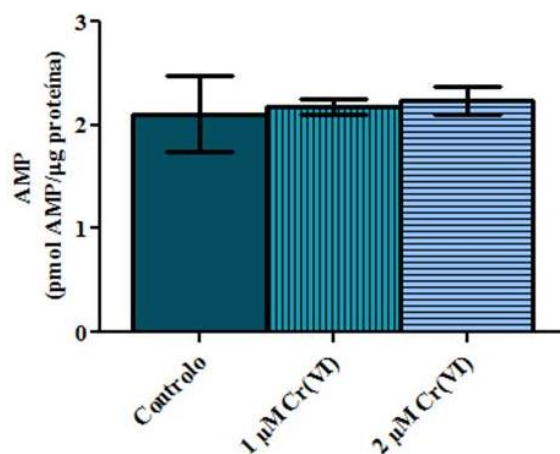


Figura 3.20. Efeito do Cr(VI) nos níveis intracelulares de AMP de células BEAS-2B expostas a este ião durante 48 h. Para a quantificação de AMP utilizou-se o sistema de RP-HPLC (secção 2.11.1.4.). Os resultados foram normalizados em termos de proteína total determinada recorrendo ao método de Bradford (secção 2.11.2.). Os resultados apresentados correspondem à média \pm S.D. de três experiências independentes, utilizando para todas elas tetraplicados de culturas para cada condição analisada. Os dados foram estatisticamente tratados no programa *GraphPad Prism 5.00*, utilizando o método *one-way ANOVA*, seguido do teste de comparações múltiplas *Bonferroni*. Não se observaram diferenças estatisticamente significativas.

Todos os estudos descritos na literatura mostraram que a EC e os níveis intracelulares de ATP de células expostas a Cr(VI) tendem a diminuir, enquanto que os

níveis intracelulares de ADP e de AMP tendem a aumentar. No presente trabalho verificou-se um aumento dos níveis de ADP e AMP, embora nenhuma destas diferenças tenha sido estatisticamente significativa. Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que as células expostas a Cr(VI) conseguem manter a sua EC e produzir uma quantidade de energia sob a forma de ATP semelhante à produzida pelas células controlo.

3.2.3.1. Efeito do Cr(VI) nos níveis intracelulares de ATP na presença de um inibidor da glicólise

As culturas utilizadas na determinação do efeito do Cr(VI) na produção de lactato na presença de um inibidor da glicólise foram também utilizadas para determinar o efeito destas condições experimentais nos seus níveis intracelulares de ATP. Surpreendentemente, nas experiências iniciais com vista à selecção da concentração de 2-DG a utilizar, verificou-se que, apesar das diferenças observadas ao nível da produção de lactato (secção 3.2.2.1.), os níveis intracelulares de ATP não foram afectados. De facto, o único decréscimo observado nas culturas expostas à maior das concentrações de 2-DG testadas (10 mM), foi muito pequeno e sem qualquer significado estatístico (Figura 3.21.). As restantes concentrações, 0,1 e 1 mM de 2-DG, provocaram, pelo contrário, um aumento nos níveis de ATP, cerca de 9 e 4%, respectivamente, mas, novamente, sem significado estatístico.

Na presença de Cr(VI) os níveis intracelulares de ATP também não foram afectados em nenhuma das condições experimentais testadas (Figura 3.22.). Noutro grupo de experiências, quando as células foram incubadas apenas com Cr(VI) (secção 3.2.3.; Figura 3.18.) ou com 2-DG (Figura 3.21.), também não se verificaram alterações nos níveis intracelulares de ATP. Estes resultados não estão de acordo com os obtidos num estudo publicado, usando também células BEAS-2B, em que a incubação com 0,1 mM de 2-DG e 1 μ M de Cr(VI) durante 1 h provocou um decréscimo bastante acentuado nos níveis de ATP [73].

Os resultados obtidos no presente trabalho levantam a hipótese de que, na impossibilidade de obter energia a partir da oxidação de glucose, as células passam a obtê-la através da oxidação de moléculas combustíveis alternativas, tal como a glutamina. Infelizmente, o período de monitorização utilizado neste trabalho não foi suficiente para que fosse possível determinar o consumo de glutamina por estas células.

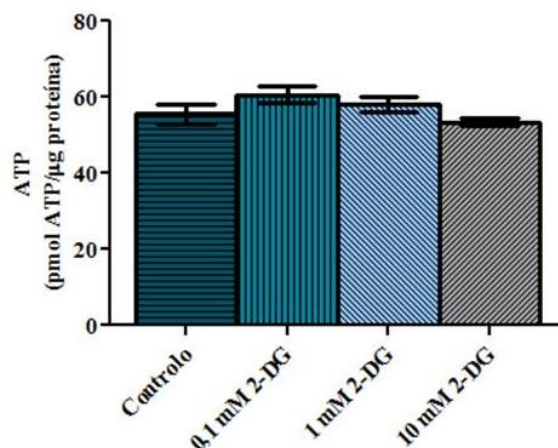


Figura 3.21. Efeito da 2-DG nos níveis intracelulares de ATP de células BEAS-2B expostas a este composto durante 4 h. Para a quantificação de ATP utilizou-se o sistema de RP-HPLC (secção 2.11.1.4.). Os resultados foram normalizados em termos de proteína total determinada recorrendo ao método de Bradford (secção 2.11.2.). Os resultados apresentados correspondem à média \pm S.D. de três experiências independentes, utilizando para todas elas tetraplicados de culturas para cada condição analisada. Os dados foram estatisticamente tratados no programa *GraphPad Prism 5.00*, utilizando o método *one-way ANOVA*, seguido do teste de comparações múltiplas *Dunnett*. Não se observaram diferenças estatisticamente significativas.

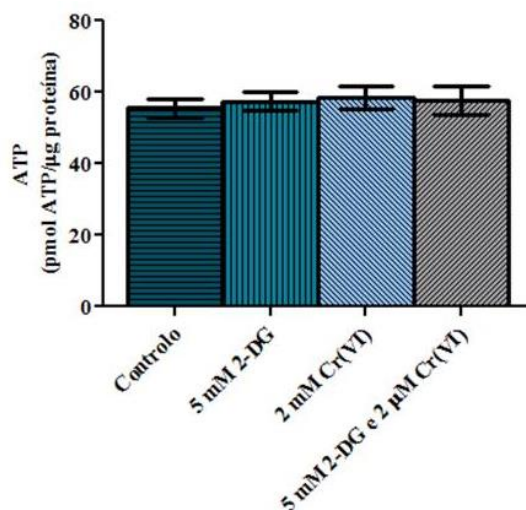


Figura 3.22. Efeito do Cr(VI) nos níveis intracelulares de ATP em células BEAS-2B expostas a este ião sob condições basais e condições em que a glicólise foi inibida. Para a quantificação de ATP utilizou-se o sistema de RP-HPLC (secção 2.11.1.4.). Os resultados foram normalizados em termos de proteína total determinada recorrendo ao método de Bradford (secção 2.11.2.). Os resultados apresentados correspondem à média \pm S.D. de três experiências independentes, utilizando para todas elas tetraplicados de culturas para cada condição analisada. Os dados foram estatisticamente tratados no programa *GraphPad Prism 5.00*, utilizando o método *one-way ANOVA*, seguido do teste de comparações múltiplas *Bonferroni*. Não se observaram diferenças estatisticamente significativas.

3.2.4. Impacto de uma exposição de longa duração a Cr(VI) no consumo de glucose

Tendo os resultados por nós obtidos sugerido que culturas expostas durante 48 h a Cr(VI) são mais dependentes da fermentação láctica do que as células normais das quais derivaram (secção 3.2.2.), optou-se por verificar se este impacto seria intensificado por exposições mais longas. O impacto de uma exposição de longa duração a 0,1 e 2 μM de Cr(VI) no consumo de glucose por células da linha celular BEAS-2B está sumariado na Figura 3.23. Este consumo foi monitorizado ao longo de seis passagens.

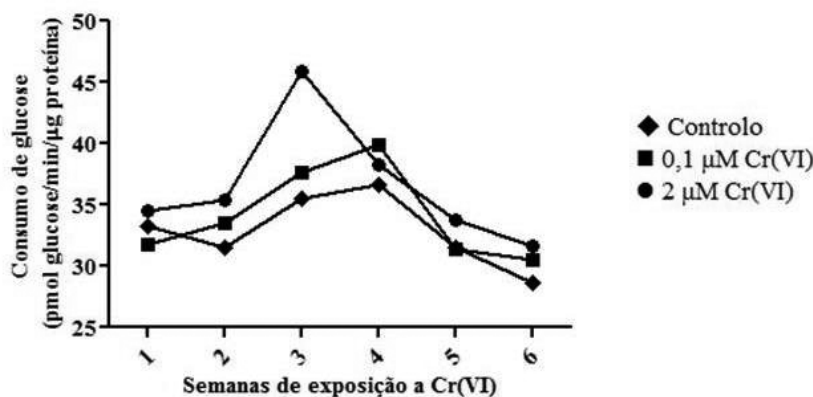


Figura 3.23. Efeito do Cr(VI) no consumo de glucose por culturas de células BEAS-2B expostas a este ião ao longo de seis passagens. Para a quantificação de glucose no meio de cultura utilizou-se o *kit* Glucose RTU (secção 2.11.1.1.). Os resultados foram normalizados em termos de proteína total recorrendo ao método de Bradford (secção 2.11.2.). Os resultados apresentados correspondem à média \pm S.D. de tetraplicados de culturas.

Ambas as concentrações testadas provocaram um efeito estimulatório no consumo de glucose, embora este estímulo não tenha sido visível na primeira passagem analisada para a concentração de 0,1 μM de Cr(VI) (Figura 3.23.). Já nas células expostas a 2 μM de Cr(VI), este efeito foi evidente desde a primeira passagem analisada (cerca de 4%) e ao longo de todo o tempo de exposição (Figura 3.23.). Este efeito não foi, no entanto, intensificado com o aumento do tempo de exposição a Cr(VI), tendo-se observado uma estimulação média de cerca de 11%.

Estes resultados estão de acordo com os obtidos noutra estudo, realizado no nosso laboratório, com a mesma linha celular, no qual as culturas foram incubadas com 0,1 e 1 μM de Cr(VI) também ao longo de seis passagens. Neste último estudo verificou-se também um efeito estimulatório no consumo de glucose dependente da concentração [72]. Ao contrário do obtido neste trabalho, este efeito foi intensificado pelo aumento do tempo de exposição a Cr(VI) para a concentração de 0,1 μM .

3.2.5. Impacto de uma exposição de longa duração a Cr(VI) no estado energético celular

As culturas utilizadas para determinação do efeito de uma exposição de longa duração a Cr(VI) no consumo de glucose foram também utilizadas para determinar o efeito deste ião no seu estado energético celular, especificamente na sua EC e nos seus níveis intracelulares de nucleótidos de adenina. À semelhança dos resultados obtidos neste trabalho para exposições de curta duração a Cr(VI) (secção 3.2.3.), observou-se que, para uma exposição de longa duração a este ião, a EC também não foi afectada por nenhuma das concentrações utilizadas (Figura 3.24.), apesar das diferenças observadas ao nível do consumo de glucose (secção 3.2.4.). Estes resultados não estão de acordo com os obtidos em estudos anteriores, já referidos na secção 3.2.3., nos quais se observou um decréscimo da EC em células expostas a Cr(VI) [66, 74, 76, 86]. Num destes estudos, realizado no nosso laboratório, usando também células BEAS-2B incubadas com 0,1 e 1 μM de Cr(VI) ao longo de seis passagens, observou-se o mesmo impacto na EC [72].

Os níveis intracelulares de ATP sofreram um decréscimo médio de cerca de 11% nas culturas expostas a 2 μM de Cr(VI). Este efeito é visível imediatamente na primeira passagem analisada com um decréscimo de cerca de 7% relativamente às culturas controlo. Já nas culturas expostas a 0,1 μM de Cr(VI), ocorreu uma variação aleatória dos níveis intracelulares de ATP (Figura 3.25.) ao longo do tempo de exposição.

Relativamente aos níveis intracelulares de ADP e AMP, observou-se, geralmente, em todas as passagens analisadas, um decréscimo, muito ténue, para ambas as concentrações de Cr(VI) utilizadas (Figura 3.26. e 3.27.).

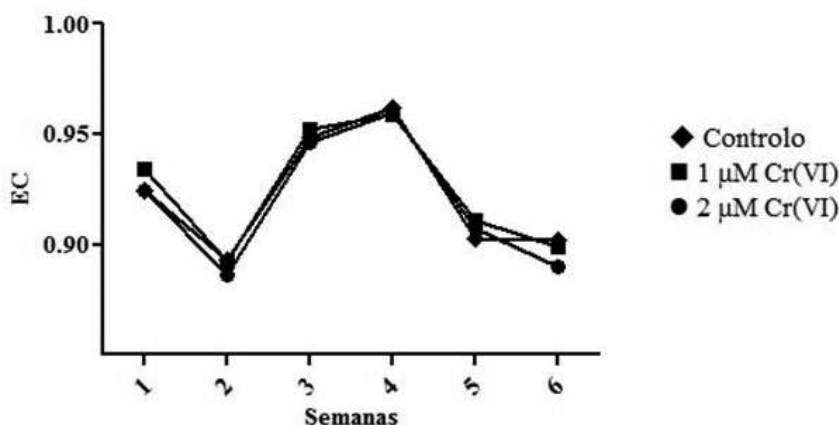


Figura 3.24. Efeito do Cr(VI) na carga energética de culturas de células BEAS-2B expostas a este ião ao longo de seis passagens. A carga energética foi calculada de acordo com a equação de Atkinson (equação 1.2). Os resultados foram normalizados em termos de proteína total recorrendo ao método de Bradford (secção 2.11.2.). Os resultados apresentados correspondem à média \pm S.D. de tetraplicados de culturas.

De acordo com estudos anteriores, já referidos na secção 3.2.3., existe tendência para que nas culturas expostas a Cr(VI) os níveis intracelulares de ATP diminuam, e os níveis intracelulares de ADP e de AMP aumentem relativamente aos das culturas controlo. Porém, nestes estudos, o modelo e regime de exposição são diferentes dos usados neste trabalho [74, 76, 79, 83, 85-88, 135], o que dificulta a comparação dos resultados. Apenas em dois destes estudos foram também utilizadas células BEAS-2B [72, 73], tendo-se verificado o mesmo impacto nos parâmetros referidos.

No presente trabalho, não se verificou um aumento dos níveis intracelulares de ADP e AMP nas células expostas a Cr(VI). Os resultados obtidos neste estudo mostraram que, apesar dos níveis intracelulares de ATP sofrerem um decréscimo, as células expostas a este ião conseguem manter a sua EC inalterada. Além disso, verificou-se que estas alterações não são intensificadas pelo aumento do tempo de exposição a Cr(VI).

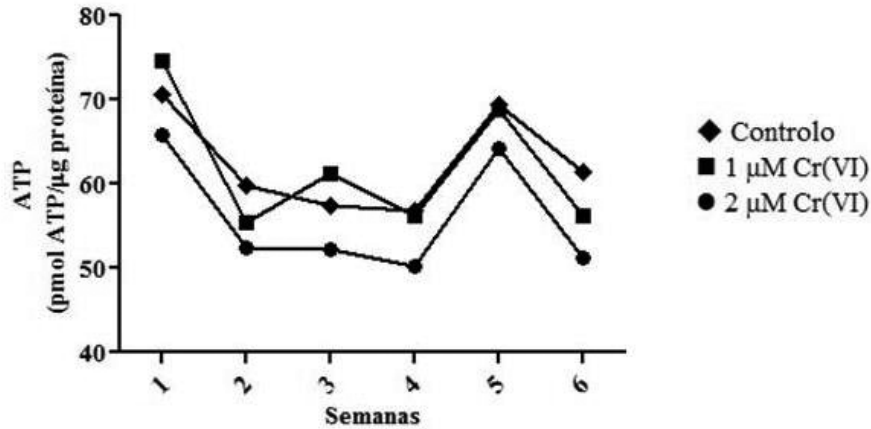


Figura 3.25. Efeito do Cr(VI) nos níveis intracelulares de ATP de culturas de células BEAS-2B expostas a este ião ao longo de seis passagens. Para a quantificação de ATP utilizou-se o sistema de RP-HPLC (secção 2.11.1.4.). Os resultados foram normalizados em termos de proteína total recorrendo ao método de Bradford (secção 2.11.2.). Os resultados apresentados correspondem à média \pm S.D. de tetraplicados de culturas.

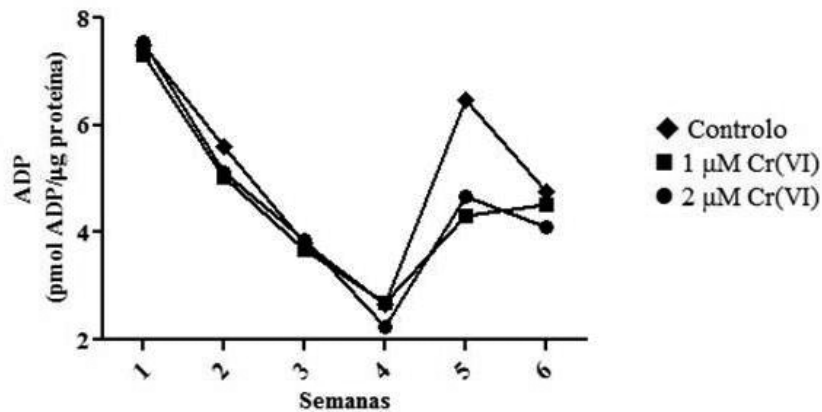


Figura 3.26. Efeito do Cr(VI) nos níveis intracelulares de ADP de culturas de células BEAS-2B expostas a este ião ao longo de seis passagens. Para a quantificação de ADP utilizou-se o sistema de RP-HPLC (secção 2.11.1.4.). Os resultados foram normalizados em termos de proteína total recorrendo ao método de Bradford (secção 2.11.2.). Os resultados apresentados correspondem à média \pm S.D. de tetraplicados de culturas.

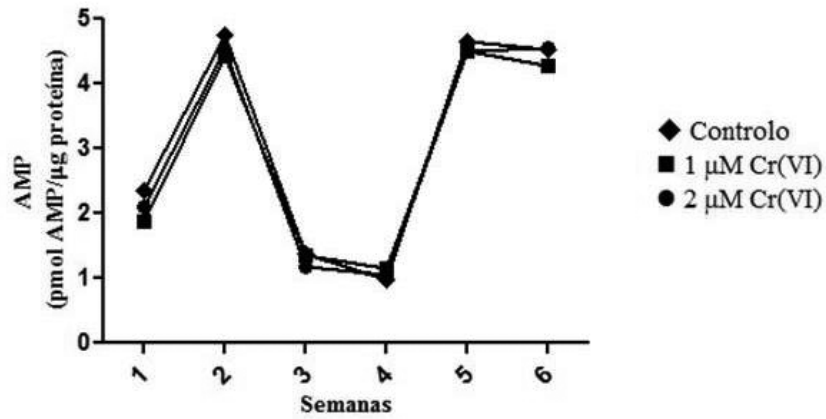


Figura 3.27. Efeito do Cr(VI) nos níveis intracelulares de AMP de culturas de células BEAS-2B expostas a este ião ao longo de seis passagens. Para a quantificação de AMP utilizou-se o sistema de RP-HPLC (secção 2.11.1.4.). Os resultados foram normalizados em termos de proteína total recorrendo ao método de Bradford (secção 2.11.2.). Os resultados apresentados correspondem à média \pm S.D. de tetraplicados de culturas.

4. Conclusões e perspectivas futuras

A descoberta da ocorrência de uma reprogramação do metabolismo bioenergético durante o processo carcinogénico abriu um leque de possibilidades relativamente ao diagnóstico e desenvolvimento de novas terapias. Apesar dos vários esforços feitos no sentido de verificar se esta alteração se observa em células expostas a Cr(VI), um reconhecido agente cancerígeno pulmonar, os resultados obtidos ainda não são conclusivos. No sentido de complementar, ainda que parcialmente, a informação já reunida, estudámos o efeito do Cr(VI) no metabolismo energético de um modelo experimental do seu principal alvo *in vivo*, i.e., uma linha celular de células do epitélio brônquico humano.

A linha celular utilizada foi a BEAS-2B, uma linha estabelecida a partir de células normais do epitélio brônquico humano que, embora, tenha sido transformada com um vírus híbrido [106], retém a maioria das características das células NHBE (secção 1.4.1.2.).

Apesar das células BEAS-2B necessitarem de crescer sobre uma superfície revestida com componentes da matriz extracelular, o tempo de duplicação destas não foi alterado quando crescidas sobre superfícies não revestidas. Pelo contrário, a morfologia foi visivelmente alterada. Alterações morfológicas foram também observadas entre culturas em passagens significativamente diferentes. Especificamente, com o aumento da idade de cultura as células perderam a sua típica forma de diamante, tornaram-se maiores e o *crisscrossing* tornou-se mais frequente. Verificou-se ainda que culturas de passagem mais elevada têm uma taxa de crescimento superior às de passagem mais baixa, mas em termos do consumo de glucose e da produção de lactato não se verificaram alterações.

Este estudo demonstrou que a exposição a concentrações pouco citotóxicas de Cr(VI) provoca alterações em alguns parâmetros do metabolismo energético de células BEAS-2B, especificamente, no consumo de glucose, na produção de lactato e nos níveis de ATP. Pelo contrário, a carga energética e os níveis de ADP e AMP não foram afectados significativamente pela exposição a este ião.

A exposição a Cr(VI) na presença de um inibidor da glicólise, a 2-DG, provocou um decréscimo acentuado na produção de lactato, mas os níveis de ATP permaneceram inalterados. Estes resultados levantam a hipótese de que, quando impedidas de metabolizar glucose, as células expostas a Cr(VI) passem a obter uma maior fracção de energia da metabolização de moléculas combustíveis alternativas, como por exemplo a glutamina. Este aspecto deverá ser estudado em futuros trabalhos de modo a

compreender o modo pelo qual as células mantêm os seus níveis intracelulares de ATP inalterados na presença de um inibidor da glicólise.

É fundamental a realização de mais estudos para estabelecer definitivamente as alterações metabólicas promovidas pela exposição a Cr(VI). Para este fim, a utilização de modelos relevantes e concentrações pouco citotóxicas, tal como neste trabalho, é essencial. Para complementar os resultados obtidos neste e em outros estudos anteriores, deverão ser avaliados outros parâmetros bioenergéticos tais como o consumo de oxigénio e de glutamina, usando um regime de exposição a Cr(VI) e modelo semelhantes aos usados no presente trabalho. Apenas com os resultados de todos estes estudos poderá vir a ser possível obter uma melhor compreensão do papel do metabolismo energético na carcinogénese induzida pelo Cr(VI).

Referências bibliográficas

1. *Bioenergetics: Bioelectrochemistry, Principles and Practice*. 1997, Birkhäuser, Boston.
2. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3º ed 2000, Worth Publishers, Nova Iorque.
3. Purves, W.K., *Life, The Science of Biology*. 6º ed 2001, Sinauer Associates, Sunderland.
4. Blaxter, K.L., *Energy Metabolism in Animals and Man*. 1989, Cambridge University Press, Nova Iorque.
5. *Molecular System Bioenergetics: Energy for Life*. 2007, Wiley-VCH, Weinheim.
6. Lodish, H.F., *Molecular Cell Biology*. 5º ed 2003, W.H. Freeman and Company, Nova Iorque.
7. Mates, J.M., Segura, J.A., Campos-Sandoval, J.A., *et al.*, *Glutamine homeostasis and mitochondrial dynamics*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009. **41**: p. 2051-61.
8. Lacey, J.M. e Wilmore, D.W., *Is glutamine a conditionally essential amino acid?* *Nutr Rev*, 1990. **48**: p. 297-309.
9. Berg, J.M., Tymoczko, J.L. e Stryer, L., *Biochemistry*. 5º ed 2002, W.H. Freeman and Company, Nova Iorque.
10. American Diabetes Association, *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. *Diabetes Care*, 2008. **31**: p. 55-60.
11. Phipers, B., Pierce, T., *Lactate physiology in health and disease*. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care and Pain*, 2006. **6**: p. 128-132.
12. Genzel, Y., Ritter, J.B., König, S., *et al.*, *Substitution of glutamine by pyruvate to reduce ammonia formation and growth inhibition of mammalian cells*. *Biotechnol Prog*, 2005. **21**: p. 58-69.
13. Atkinson, D.E., *The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers*. *Biochemistry*, 1968. **7**: p. 4030-4.
14. Atkinson, D.E., *Cellular Energy Metabolism and its Regulation*. 1977, Academic Press, Nova Iorque.
15. Hynes, J., Marroquin, L.D., Ogurtsov, V.I., *et al*, *Investigation of drug-induced mitochondrial toxicity using fluorescence-based oxygen-sensitive probes*. *Toxicological Sciences*, 2006. **92**: p. 186-200.

16. Li, Z., e Graham, B.H., *Measurement of mitochondrial oxygen consumption using a clark electrode*. Methods in Molecular Biology, 2012. **837**: p. 63-72.
17. Torre, L.A., Bray, F., Siegel, R.L., *et al.*, *Global cancer statistics, 2012*. Cancer J Clin, 2015. **65**: p. 87-108.
18. Hanahan, D. e Weinberg, R.A., *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**: p. 57-70.
19. Hanahan, D. e Weinberg, R.A., *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**: p. 646-74.
20. Warburg, O.H., *The metabolism of tumours*. 1931, R. R. Smith, Nova Iorque.
21. Cairns, R.A., Harris, I.S. e Mak, T.W., *Regulation of cancer cell metabolism*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**: p. 85-95.
22. Fletcher, J.W., Djulbegovic, B., Soares, H.P., *et al.*, *Recommendations on the use of 18F-FDG PET in oncology*. J Nucl Med, 2008. **49**: p. 480-508.
23. DeBerardinis, R.J. e Cheng, T., *Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer*. Oncogene, 2010. **29**: p. 313-24.
24. Eagle, H., *Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture*. Science, 1955. **122**: p. 501-14.
25. DeBerardinis, R.J., Mancuso, A., Daikhin, E., *et al.*, *Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**: p. 19345-50.
26. Curi, R., Newsholme, P. e Newsholme, E.A., *Metabolism of pyruvate by isolated rat mesenteric lymphocytes, lymphocyte mitochondria and isolated mouse macrophages*. Biochem J, 1988. **250**: p. 383-8.
27. DeBerardinis, R.J., Lum, J.J., Hatzivassiliou, G., *et al.*, *The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation*. Cell Metab, 2008. **7**: p. 11-20.
28. Le, A., Lane, A.N., Hamaker, M., *et al.*, *Glucose-independent glutamine metabolism via TCA cycling for proliferation and survival in B cells*. Cell Metab, 2012. **15**: p. 110-21.
29. Hsu, P.P. e Sabatini, D.M., *Cancer cell metabolism: Warburg and beyond*. Cell, 2008. **134**: p. 703-7.

30. Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C. e Thompson, C.B., *Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation*. Science, 2009. **324**: p. 1029-33.
31. Bensaad, K., Tsuruta, A., Selak, M.A., *et al.*, *TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis*. Cell, 2006. **126**: p. 107-20.
32. Semenza, G.L., *Regulation of metabolism by hypoxia-inducible factor 1*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2011. **76**: p. 347-53.
33. Gordan, J.D., Thompson, C.B. e Simon, M.C., *HIF and c-Myc: sibling rivals for control of cancer cell metabolism and proliferation*. Cancer Cell, 2007. **12**: p. 108-13.
34. Dang, C.V., *MYC on the path to cancer*. Cell, 2012. **149**: p. 22-35.
35. Lin, C.Y., Loven, J., Rahl, P.B., *et al.*, *Transcriptional amplification in tumor cells with elevated c-Myc*. Cell, 2012. **151**: p. 56-67.
36. Hu, S., Balakrishnan, A., Bok, R.A., *et al.*, *¹³C-pyruvate imaging reveals alterations in glycolysis that precede c-Myc-induced tumor formation and regression*. Cell Metab, 2011. **14**: p. 131-42.
37. Dang, C.V. e Semenza, G.L., *Oncogenic alterations of metabolism*. Trends Biochem Sci, 1999. **24**: p. 68-72.
38. Elstrom, R.L., Bauer, D.E., Buzzai, M., *et al.*, *Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells*. Cancer Res, 2004. **64**: p. 3892-9.
39. Nicholson, K.M. e Anderson, N.G., *The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy*. Cell Signal, 2002. **14**: p. 381-95.
40. Lane, D.P., *Cancer. p53, guardian of the genome*. Nature, 1992. **358**: p. 15-6.
41. Feng, Z. e Levine, A.J., *The regulation of energy metabolism and the IGF-1/mTOR pathways by the p53 protein*. Trends Cell Biol, 2010. **20**: p. 427-34.
42. Matoba, S., Kang, J.G., Patino, W.D., *et al.*, *p53 regulates mitochondrial respiration*. Science, 2006. **312**: p. 1650-3.
43. Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., *et al.*, *p53 mutations in human cancers*. Science, 1991. **253**: p. 49-53.
44. Kawauchi, K., Araki, K., Tobiume, K., *et al.*, *p53 regulates glucose metabolism through an IKK-NF-kappaB pathway and inhibits cell transformation*. Nat Cell Biol, 2008. **10**: p. 611-8.
45. Semenza, G.L., *Targeting HIF-1 for cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**: p. 721-32.

46. Gordan, J.D. e Simon, M.C., *Hypoxia-inducible factors: central regulators of the tumor phenotype*. Curr Opin Genet Dev, 2007. **17**: p. 71-7.
47. Semenza, G.L., *HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism*. Curr Opin Genet Dev, 2010. **20**: p. 51-6.
48. Kim, J.W., Gao, P. e Dang, C.V., *Effects of hypoxia on tumor metabolism*. Cancer Metastasis Rev, 2007. **26**: p. 291-8.
49. Kim, J.W., Gao, P., Liu, Y.C., *et al.*, *Hypoxia-inducible factor 1 and dysregulated c-Myc cooperatively induce vascular endothelial growth factor and metabolic switches hexokinase 2 and pyruvate dehydrogenase kinase 1*. Mol Cell Biol, 2007. **27**: p. 7381-93.
50. Wistuba, I.I. e Gazdar, A.F., *Lung cancer preneoplasia*. Annu Rev Pathol, 2006. **1**: p. 331-48.
51. *Chromium, nickel and welding*. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, 1990. **49**: p. 1-648.
52. NTP (National Toxicology Program), *Chromium hexavalent compounds*. Report on Carcinogens, 12^o ed, 2011. **12**: p. 106-109.
53. Urbano, A.M., Ferreira, L.M. e Alpoim, M.C., *Molecular and cellular mechanisms of hexavalent chromium-induced lung cancer: an updated perspective*. Curr Drug Metab, 2012. **13**: p. 284-305.
54. Costa, M. e Klein, C.B., *Toxicity and carcinogenicity of chromium compounds in humans*. Crit Rev Toxicol, 2006. **36**: p. 155-63.
55. Barceloux, D.G., *Chromium*. J Toxicol Clin Toxicol, 1999. **37**: p. 173-94.
56. Baruthio, F., *Toxic effects of chromium and its compounds*. Biol Trace Elem Res, 1992. **32**: p. 145-53.
57. Newman, D., *A case of adeno-carcinoma of the left inferior turbinated body, and perforation of the nasal septum, in the person of a worker in chrome pigments*. Glasgow Medical Journal, 1890. **33**: p. 469-470.
58. Machle, W. e Gregorius, F., *Cancer of the respiratory system in the United States chromate producing industry*. Public Health Rep, 1948. **63**: p. 1114-27.
59. Langard, S., *Role of chemical species and exposure characteristics in cancer among persons occupationally exposed to chromium compounds*. Scand J Work Environ Health, 1993. **19**: p. 81-89.

60. Langard, S., *One hundred years of chromium and cancer: a review of epidemiological evidence and selected case reports*. Am J Ind Med, 1990. **17**: p. 189-215.
61. Witt, K.L., Stout, M.D., Herbert, R.A., *et al.*, *Mechanistic insights from the NTP studies of chromium*. Toxicol Pathol, 2013. **41**: p. 326-42.
62. Axelsson, G., Rylander, R. e Schmidt, A., *Mortality and incidence of tumours among ferrochromium workers*. Br J Ind Med, 1980. **37**: p. 121-7.
63. Kotas, J. e Stasicka, Z., *Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation*. Environ Pollut, 2000. **107**: p. 263-83.
64. Cohen, M.D., Kargacin, B., Klein, C.B., *et al.*, *Mechanisms of chromium carcinogenicity and toxicity*. Crit Rev Toxicol, 1993. **23**: p. 255-81.
65. Dayan, A.D. e Paine, A.J., *Mechanisms of chromium toxicity, carcinogenicity and allergenicity: review of the literature from 1985 to 2000*. Hum Exp Toxicol, 2001. **20**: p. 439-51.
66. Goncalves M.J., Santos, A.C.C., Rodrigues, C.F.D., Coelho, P., Costa, A.N., Guiomar, A.J., Santos, M.S., Alpoim, M.C., Urbano, A.M., *Changes in glucose uptake rate and in the energy status of PC-12 cells acutely exposed to hexavalent chromium, an established human carcinogen*. Toxicol Environ Chem, 2011. **93**: p. 1202-1211.
67. Urbano, A.M., Rodrigues, C.F.D., Alpoim, M.C., *Hexavalent chromium exposure, genomic instability and lung cancer*. Gene Ther Mol Biol, 2008. **12**: p. 219-238.
68. Aitio, A., Jarvisalo, J., Kiilunen, M., *et al.*, *Urinary excretion of chromium as an indicator of exposure to trivalent chromium sulphate in leather tanning*. Int Arch Occup Environ Health, 1984. **54**: p. 241-9.
69. Ishikawa, Y., Nakagawa, K., Satoh, Y., *et al.*, *"Hot spots" of chromium accumulation at bifurcations of chromate workers' bronchi*. Cancer Res, 1994. **54**: p. 2342-6.
70. Ishikawa, Y., Nakagawa, K., Satoh, Y., *et al.*, *Characteristics of chromate workers' cancers, chromium lung deposition and precancerous bronchial lesions: an autopsy study*. Br J Cancer, 1994. **70**: p. 160-6.
71. Abreu, P.L., Ferreira, L.M., Alpoim, M.C., *et al.*, *Impact of hexavalent chromium on mammalian cell bioenergetics: phenotypic changes, molecular*

- basis and potential relevance to chromate-induced lung cancer. Biometals, 2014. 27: p. 409-43.*
72. Ferreira, L.M.R., Santos, M.S., Alpoim, M.C., Urbano, A.M., *Metabolic changes in human bronchial epithelial cells upon chronic exposure to hexavalent chromium. Acta Med Port Suppl., 2012. 24: P45.*
73. Cerveira, J.F., Sanchez-Arago, M., Urbano, A.M., *et al., Short-term exposure of nontumorigenic human bronchial epithelial cells to carcinogenic chromium(VI) compromises their respiratory capacity and alters their bioenergetic signature. FEBS Open Bio, 2014. 4: p. 594-601.*
74. Andreoli, T., Dal Degan, B., De Angelis, I., *et al., Evaluation of metabolic endpoints of acute cytotoxicity in V79 fibroblasts. Toxicol In Vitro, 1991. 5: p. 549-53.*
75. Fernandes, M.A., Santos, M.S., Alpoim, M.C., *et al., Chromium(VI) interaction with plant and animal mitochondrial bioenergetics: a comparative study. J Biochem Mol Toxicol, 2002. 16: p. 53-63.*
76. Lazzarini, A., Luciani, S., Beltrame, M., *et al., Effects of chromium(VI) and chromium(III) on energy charge and oxygen consumption in rat thymocytes. Chem Biol Interact, 1985. 53: p. 273-81.*
77. Liu, W., Chaspoul, F., Botta, C., *et al., Bioenergetics and DNA alteration of normal human fibroblasts by hexavalent chromium. Environ Toxicol Pharmacol, 2010. 29: p. 58-63.*
78. Messer, R.L., Doeller, J.E., Kraus, D.W., *et al., An investigation of fibroblast mitochondria enzyme activity and respiration in response to metallic ions released from dental alloys. J Biomed Mater Res, 2000. 50: p. 598-604.*
79. Messer, R.L. eLucas, L.C., *Evaluations of metabolic activities as biocompatibility tools: a study of individual ions' effects on fibroblasts. Dent Mater, 1999. 15: p. 1-6.*
80. Molina-Jijon, E., Tapia, E., Zazueta, C., *et al., Curcumin prevents Cr(VI)-induced renal oxidant damage by a mitochondrial pathway. Free Radic Biol Med, 2011. 51: p. 1543-57.*
81. Ryberg, D. e Alexander, J., *Mechanisms of chromium toxicity in mitochondria. Chem Biol Interact, 1990. 75: p. 141-51.*

82. Ryberg, D. e Alexander, J., *Inhibitory action of hexavalent chromium (Cr(VI)) on the mitochondrial respiration and a possible coupling to the reduction of Cr(VI)*. *Biochem Pharmacol*, 1984. **33**: p. 2461-6.
83. Xiao, F., Feng, X., Zeng, M., *et al.*, *Hexavalent chromium induces energy metabolism disturbance and p53-dependent cell cycle arrest via reactive oxygen species in L-02 hepatocytes*. *Mol Cell Biochem*, 2012. **371**: p. 65-76.
84. Afolaranmi, G.A., Henderson, C. e Grant, M.H., *Effect of chromium and cobalt ions on phase I and phase II enzymatic activities in vitro in freshly isolated rat hepatocytes*. *Toxicol In Vitro*, 2011. **25**: p. 125-30.
85. Bianchi, V., Dal Toso, R., Debetto, P., *et al.*, *Mechanisms of chromium toxicity in mammalian cell cultures*. *Toxicology*, 1980. **17**: p. 219-24.
86. Bianchi, V., Debetto, P., Zantedeschi, A., *et al.*, *Effects of hexavalent chromium on the adenylate pool of hamster fibroblasts*. *Toxicology*, 1982. **25**: p. 19-30.
87. Debetto, P., Dal Toso, R., Varotto, R., *et al.*, *Effects of potassium dichromate on ATP content of mammalian cells cultured in vitro*. *Chem Biol Interact*, 1982. **41**: p. 15-24.
88. Yuan, Y., Ming, Z., Gong-Hua, H., *et al.*, *Cr(VI) induces the decrease of ATP level and the increase of apoptosis rate mediated by ROS or VDAC1 in L-02 hepatocytes*. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2012. **34**: p. 579-87.
89. Bernstein, J.E., *Ethical considerations in human experimentation*. *J Clin Pharmacol*, 1975. **15**: p. 579-90.
90. Stan, A.D., Ghose, S., Gao, X.M., *et al.*, *Human postmortem tissue: what quality markers matter?* *Brain Res*, 2006. **1123**: p. 1-11.
91. Casarett, L.J., Klaassen, C.D. e Watkins, J.B., *Casarett and Doull's Essentials of Toxicology*. 2003, McGraw-Hill/Medical Pub, Nova Iorque.
92. Johnson, P.D. e Besselsen, D.G., *Practical aspects of experimental design in animal research*. *ILAR J*, 2002. **43**: p. 202-6.
93. Harrison, R.G., *The outgrowth of the nerve fiber as a mode of protoplasmic movement*. *J Exp Zool*, 1959. **142**: p. 5-73.
94. Freshney, R.I., *Culture of Animal Cells : A Manual of Basic Technique*. 5° ed 2005, Wiley-Liss, Hoboken.
95. Carrel, A., *On the permanent life of tissues outside of the organism*. *J Exp Med*, 1912. **15**: p. 516-28.

96. Lucey, B.P., Nelson-Rees, W.A. e Hutchins, G.M., *Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination*. Arch Pathol Lab Med, 2009. **133**: p. 1463-7.
97. Hayflick, L. e Moorhead, P.S., *The serial cultivation of human diploid cell strains*. Exp Cell Res, 1961. **25**: p. 585-621.
98. Shay, J.W. e Wright, W.E., *Hayflick, his limit, and cellular ageing*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2000. **1**: p. 72-6.
99. Olovnikov, A.M., *Telomeres, telomerase, and aging: origin of the theory*. Exp Gerontol, 1996. **31**: p. 443-8.
100. Blasco, M.A., *Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond*. Nat Rev Genet, 2005. **6**: p. 611-22.
101. Bodnar, A.G., Ouellette, M., Frolkis, M., *et al.*, *Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells*. Science, 1998. **279**: p. 349-52.
102. Sinha, B., Kumar, R., *Principles of Animal Cell Culture*. 2008, International Book Distributing Co, Bihar.
103. Lewis M.R., Lewis, W.H., *The cultivation of tissues from chick embryos in solutions of NaCl, CaCl₂, KCl and NaHCO₃*. The Anatomical Record, 1911. **5**.
104. Eagle, H., *The specific amino acid requirements of a mammalian cell (strain L) in tissue culture*. J Biol Chem, 1955. **214**: p. 839-52.
105. Ham, R.G., *Clonal Growth of Mammalian Cells in a Chemically Defined, Synthetic Medium*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1965. **53**: p. 288-93.
106. Reddel, R.R., Ke, Y., Gerwin, B.I., *et al.*, *Transformation of human bronchial epithelial cells by infection with SV40 or adenovirus-12 SV40 hybrid virus, or transfection via strontium phosphate coprecipitation with a plasmid containing SV40 early region genes*. Cancer Res, 1988. **48**: p. 1904-9.
107. Reddel, R.R., Salghetti, S.E., Willey, J.C., *et al.*, *Development of tumorigenicity in simian virus 40-immortalized human bronchial epithelial cell lines*. Cancer Res, 1993. **53**: p. 985-91.
108. Wise, S.S., Elmore, L.W., Holt, S.E., *et al.*, *Telomerase-mediated lifespan extension of human bronchial cells does not affect hexavalent chromium-induced cytotoxicity or genotoxicity*. Mol Cell Biochem, 2004. **255**: p. 103-11.
109. Adamou, J.E., Wizemann, T.M., Barren, P., *et al.*, *Adherence of Streptococcus pneumoniae to human bronchial epithelial cells (BEAS-2B)*. Infect Immun, 1998. **66**: p. 820-2.

110. Diabate, S., Mulhopt, S., Paur, H.R., *et al.*, *In vitro effects of incinerator fly ash on pulmonary macrophages and epithelial cells*. Int J Hyg Environ Health, 2002. **204**: p. 323-6.
111. Brash, D.E., Reddel, R.R., Quanrud, M., *et al.*, *Strontium phosphate transfection of human cells in primary culture: stable expression of the simian virus 40 large-T-antigen gene in primary human bronchial epithelial cells*. Mol Cell Biol, 1987. **7**: p. 2031-4.
112. Poulin, D.L. e DeCaprio, J.A., *Is there a role for SV40 in human cancer?* J Clin Oncol, 2006. **24**: p. 4356-65.
113. Shein, H.M. e Enders, J.F., *Transformation induced by simian virus 40 in human renal cell cultures. I. Morphology and growth characteristics*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1962. **48**: p. 1164-72.
114. Dannenberg, J.H. e Riele, H.P., *The retinoblastoma gene family in cell cycle regulation and suppression of tumorigenesis*. Results Probl Cell Differ, 2006. **42**: p. 183-225.
115. Ross, M.H. e Pawlina, W., *Histology : A Text and Atlas (with correlated cell and molecular biology)*. 6° ed 2011, Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health, Filadélfia.
116. Rodrigues, C.F., Urbano, A.M., Matoso, E., *et al.*, *Human bronchial epithelial cells malignantly transformed by hexavalent chromium exhibit an aneuploid phenotype but no microsatellite instability*. Mutat Res, 2009. **670**: p. 42-52.
117. Ohnuki, Y., Reddel, R.R., Bates, S.E., *et al.*, *Chromosomal changes and progressive tumorigenesis of human bronchial epithelial cell lines*. Cancer Genet Cytogenet, 1996. **92**: p. 99-110.
118. ECACC, *BEAS-2B*. https://www.culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=95102433&collection=ecacc_gc
119. Harrison, M.A., *Cryopreservation of Cells*. Encyclopedia of Life Sciences, 2001.
120. Pappas, D., *Practical Cell Analysis*. 2010, Wiley-Liss, Hoboken.
121. Langdon, S.P., *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*. 2004, Humana Press, Totowa.
122. *Current Protocols in Immunology*, 2012, John Wiley and Sons, Nova Iorque.

123. Coolen, E.J., Arts, I.C., Swennen, E.L., *et al.*, *Simultaneous determination of adenosine triphosphate and its metabolites in human whole blood by RP-HPLC and UV-detection*. J Chromatogr B, 2008. **864**: p. 43-51.
124. Fallon, A., Booth, R.F.G. e Bell, L.D., *Applications of HPLC in Biochemistry*. 1987, Elsevier.
125. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
126. Cay, O., Radnell, M., Jeppsson, B., *et al.*, *Inhibitory effect of 2-deoxy-D-glucose on liver tumor growth in rats*. Cancer Res, 1992. **52**: p. 5794-6.
127. Dwarkanath, B.S., Zolzer, F., Chandana, S., *et al.*, *Heterogeneity in 2-deoxy-D-glucose-induced modifications in energetics and radiation responses of human tumor cell lines*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2001. **50**: p. 1051-61.
128. Hernlund, E., Ihlund, L.S., Khan, O., *et al.*, *Potential of chemotherapeutic drugs by energy metabolism inhibitors 2-deoxyglucose and etomoxir*. Int J Cancer, 2008. **123**: p. 476-83.
129. Kang, H.T. e Hwang, E.S., *2-Deoxyglucose: an anticancer and antiviral therapeutic, but not any more a low glucose mimetic*. Life Sci, 2006. **78**: p. 1392-9.
130. Wick, A.N., Drury, D.R., Nakada, H.I., *et al.*, *Localization of the primary metabolic block produced by 2-deoxyglucose*. J Biol Chem, 1957. **224**: p. 963-9.
131. Tower, D.B., *The effects of 2-deoxy-D-glucose on metabolism of slices of cerebral cortex incubated in vitro*. J Neurochem, 1958. **3**: p. 185-205.
132. Horton, R.W., Meldrum, B.S. e Bachelard, H.S., *Enzymic and cerebral metabolic effects of 2-deoxy-D-glucose*. J Neurochem, 1973. **21**: p. 507-20.
133. Pelicano, H., Martin, D.S., Xu, R.H., *et al.*, *Glycolysis inhibition for anticancer treatment*. Oncogene, 2006. **25**: p. 4633-46.
134. Chen, W. e Gueron, M., *The inhibition of bovine heart hexokinase by 2-deoxy-D-glucose-6-phosphate: characterization by ³¹P NMR and metabolic implications*. Biochimie, 1992. **74**: p. 867-73.
135. Xiao, F., Li, Y., Dai, L., *et al.*, *Hexavalent chromium targets mitochondrial respiratory chain complex I to induce reactive oxygen species-dependent caspase-3 activation in L-02 hepatocytes*. Int J Mol Med, 2012. **30**: p. 629-35.