

ANA PAULA PEREIRA DA SILVA

**MECANISMOS DE AÇÃO DO 3-BROMOPIRUVATO,
UM AGENTE ANTI-TUMORAL, SOBRE O
METABOLISMO ENERGÉTICO DE CÉLULAS
DERIVADAS DE HEPATOCARCINOMA HUMANO**

IBqM/UFRJ

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Mecanismos de ação do 3-bromopiruvato, um
agente anti-tumoral, sobre o metabolismo
energético de células derivadas de
hepatocarcinoma humano**

ANA PAULA PEREIRA DA SILVA

**INSTITUTO DE BIOQUÍMICA MÉDICA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO**

**ORIENTADORES: DR. ANTONIO GALINA FILHO
DRA. ANDREA THOMPSON DA POIAN**

**RIO DE JANEIRO
2008**

Mecanismos de ação do 3-bromopiruvato, um agente anti-tumoral, sobre o metabolismo energético de células derivadas de hepatocarcinoma humano

Ana Paula Pereira da Silva

Tese submetida ao corpo docente do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutora em Ciências Biológicas modalidade Química Biológica.

APROVADA POR:

DR. ANTONIO GALINA FILHO - ORIENTADOR
PROF^o ADJUNTO INSTITUTO DE BIOQUÍMICA MÉDICA/UFRJ

DRA. ANDREA THOMPSON DA POIAN - ORIENTADORA
PROF^a ADJUNTA INSTITUTO DE BIOQUÍMICA MÉDICA/UFRJ

DR. DENISE PIRES DE CARVALHO
PROF^a ADJUNTA INSTITUTO DE BIOFÍSICA/UFRJ

DRA. MARIA AUGUSTA BORGES CURSINO DE FREITAS ARRUDA
PROF^a VISITANTE INSTITUTO DE BIOLOGIA/UERJ

DR. MARCUS FERNANDES DE OLIVEIRA
PROF^o ADJUNTO INSTITUTO DE BIOQUÍMICA MÉDICA/UFRJ

DR. ROBSON QUEIROZ MONTEIRO
PROF^o ADJUNTO INSTITUTO DE BIOQUÍMICA MÉDICA/UFRJ

DR. YRAIMA MOURA LOPES CORDEIRO
PROF^a ADJUNTA FACULDADE DE FARMÁCIA/UFRJ

RIO DE JANEIRO/2008

Ficha Catalográfica

Pereira da Silva, Ana Paula

Mecanismos de ação do 3-bromopiruvato, um agente anti-tumoral, sobre o metabolismo energético de células derivadas de hepatocarcinoma humano / Ana Paula Pereira da Silva. Rio de Janeiro: UFRJ/IBqM, 2008.

xxi, 152 p.: il.

Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, IBqM, 2008. Orientadores: Antonio Galina Filho e Andrea Thompson Da Poian.

1. Metabolismo Energético. 2. 3-bromopiruvato 3. Hepatocarcinoma. 4. I. Galina, A. e Da Poian, A.T. II I. Título.

TRABALHOS DECORRENTES DA PRESENTE TESE

COMPLETO

Pereira da Silva AP; El-Bacha T, Kyaw N, dos-Santos RS, da-Silva WS, Da Poian AT, Galina A. DIFFERENTIAL INHIBITION OF ENERGY-PRODUCING PATHWAYS OF HEPG2 CELLS BY 3-BROMOPYRUVATE. *(submetido)* - ANEXO 1.

RESUMOS

Pereira da Silva AP; El-Bacha T; Da Poian AT; Galina A. DIFFERENTIAL INHIBITION OF ENERGY-PRODUCING PATHWAYS OF HEPG2 CELLS BY 3-BROMOPYRUVATE. *15th European Bioenergetics Conference*, Dublin, Ireland, 2008.

Pereira da Silva AP; El-Bacha T; Da Poian AT; Galina A. DIFFERENTIAL INHIBITION OF ENERGY-PRODUCING PATHWAYS OF HEPG2 CELLS BY 3-BROMOPYRUVATE. *60ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência*, Campinas, 2008.

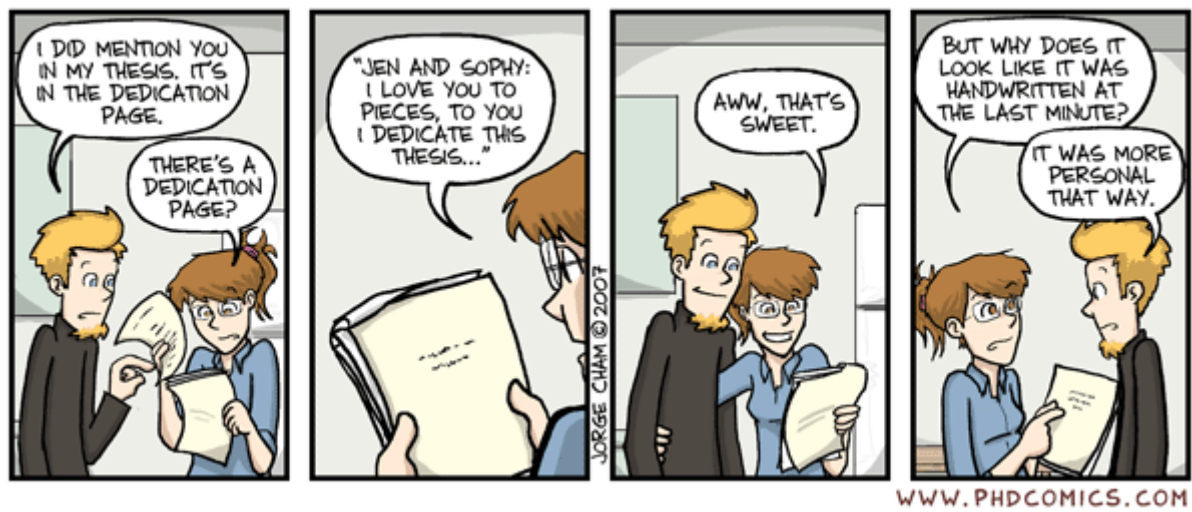
Pereira da Silva AP, Lima BB, El-Bacha T, Kyaw N, Da Poian AT, Galina A. 3-BROMOPYRUVATE: POSSIBLE SITES OF ACTION ON HEPG2 CELLS. *XXXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular*, Salvador, 2007.

Esta tese foi desenvolvida no Laboratório de Bioenergética e Fisiologia Mitocondrial, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob orientação dos professores Antônio Galina e Andrea Thompson Da Poian, com auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

“A vida está cheia de desafios que, se aproveitados de forma criativa, transformam-se em oportunidades.”

Maxwell Maltz

***Dedico este trabalho
àqueles que ousam, que
erram, mas que acima
de tudo acreditam e
realizam....***



AGRADECIMENTOS

Não foi fácil chegar até aqui, mas teria sido muito mais difícil sem a ajuda de vocês....

- ***À minha família***, que me forneceu todo o suporte e apoio necessário até que eu pudesse seguir meu próprio caminho.
- ***Assis***, meu maior amor, amigo e companheiro. Muito obrigada por tudo que você fez por mim até hoje e por fazer parte da minha vida!
- ***Antônio Galina (Tonhão)***, meu orientador querido! Muito obrigada pelo seu brilhantismo, pelo seu entusiasmo, pela sua sinceridade e pelo companheirismo durante este curto, mas intenso período! Você é um exemplo que eu vou guardar para minha vida toda;
- ***Andrea Da Poian***, obrigada pela oportunidade, pelos conselhos certos nos momentos certos e pelo seu senso de praticidade! Obrigada por abrir as portas de seu laboratório para mim e pela compreensão nos momentos difíceis;
- ***Tatiana El-Bacha***, você vai ser sempre um exemplo para todos que te cercam. Devo cada pedacinho deste trabalho a você. Obrigada pela amizade, pelo companheirismo e por ser esta pessoa tão especial!
- ***Tonhão, Andrea e Tati***, vocês me ajudaram quando eu mais precisei. Nunca esquecerei isto e serei eternamente grata a todos vocês!!!
- ***Leandro***, muito obrigada por sempre me ajudar. Espero poder retribuir um dia. Fico muito feliz em ver seu progresso e saber que pude te ajudar (mesmo que só um pouquinho) no início;
- ***Aos companheiros do Laboratório de Bioenergética***: Ana Paula, Bruno, Carolina Clara, Douglas, Juliana, Laudiene, Luan, Reinaldo, Vagner e Wagner;
- ***Aos companheiros do Laboratório de Vírus***: Fabiana, Fausto, Fernando, Natália, Priscila. E as meninas “da Educação”: Beth, Marisa e Marina;

- **Iranaiá, Luiza e Thaís** (amiguinha, obrigada por ser tão fofa!): obrigada pelo companheirismo, pelas conversas, soluções, células, etc...
- **Aos companheiros do antigo Laboratório.** Foi muito bom o tempo que passei com vocês...sinto muitas saudades de todos vocês!
- À minha amiga **Tati Lobo**....obrigada pelas intermináveis conversas e por compartilhar momentos tão difíceis;
- **À Rosângela.** Muito obrigada por atender todos os pedidos de “última hora”. Seu trabalho foi muito importante e me ajudou muito;
- Ao meu revisor, **Robson**, pelo excelente trabalho e pela compreensão...
- **À Secretária da Pós-Graduação do IBqM**, em especial a Theresa, por sua organização e eficiência;
- Aos **Laboratórios do Instituto de Bioquímica Médica**, que sempre estiveram com suas portas abertas para qualquer “emergência”...
- Em especial ao **Laboratório de Contração Muscular** (Prof^a Martha Sorenson) e ao Laboratório de Bioenergética (Prof Leopoldo De Meis);
- **Ao grupo do 3-bromopiruvato:** Wagner, Nattascha, Reinaldo e Clara. O conhecimento gerado por vocês foi muito importante para este trabalho.

“...Não basta ensinar ao homem uma especialidade. Porque se tornará assim uma máquina utilizável, e não uma personalidade. É necessário que adquira um sentimento, um senso prático daquilo que vale a pena ser empreendido, daquilo que é belo, do que é moralmente correto. A não ser assim, ele se assemelhará, com seus conhecimentos profissionais, mais a um cão ensinado do que a uma criatura harmoniosamente desenvolvida. Deve aprender a compreender as motivações dos homens, suas quimeras e suas angústias para determinar com exatidão seu lugar exato em relação a seus próximos e à comunidade... Os excessos do sistema de competição e de especialização prematura, sob o falacioso pretexto de eficácia, assassinam o espírito, impossibilitando qualquer vida cultural e chegam a suprimir os progressos nas ciências do futuro. O ensino deveria ser assim: quem o receba o recolha como um Dom inestimável, mas nunca como obrigação penosa.”

Albert Einstein em "Como vejo o mundo"

RESUMO

3-bromopiruvato é um agente alquilante com ação anti-tumoral em hepatocarcinomas. Trabalhos prévios demonstraram que este composto inibe a produção de ATP devido a sua ação na glicólise e fosforilação oxidativa. No entanto, as etapas metabólicas específicas e os mecanismos de ação do 3-bromopiruvato em linhagens celulares de hepatocarcinomas humanos, particularmente seus efeitos na energética mitocondrial, são pouco conhecidas. Neste estudo, é relatado que a incubação de células HepG2 com uma baixa concentração de 3-bromopiruvato (150 μ M) por um curto período (30 minutos) afetou de forma significativa a produção de lactato e a função respiratória mitocondrial destas células. O consumo de oxigênio pelas células HepG2 estimulado tanto por piruvato/malato como por succinato foi inibido quando as células foram pré-incubadas com 3-bromopiruvato em um meio sem glicose. Quando as células foram pré-incubadas com este agente em um meio contendo glicose, a respiração foi afetada somente quando succinato foi usado como substrato oxidável. Um aumento na respiração insensível a oligomicina foi observado nas células pré-incubadas com 3-bromopiruvato em um meio com glicose, mas não em um meio sem glicose, indicando que o 3-bromopiruvato induz um aumento no *proton-leak* além de seu efeito inibitório sobre o sistema de transporte de elétrons. A atividade da hexocinase mitocondrial não foi inibida por 150 μ M de 3-bromopiruvato, mas esta concentração causou mais de 70% de inibição da atividade da succinato desidrogenase. Estes resultados sugerem que a ação combinada do 3-bromopiruvato sobre a succinato desidrogenase e a inibição da glicólise em uma etapa posterior a da fosforilação da glicose, desempenha um importante papel na morte das células HepG2 induzida por este agente

ABSTRACT

3-Bromopyruvate is an alkylating agent with anti-tumoral activity on hepatocellular carcinomas. It has already been shown that this compound inhibits cellular ATP production due its action on glycolysis and oxidative phosphorylation. However, the specific metabolic steps and mechanisms of 3-bromopyruvate action in human hepatocellular carcinoma cell lines, particularly its effects on mitochondrial energetic, are poorly understood. In this study, we report that incubation of HepG2 cells with a low concentration of 3-bromopyruvate for a short period (150 μ M for 30 minutes) significantly affected both lactate production and mitochondrial respiratory functions of HepG2 cells. Oxygen consumption of HepG2 cells supported by either pyruvate/malate or succinate was inhibited when the cells were pre-incubated with 3-bromopyruvate in a glucose-free medium. When the cells were pre-incubated with 3-bromopyruvate in a glucose containing medium, respiration was blocked only when succinate was used as the oxidizable substrate. An increased oligomycin-independent respiration was observed in HepG2 cells pre-incubated with 3-bromopyruvate in the presence of glucose, but not in glucose-free medium, indicating that 3-bromopyruvate induces mitochondrial proton leakage besides its blockage in electron transport system. Mitochondrial hexokinase activity was not inhibited by 150 μ M 3-BrPA, however this concentration causes 70% inhibition of succinate dehydrogenase activity. These results suggest that the combined action of 3-bromopyruvate on succinate dehydrogenase and the inhibition of glycolysis in a step downstream the glucose phosphorylation, play an important role in HepG2 cell death induced by this compound.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP:	difosfato de adenosina
AIF:	fator indutor de apoptose
ANT:	translocador de nucleotídeos de adenina
APAF-1:	do inglês: <i>apoptosis protease activating factor-1</i>
ATCC:	do inglês: <i>American Type Cell Collection</i>
ATP:	trifosfato de adenosina
BSS:	solução salina balanceada
EDTA:	ácido etilenodiamino tetra-acético
EGTA:	etilenoglicol-bis(2-aminoetileter)-N, N, N',N'-ácido tetra-acético
GK:	glicocinase
HCC:	hepatocarcinoma
HEPES:	ácido 2-etano-sulfônico 2-hidroxietilpiperazina
HK:	hexocinase
HK-mt:	hexocinase mitocondrial
MEM:	do inglês: <i>Minimum Essential Medium</i>
MET:	microscopia eletrônica de transmissão
MTT:	(3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2, brometo de 5-difeniltetrazólio)
NAD:	do inglês: <i>nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NADP:	do inglês: <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
PBS:	solução salina tampão-fosfato
PKB/Akt:	proteína cinase B
UCPs:	proteínas desacopladoras
VDAC:	canal de ânion dependente de voltagem
PMSF:	fluoreto de fenil-metil-sulfonil
PTPC:	do inglês: <i>permeability transition pore complex</i>
3-BrPA:	3-bromopiruvato
STE:	sistema de transporte de elétrons

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Variações regionais nas taxas de mortalidade por HCC no mundo.....	7
Figura 2:	Via glicolítica, ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa mitocondrial.....	14
Figura 3:	Alguns dos principais destinos para o piruvato em células animais.....	18
Figura 4:	Os estados respiratórios mitocondriais.....	23
Figura 5:	Reações da glutaminase e da glutamato desidrogenase.....	31
Figura 6:	Principais destinos da glutamina em células tumorais.....	32
Figura 7:	Vias do metabolismo de glutamina em células tumorais.....	34
Figura 8:	Diagrama mostrando o método usado para a administração intra-arterial direta de 3-BrPA em um tumor hepático.....	37
Figura 9:	Esquemas mostrando um resumo das etapas do procedimento realizado para as medidas de consumo de oxigênio em células HepG2.....	55
Figura 10:	Incubação com 3-BrPA diminui a viabilidade de células HepG2 de um modo dependente do tempo e concentração.....	59
Figura 11:	Incubação com uma baixa concentração de 3-BrPA diminui a produção de lactato pelas células HepG2 tanto em um meio com glicose quanto em um meio sem glicose.....	63
Figura 12:	Distribuição intracelular da atividade total da hexocinase nas frações mitocondrial e citosólica de células HepG2.....	65

Figura 13:	3-BrPA afeta distintamente as isoformas de hexocinase, e baixas concentrações não inibem a HK-mt II	67
Figura 14:	3-BrPA diminui o consumo de oxigênio mitocondrial em células HepG2 permeabilizadas.....	69
Figura 15:	Efeito do 3-BrPA no potencial de membrana mitocôndria ($\Delta\Psi_m$) de células HepG2 permeabilizadas.....	72
Figura 16:	Pré-incubação com 3-BrPA afeta o consumo de oxigênio de células HepG2 intactas.....	75
Figura 17:	Pré-incubação com 3-BrPA afeta o consumo de oxigênio de células HepG2 permeabilizadas.....	77
Figura 18:	Taxas de consumo de oxigênio de células HepG2 permeabilizadas pré-incubadas com 3-BrPA	78
Figura 19:	Efeito da pré-incubação com 3-BrPA na resposta do fluxo de consumo de oxigênio pelas células HepG2 permeabilizadas ao succinato e ADP.....	79
Figura 20:	Curso temporal da atividade da succinato desidrogenase (SDH) na presença de 3-BrPA ou malonato.....	82
Figura 21:	Inibição da atividade da succinato desidrogenase (SDH) por diferentes concentrações de 3-BrPA e curva de limiar metabólico.....	83
Figura 22:	Resumo dos mecanismos propostos para a ação do 3-BrPA na indução da morte de células HepG2.....	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Definição dos estados respiratórios mitocondriais.....	7
Tabela 2:	Valores de IC ₅₀ para a viabilidade celular em diferentes tempos de incubação com 3-BrPA.....	60

SUMÁRIO

RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	xv
LISTA DE FIGURAS.....	xvi
LISTA DE TABELAS.....	xviii
 1-INTRODUÇÃO.....	 1
1.1- INTRODUÇÃO GERAL.....	2
1.2- NEOPLASIAS.....	3
1.2.1- Definições e causas gerais.....	3
1.2.2- Epidemiologia Geral.....	5
1.2.3- Epidemiologia do câncer de fígado.....	5
1.3- HEPATOCARCINOMAS.....	6
1.3.1-Alternativas disponíveis para o tratamentos de HCCs.....	9
1.3.2-Fenótipos exclusivos como um alvo para tratamento de HCCs.....	12
1.4- METABOLISMO ENERGÉTICO.....	13
1.4.1- Glicólise.....	15
1.4.2- Ciclo de Krebs.....	18
1.4.3-Fosforilação Oxidativa.....	20
<i>Regulação da fosforilação oxidativa.....</i>	<i>21</i>
1.5-ALTERAÇÕES NO METABOLISMO ENERGÉTICO DE CÉLULAS TUMORAIS.....	24
1.6- 3-BROMOPIRUVATO.....	35
 2-OBJETIVOS.....	 41

3-MATERIAL E MÉTODOS.....	43
3.1- Cultura de células.....	44
3.2- Solução neutra de 3-bromopiruvato	44
3.3-Viabilidade celular.....	45
3.3.1-Ensaio MTT.....	45
3.3.2- Ensaio de viabilidade por exclusão de azul de tripan.....	46
3.4-Animais.....	46
3.5- Produção de lactato pelas células HepG2	46
3.6- Isolamento de mitocôndrias de cérebro de camundongos.....	47
3.7- Preparação de glicocinase de fígado de camundongos.....	48
3.8- Preparação da fração mitocondrial de células HepG2.....	48
3.9- Medida das atividades da HK mitocondrial tipo I, HK mitocondrial tipo II e glicocinase.....	49
3.10- Atividade da succinato desidrogenase de células HepG2.....	50
3.11- Quantificação de proteínas	50
3.12- Consumo de oxigênio em células HepG2	51
3.12.1- Preparação das células para análises do consumo de oxigênio.....	51
3.12.2- Consumo de oxigênio de células HepG2 permeabilizadas com digitonina na presença de diferentes concentrações de 3-BrPA.....	51
3.12.3- Consumo de oxigênio de células HepG2 intactas pré incubadas com 3-BrPA.....	52
3.12.4- Consumo de oxigênio de células HepG2 permeabilizadas com digitonina pré-incubadas com 3-BrPA.....	53
3.13-Determinação do potencial de membrana	56

3.14- Análise Estatística.....	56
4-RESULTADOS.....	57
4.1- 3-BrPA reduz a viabilidade de células HepG2.....	58
4.2- 3-BrPA em baixa concentração diminui a produção de lactato pelas células HepG2.....	61
4.3-Distribuição intracelular da atividade da hexocinase de células HepG2.....	64
4.4-Baixas concentrações de 3-BrPA não inibem a atividade da hexocinase mitocondrial, mas inibem a respiração mitocondrial e a formação de potencial de membrana em células HepG2 permeabilizadas.....	66
4.5-Pré-incubação com 3-BrPA afeta os parâmetros respiratórios de células HepG2 intactas.....	73
4.6-Pré-incubação com 3-BrPA afeta os parâmetros respiratórios de células HepG2 permeabilizadas ao nível do complexo I e/ou II.....	76
4.7- 3-BrPA inibe a atividade da succinato desidrogenase em mitocôndrias de células HepG2. Implicações com o limiar da resposta respiratória ao 3-BrPA.....	80
5-DISCUSSÃO.....	84
6-CONCLUSÕES.....	98
7-REFERÊNCIAS.....	100
ANEXO 1.....	116
ANEXO 2.....	141

1-INTRODUÇÃO

1.1- INTRODUÇÃO GERAL

O câncer é a segunda maior causa de mortes no mundo (Lopez *et al.*, 2006). O câncer de fígado está entre os tipos de câncer mais incidentes, e a alta mortalidade associada a sua ocorrência faz com que este ocupe a terceira posição em número de mortes por câncer entre homens e a sexta entre mulheres no mundo (Garcia *et al.*, 2007). Mais de 85% dos casos de câncer de fígado são hepatocarcinomas (HCC), sendo comum o seu desenvolvimento em fígados não saudáveis, que apresentam infecções crônicas ou cirrose (El-Serag e Mason, 1999; El-Serag, 2002; Llovet *et al.*, 2003). Os tratamentos atualmente disponíveis são limitados pelo estágio de desenvolvimento da doença e o grau de disfunção hepática (Cillo *et al.*, 2006). Estes fatos ressaltam a necessidade do desenvolvimento de terapias que sejam de fato eficazes em eliminar o tumor, mas que apresentem baixa toxicidade para os tecidos não afetados.

A procura por um composto com tais propriedades levou a identificação de um agente com propriedades anti-tumorais em HCCs e aparentemente seguro para os tecidos adjacentes não afetados, assim como para o restante do organismo (Ko *et al.*, 2004; Geschwind *et al.*, 2002). Este agente bastante promissor, 3-bromopiruvato (3-BrPA), teve suas propriedades atribuídas ao seu efeito inibitório nos dois sítios intracelulares de produção de ATP: a glicólise e a fosforilação oxidativa. Embora a inibição da hexocinase tenha sido identificada como responsável pelo efeito antitumoral do 3-BrPA (Ko *et al.*, 2001), os mecanismos de ação deste composto no metabolismo energético, tanto de células tumorais quanto de células saudáveis, ainda estão pouco esclarecidos e isto é particularmente verdade quando considerada sua ação na mitocôndria. Embora no trabalho realizado por Ko *et al.* (2001) tenha sido demonstrada a inibição da respiração em mitocôndrias isoladas do tumor VX2 (um modelo para tumor de fígado) implantado em coelhos, nenhum outro trabalho até o momento avaliou

profundamente os mecanismos e sítios de ação mitocondriais envolvidos neste processo. Com base no exposto acima, este trabalho tem como principal objetivo identificar os mecanismos de ação do 3-BrPA no metabolismo energético, principalmente sua ação na respiração mitocondrial, de células derivadas de um HCC humano. Este conhecimento poderia auxiliar o entendimento de seu efeito terapêutico e serviria não só para uma melhor compreensão da ação deste composto em HCCs como também para a possibilidade de seu uso em outros tipos de tumores.

1.2- NEOPLASIAS

1.2.1- Definições e causas gerais

Neoplasia (*neo* = novo + *plasia* = tecido) é o termo que designa alterações celulares que acarretam um crescimento celular aumentado, ou seja, proliferação celular anormal, sem controle e autônoma, na qual a capacidade de diferenciação é reduzida ou perdida. Tumor é um termo comum e genérico usado para se referir a neoplasias, que podem ser benignas ou malignas (Martin, 1963). Embora referências a tumores sejam encontradas na literatura médica desde a Grécia antiga e o termo grego *karkinos* (caranguejo) tenha sido usado por Hipócrates (460-370 a.C), o termo “câncer” foi usado pela primeira vez por Galeno (138-201 d.C) e é derivado do latim *cancrum*, que também significa caranguejo. Esse termo é dado devido ao aspecto que assume a vascularização do tumor, assemelhando-se a patas de um caranguejo (Gallucci, 1985). Atualmente, câncer é o termo comum usado para designar neoplasias malignas e consiste em um conjunto de mais de 100 doenças caracterizadas por uma população de células anormais que além de crescerem e se dividirem desordenadamente, são capazes de invadir tecidos e órgãos adjacentes, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo (processo denominado metástase).

As neoplasias podem ser classificadas de acordo com o tipo de célula de origem. Desta forma, são denominadas carcinomas, quando se iniciam em tecidos epiteliais, sarcomas quando se iniciam em tecidos conjuntivos, linfomas (linfa), leucemias (medula óssea), teratoma e seminoma (células germinativas), carcinóides (células neuroendócrinas), hemangiossarcomas (vasos sanguíneos), linfangiossarcomas (vasos linfáticos) e colangiossarcomas (vasos biliares) (Triolo, 1965).

As causas do câncer estão relacionadas a fatores de risco que podem ser externos (tabagismo, substâncias químicas, alcoolismo, hábitos alimentares, hábitos sexuais, exposição à radiação e organismos infecciosos) e internos (mutações herdadas, hormônios, condições imunes e mutações decorrentes do metabolismo). Estes fatores podem agir juntamente ou em sequência para iniciar ou promover a carcinogênese. De todos os casos de câncer, 80% a 90% estão associados a fatores externos. As causas externas relacionam-se ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de um ambiente social e cultural. As causas internas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas e estão ligadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas (Yu e Yuan, 2004; Garcia *et al.* 2007; Jemal *et al.*, 2007). O câncer pode afetar pessoas de todas as idades, mas o risco para a maioria dos tipos de câncer aumenta com o aumento da idade. O envelhecimento traz mudanças nas células que aumentam a sua suscetibilidade à transformação maligna. Isto, somado ao fato de as células das pessoas idosas terem sido expostas por mais tempo aos diferentes fatores de risco para câncer, explica parcialmente porque o câncer é mais freqüente nesses indivíduos (Jemal *et al.*, 2007).

1.2.2- Epidemiologia Geral

Uma em cada oito mortes no mundo é causada por câncer. O câncer causa mais mortes do que AIDS, tuberculose e malária em conjunto. Esta é a segunda maior causa de mortes em países desenvolvidos (doenças cardíacas em primeiro lugar) e a terceira em países em desenvolvimento (doenças cardíacas e infecto-parasitárias em primeiro e segundo lugar, respectivamente) (Lopez *et al.*, 2006). Do total de óbitos por câncer mais de 70% ocorrem em países de média ou baixa renda. Foi estimado para 2007 mais de 12 milhões de novos casos no mundo inteiro, dos quais 5,4 milhões ocorreriam em países economicamente desenvolvidos e 6,7 milhões em países em desenvolvimento. A estimativa correspondente para número de mortes em 2007 foi de 7,6 milhões (cerca de 20 mil mortes por câncer por dia), sendo 2,9 milhões em países economicamente desenvolvidos e 4,7 milhões em países em desenvolvimento. Até 2050, acredita-se que a taxa global cresça para 27 milhões de novos casos e 17,5 milhões de mortes em decorrência do aumento e envelhecimento da população (Garcia *et al.*, 2007). No Brasil, as estimativas para o ano de 2008, e válidas também para o ano de 2009, apontam que ocorrerão 466.730 novos casos de câncer (INCA, 2007).

1.2.3- Epidemiologia do câncer de fígado

As estimativas para 2007 de novos casos de câncer apontaram o câncer de fígado em quinto lugar entre homens e oitavo entre mulheres no mundo todo. Devido à sua alta taxa de mortalidade, este figura como a terceira causa de morte por câncer no mundo entre homens e a sexta entre mulheres. Este quadro não está distribuído de forma uniforme globalmente. Em países desenvolvidos, as estimativas apontaram o câncer de fígado na quinta posição no número de mortes causadas por câncer em homens (oitava posição em incidência) e a oitava posição em

mulheres (não figurando entre os dez mais incidentes). Enquanto isso, em países em desenvolvimento a estatística é mais dramática, com este tipo de câncer sendo responsável pelo segundo lugar no número de mortes causadas por câncer entre homens (terceira posição em incidência) e o quinto entre mulheres (sexta posição em incidência) (Garcia *et al.*, 2007).

1.3- HEPATOCARCINOMAS

O câncer do fígado pode ser primário, isto é, originado no próprio fígado, ou pode ser secundário ou metastático, ou seja, quando se origina primariamente em outro órgão e posteriormente atinge o fígado. Os tipos de câncer que acometem o fígado são o hepatocarcinoma (HCC) ou carcinoma hepatocelular, a forma predominante de câncer primário do fígado, o colangiossarcoma, que acomete os dutos biliares (Parkin *et al.*, 1993; Goodman, 2007), o angiossarcoma, que acomete os vasos sanguíneos (Maluf *et al.*, 2005) e o hepatoblastoma, o tipo infantil (Meyers, 2007).

O HCC representa de 85% a 90% dos casos de câncer primário do fígado (El-Serag e Rudolph, 2007). No entanto, uma exceção para esta taxa é uma determinada região da Tailândia, que apresenta uma das maiores incidências mundiais de câncer de fígado (88 e 35,4 casos a cada 100 mil habitantes para homens e mulheres, respectivamente) (Parkin, 2002). Nesta região, o principal tipo de câncer do fígado é o colangiocarcinoma (Okuda *et al.*, 2002). Evidências significativas mostram uma forte associação entre esta elevada incidência e a infecção da população pelo parasita hepático *Opisthorchis viverrini* (Parkin *et al.*, 1993).

Mais de 500 mil novos casos de HCC são diagnosticados anualmente, com uma incidência mundial de 5,5 (mulheres) a 14,9 (homens) casos em cada 100 mil habitantes (Parkin *et al.*, 2001). O HCC é rapidamente fatal na maioria dos pacientes, fazendo com que

suas taxas de incidência e de mortalidade sejam muito próximas. Sua ocorrência varia significativamente de acordo com grupos étnicos e raças, regiões demográficas, entre homens e mulheres e a presença de vários fatores de riscos ambientais que podem ser prevenidos, como a infecção pelo vírus da hepatite B e C, a ingestão exacerbada de álcool e a exposição a aflatoxinas presentes na dieta (El-Serag e Rudolph, 2007). A maioria dos casos (>80%) ocorre em países em desenvolvimento, particularmente no Sudeste da Ásia e África subsaariana (Figura 1). Em algumas regiões da Ásia o HCC é a principal causa de morte relacionada ao câncer. Na China ocorrem mais de 50% dos casos do mundo inteiro. As Américas do Sul e do Norte, assim como o Norte da Europa e Oceania apresentam taxas de incidência menores, com uma média de cinco casos para cada 100 mil habitantes (Parkin, 2002). No entanto, nos últimos anos, o interesse pelo HCC cresceu na Europa e EUA devido ao aumento no número de casos nestas regiões (Taylor-Robinson *et al.*, 1997; Deuffic *et al.*, 1998; El-Serag e Mason, 1999; McGlynn *et al.*, 2001; Tanaka *et al.*, 2002).

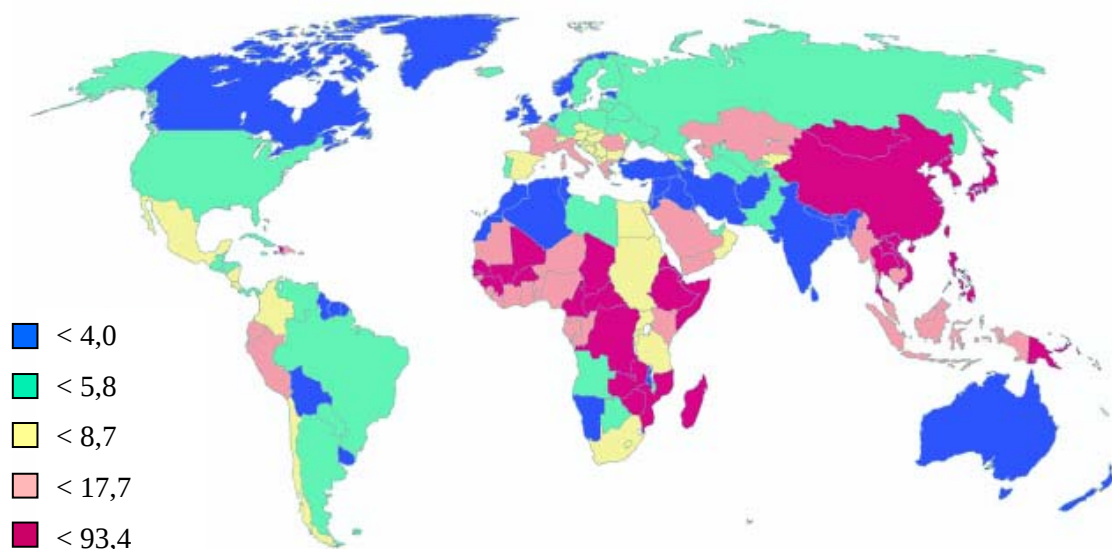


Figura 1. Variações regionais nas taxas de mortalidade por HCC no mundo. As taxas estão apresentadas por 100 mil pessoas (El-Serag e Rudolph, 2007).

No Brasil, o câncer de fígado não figura entre os dez mais prevalentes. Entretanto, de acordo com os dados consolidados sobre mortalidade por câncer no Brasil em 1999, o câncer de fígado e vias biliares ocupava a sétima posição, sendo responsável por 4.682 óbitos (MS/INCA, 1999). Mesmo em regiões com uma típica baixa prevalência, o câncer de fígado é um grave problema de saúde devido ao aumento no número de casos nas últimas décadas nestas regiões, e a alta mortalidade associada a sua ocorrência.

O HCC é um dos poucos cânceres com fatores de risco bem definidos (El-Serag e Rudolph, 2007). Sua ocorrência é três vezes maior em homens do que em mulheres. A faixa etária, com maior predomínio nos Estados Unidos e Europa, está localizada entre a 6^a e 7^a década, enquanto que, nas áreas de grande incidência, o tumor ocorre em pacientes mais jovens, entre a 3^a e 5^a década (Parkin, 2002). Isto pode ser explicado em parte pelo tipo de fator de risco e a idade na qual o paciente o adquiriu. Por exemplo, a infecção pelo vírus da hepatite B, principal fator de risco em áreas em desenvolvimento, é adquirida normalmente no nascimento ou durante a infância nestas populações. Por outro lado, em locais de baixa incidência, a infecção pelo vírus da hepatite C e a cirrose alcoólica, os principais fatores nestas regiões, ocorrem em um estágio de vida mais avançado (El-Serag, 2002). O HCC raramente acomete o fígado saudável, no entanto, o risco do câncer aumenta de forma significativa em resposta à injúria crônica causada por cirrose hepática devido a infecções virais ou elevada ingestão de álcool (El-Serag e Rudolph, 2007). De fato, na Europa o câncer é a principal causa de morte entre pacientes com cirrose (Fattovich *et al.*, 1997). Desta forma, os principais fatores de risco do HCC são a infecção crônica pelo vírus da hepatite B (principal causa nos países em desenvolvimento), infecção crônica pelo vírus da hepatite C e a cirrose alcoólica (causas mais comuns em países desenvolvidos) (El-Serag, 2002; Llovet *et al.*, 2003; El-Serag e Rudolph, 2007). O controle de alguns fatores de risco pode levar a uma diminuição nas taxas de

incidência. Como exemplo pode-se citar a vacinação contra hepatite B, que levou a uma diminuição significativa no número de casos em algumas regiões, como Taiwan e China (Chang *et al.*, 1997; McGlynn *et al.*, 2001; Parkin, 2002). Por outro lado, o crescente aumento na incidência na Europa e América do Norte parece ser devido à presença de novos fatores de risco nestas regiões, como o aumento na infecção da população pelo vírus da hepatite C e, talvez, a diabetes (Lawson *et al.*, 1986; Adami *et al.*, 1996; El-Serag e Mason, 2000; El-Serag, 2002,).

Os fatos expostos acima realçam a necessidade do conhecimento das vias moleculares da hepatocarcinogênese e o desenvolvimento de terapias eficazes no tratamento não só de cânceres primários, mas também de cânceres avançados metastáticos.

1.3.1- Alternativas disponíveis para o tratamento de HCCs

A incidência de câncer no mundo cresceu nas últimas décadas e as estimativas para os próximos anos indicam que esses índices continuarão a crescer (McGlynn *et al.*, 2001; Garcia *et al.*, 2007). Apesar do grande esforço e investimentos realizados até o momento na pesquisa sobre o câncer, a solução para este grave problema ainda parece distante. Este cenário se aplica para os diversos tipos de câncer e é especialmente crítico para o câncer de fígado.

O HCC é especialmente difícil de tratar porque geralmente este se desenvolve em fígados não saudáveis, que apresentam infecções crônicas ou cirrose (El-Serag e Mason, 1999; El-Serag, 2002; Llovet *et al.*, 2003). Os tratamentos atualmente disponíveis são limitados pelo estágio de desenvolvimento da doença e o grau de disfunção hepática (Cillo *et al.*, 2006). Os únicos tratamentos que oferecem possibilidade de cura são a ressecção e o transplante. No entanto, estes tratamentos são indicados somente a uma minoria de pacientes. Em muitos casos a ressecção pode não ser indicada, pois a doença é geralmente diagnosticada em um estágio avançado, quando as reservas hepáticas

podem estar muito comprometidas. A presença de múltiplos focos também limita a aplicação deste tratamento (Chen *et al.*, 1989; Llovet *et al.*, 1999). O transplante também pode ser limitado devido à alta demanda em relação ao número de doadores e ao fato de muitos pacientes não atenderem aos critérios de seleção para o transplante (Yao *et al.*, 2003). Além disso, mesmo que os procedimentos cirúrgicos sejam eficazes existe uma significativa morbidade, mortalidade e altas taxas de recorrência entre os pacientes (60-75%) (Bismuth *et al.*, 1986; Stuart *et al.*, 1996).

As outras opções terapêuticas são a quimioterapia sistêmica, com 15 a 20% de resposta, e a radiação, a qual é limitada por sua severa toxicidade ao fígado (Llovet *et al.*, 2003). No entanto, estas terapias parecem não oferecer um real impacto na taxa de sobrevivência dos pacientes (Venook *et al.*, 1990; Stuart *et al.*, 1996). A quimioresistência do HCC faz com que as quimioterapias sistêmicas tradicionais sejam ineficientes e a toxicidade relacionada a drogas é aumentada devido à presença de injúrias crônicas no fígado (Llovet *et al.*, 2003; Robert e Gores, 2005).

As limitações destas terapias tradicionais juntamente com a tendência do HCC em permanecer limitado ao fígado levaram ao desenvolvimento de novas terapias que tinham em comum um mesmo conceito: o tratamento restrito à região do tumor (Venook *et al.*, 1990). Este conceito se baseia no fato de que pacientes com HCC geralmente morrem por falência do órgão como resultado de destruição do tecido hepático e não como resultado de metástases extra-hepáticas. Essas terapias são usadas atualmente para tratar tumores não ressecáveis (Georgiades *et al.*, 2001; Venook *et al.*, 1990) e incluem técnicas de remoção/ ablação química (álcool, ácido acético) e térmicas (radiofrequência, microondas, laser), assim como tratamentos intra-arteriais (Kulik *et al.*, 2007). Destas, a quimioembolização transarterial (TACE, “*transcatheter arterial chemoembolization*”) tem sido o procedimento mais utilizado (Lo *et al.*, 2002; Llovet *et al.*, 2003). Esta

técnica consiste na administração intra-arterial, diretamente ao tumor, de agentes quimioterápicos, emulsificados em um meio oleoso (lipiodol), combinados com um material embólico. O fígado possui um fornecimento duplo de sangue via veia porta e artéria hepática. Normalmente, a veia porta é responsável por suprir a maior parte do sangue ao fígado (75-83%), com a artéria hepática apresentando somente um papel de suporte (20%–25%) (Breedis e Young, 1954; Geschwind *et al.*, 2000; Georgiades *et al.*, 2001). No entanto, este balanço é profundamente alterado em casos de HCC, nos quais a artéria hepática praticamente se torna única fornecedora de sangue ao tumor (90% a 100%) (Breedis e Young, 1954). A técnica TACE explora esta característica, usando a artéria hepática como uma via direta para administração do quimioterápico ao tumor, juntamente com o agente embolizante que provoca isquemia e reduz os riscos de vazamento da droga nos tecidos adjacentes e sua entrada na circulação sistêmica. (Georgiades *et al.*, 2001; Venook *et al.*, 1990; Geschwind *et al.*, 2000). Desta forma, este método deveria, ao menos em teoria, limitar os potenciais danos aos tecidos não tumorais. No entanto, vários estudos demonstraram que a indução de isquemia e hipóxia no tumor aumentaram os níveis do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF, do inglês *vascular endothelial growth factor*) e do fator induzível por hipóxia (HIF-1), conseqüentemente prevenindo a apoptose, estimulando o metabolismo, crescimento e invasão das células tumorais (Kobayashi *et al.*, 1999; Xiong *et al.*, 2004). Por outro lado a eliminação do material embólico (administração somente do quimioterápico) limita a eficiência da terapia pois permite que a droga atinja a circulação sistêmica, causando toxicidade (Kajanti *et al.*, 1992). Estes fatos ressaltam a necessidade de um tratamento que elimine o tumor, sem levar à isquemia, prejudicar os tecidos saudáveis adjacentes e o restante do organismo.

1.3.2- Fenótipos exclusivos como um alvo para tratamento de HCCs

O desenvolvimento de um agente antitumoral que exerça sua ação sem prejudicar os tecidos sadios requer uma análise de características que sejam exclusivas das células tumorais e de extrema importância para sua proliferação e sobrevivência. Embora as células tumorais apresentem muitas características (genéticas, bioquímicas e histológicas) que as diferenciem das células normais, dois fenótipos gerais podem ser destacados: a divisão celular aumentada e o padrão bioenergético exacerbado (Pedersen, 2007a).

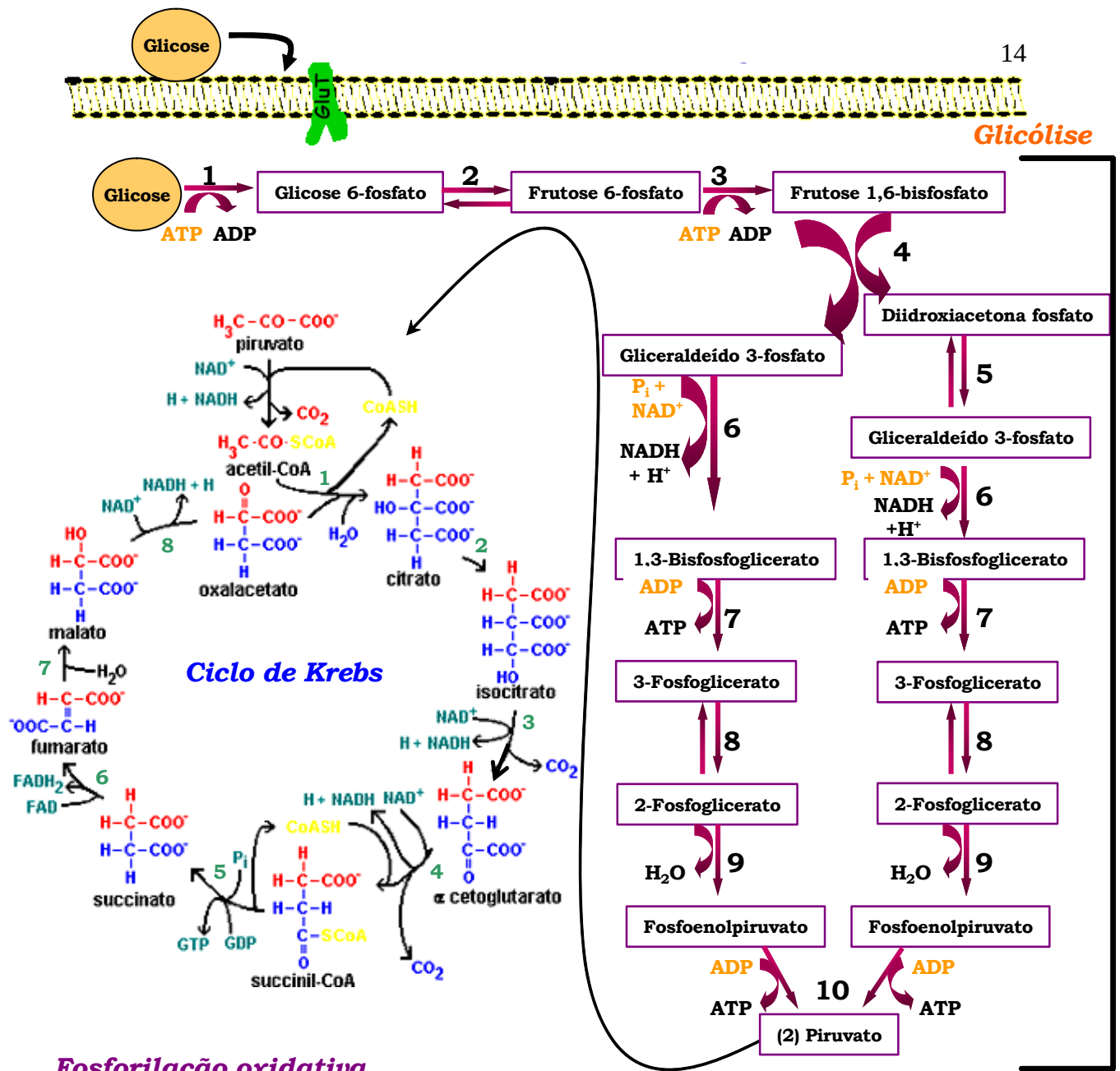
Durante muito tempo somente as características relacionadas à divisão celular aumentada foram focadas na busca por agentes anti-tumorais (McGuire, 2003; Pedersen, 2007a) e pesquisas posteriores foram direcionadas para as vias de transdução de sinais (Dancey e Suasville, 2003). Embora um bom campo para estas investigações, as características fenotípicas relacionadas à bioenergética foram pouco exploradas. Somente mais recentemente, com a descoberta de que vias de morte celular estavam relacionadas à bioenergética celular, cresceu o interesse em considerar este fenótipo como um possível alvo para agentes anti-tumorais (Costantini *et al.*, 2000; Pedersen *et al.*, 2000; Mathupala, *et al.*, 2006; Moreno-Sánchez *et al.*, 2007; Pedersen, 2007a, 2007b).

A seguir é apresentada uma breve revisão dos elementos básicos e das principais características do metabolismo energético de células normais e as diferenças encontradas em células tumorais. Deste modo, pode-se obter uma melhor compreensão de como essas diferenças bioenergéticas podem ser utilizadas como um alvo terapêutico no tratamento não só de HCCs mas também de outros tipos de neoplasias malignas.

1.4- METABOLISMO ENERGÉTICO

Os seres vivos necessitam de um suporte contínuo de energia para que possam manter todos os processos necessários para seu crescimento, manutenção e multiplicação. O metabolismo consiste em uma série de reações catalisadas enzimaticamente em uma célula, com o objetivo de manter estes processos. Estas reações estão organizadas em vias metabólicas e agem de forma coordenada e integrada para a que a célula obtenha energia, poder redutor e possa sintetizar e degradar biomoléculas de acordo com suas necessidades. Em animais, a energia necessária é obtida pela oxidação de compostos orgânicos (carboidratos, lipídeos e proteínas) obtidos do meio externo ou de reservas internas, e utilizada para sintetizar ATP a partir de ADP e Pi e também poder redutor (NAD(P)H). O ATP e NAD(P)H formados transferem parte de sua energia para processos de síntese de intermediários metabólicos, macromoléculas, transporte e movimento. Os nutrientes também podem ser degradados ao invés de completamente oxidados, gerando intermediários metabólicos para síntese de outras moléculas.

A glicólise, o ciclo de Krebs e a fosforilação oxidativa são vias metabólicas que estão implicadas na produção do ATP e NAD(P)H celulares (Figura 2). Uma visão geral destes processos é descrita a seguir. Maiores detalhes sobre as reações, intermediários, funções e regulação destas vias podem ser encontrados em excelentes livros didáticos (Lehninger, Nelson e Cox, 2002; Berg, Tymoczko e Stryer, 2002, Voet e Voet, 1995).



Fosforilação oxidativa

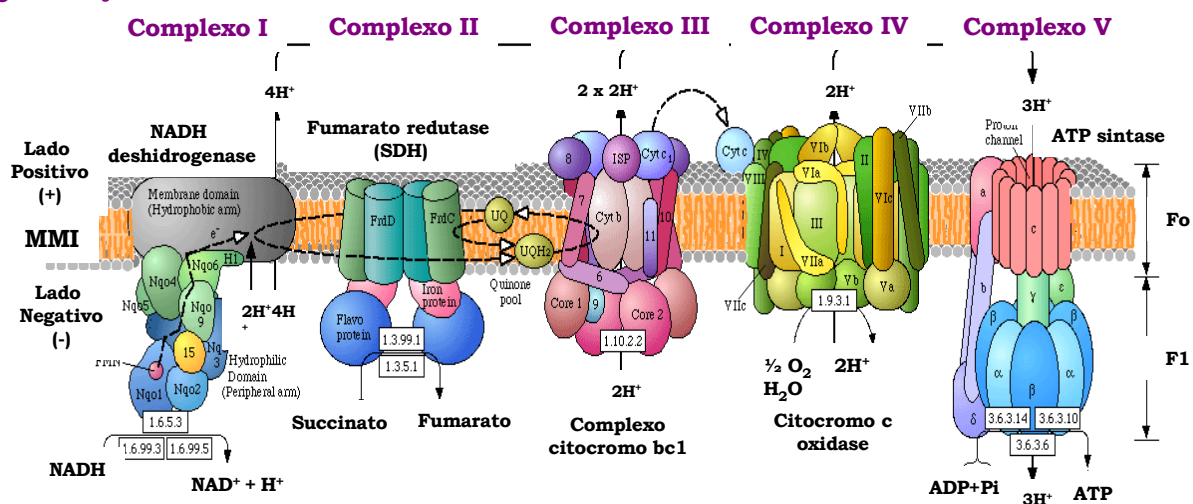


Figura 2: Via glicolítica, ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa mitocondrial. O esquema apresenta de forma resumida as três vias. A

glicose ao entrar na célula será metabolizada pela via glicolítica formando duas moléculas de piruvato por glicose no final da via. Apesar do piruvato possuir vários destinos nas células, em condições aeróbicas, ele é majoritariamente direcionado para a mitocôndria, entrando no ciclo de Krebs, onde o mesmo é completamente oxidado. O poder redutor gerado neste ciclo é armazenado na forma de transportadores reduzidos de elétrons (NADH e FADH₂). Estes transportadores irão transferir esses elétrons para o sistema de transporte de elétrons (STE) localizado na membrana interna mitocondrial. Este fluxo de elétrons através STE gera um gradiente de eletroquímico de prótons através da membrana mitocondrial interna (MMI) que está acoplado a síntese de ATP pela mitocôndria no processo de fosforilação oxidativa. Note que, apesar de apenas a glicose aparecer no esquema, outras moléculas como ácidos graxos e aminoácidos também são metabolizadas nestas vias. Os números ao lado de cada reação da via glicolítica e ciclo de Krebs representam as enzimas que as catalisam, como identificado a seguir: **Via glicolítica:** **1**, hexocinase; **2**, fosfoglicose isomerase; **3**, fosfofrutocinase-1; **4**, aldolase; **5**, triose fosfato isomerase; **6**, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase; **7**, fosfoglicerato cinase; **8**, fosfoglicerato mutase; **9**, enolase; **10**, piruvato cinase. **Ciclo de Krebs:** **1**, citrato sintase; **2**, aconitase; **3**, isocitrato desidrogenase; **4**, complexo da α -cetoglutarato desidrogenase; **5**, succinil-CoA sintetase; **6**, succinato desidrogenase; **7**, fumarase; **8**, malato desidrogenase. E ainda, o complexo da piruvato desidrogenase, que catalisa descarboxilação oxidativa do piruvato em acetil-CoA.

1.4.1- Glicólise

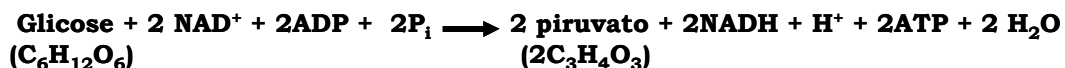
Em células normais, a maior parte da glicose consumida é convertida em piruvato. Este processo ocorre em uma sequência de dez reações catalisadas por enzimas e é denominada glicólise, via glicolítica ou via de Embden-Meyerhof-Parnas (Figura 2). Estudos pioneiros realizados durante quatro décadas no início do século passado levaram alguns pesquisadores a descreverem pela primeira vez, por volta do ano de 1940, todos os intermediários e enzimas catalisadoras da glicólise. Desta forma, a glicólise se tornou a primeira via metabólica a ser completamente elucidada (Fruton, 1972) e os processos descritos a seguir podem ser encontrados em revisões sobre o assunto (Philips *et al.*, 1981). Após entrar na célula através de transportadores específicos chamados GLUT (do inglês *glucose transporter*), a molécula de glicose é fosforilada pela transferência do grupo fosfato terminal de uma

molécula de ATP para seu grupo hidroxila no carbono 6, formando glicose 6-fosfato e ADP. Esta reação é essencialmente irreversível em condições fisiológicas e é catalisada pela enzima hexocinase (HK).

As nove reações seguintes irão transformar a glicose 6-fosfato em piruvato. A fosfoglicose isomerase catalisa a isomerização da glicose 6-fosfato em frutose 6-fosfato. Em uma segunda reação de fosforilação, a fosfofrutocinase catalisa a transferência de um grupo fosfato do ATP para frutose 6-fosfato formando frutose 1,6-bisfosfato e ADP. A frutose 1,6 bisfosfato, através da ação da enzima aldolase, é clivada em duas moléculas de três carbonos, a diidroxiacetona fosfato e o gliceraldeído 3-fosfato. Este último pode seguir diretamente a seqüência de reações da glicólise. A diidroxiacetona fosfato, por sua vez, deve antes ser isomerizada pela enzima triose fosfato isomerase, tornando-se gliceraldeído 3-fosfato podendo assim seguir a via glicolítica. Nos passos seguintes, as duas trioses-fosfato serão oxidadas a piruvato e haverá a produção de quatro moléculas de ATP e duas de NADH. As duas moléculas de gliceraldeído 3-fosfato formadas na etapa anterior são oxidadas, doando um par de elétrons a um NAD^+ que se reduz a NADH, e fosforiladas por fosfato inorgânico (Pi), dando origem a 1,3-bisfosfoglicerato, numa reação catalisada pela gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase. O 1,3-bisfosfoglicerato possui um alto poder de transferência de seu grupamento fosfato e por ação catalítica da enzima fosfoglicerato cinase, realiza a fosforilação ao nível do substrato de um ADP, gerando ATP e 3-fosfoglicerato. Nas últimas etapas da glicólise há um rearranjo na molécula de 3-fosfoglicerato que é transformada em 2-fosfoglicerato por ação da enzima fosfoglicerato mutase. Uma desidratação de 2-fosfoglicerato catalisada pela enolase forma o fosfoenolpiruvato. Este doa um grupamento fosfato para um ADP, numa reação catalisada pela piruvato cinase, realizando assim a segunda fosforilação ao nível do substrato; os produtos finais são quatro moléculas de ATP, duas de piruvato, dois NADH e duas moléculas de H_2O . Como nesta fase são produzidas quatro moléculas de ATP, e foram

gastas duas moléculas na primeira fase, tem-se um saldo final de duas moléculas de ATP por molécula de glicose consumida na via.

Equação global final para a glicólise:



Apesar de a glicólise ser uma via universal, o destino de seus produtos finais vai depender das circunstâncias e do tipo celular (Figura 3). Em animais, o piruvato tanto pode originar lactato, como pode ainda ser completamente oxidado na mitocôndria formando CO_2 , FADH_2 , NADH , ATP ou GTP . Neste caso as moléculas de NADH e FADH_2 produzidas são reoxidadas a NAD^+ e FAD^+ durante o processo de fosforilação oxidativa descrito a seguir. O piruvato também pode ter destinos anabólicos (biossíntese) na célula, como a síntese do aminoácido alanina e a síntese de intermediários de outras vias, como o ciclo de Krebs (reações anapleróticas), que será descrito na próxima seção.

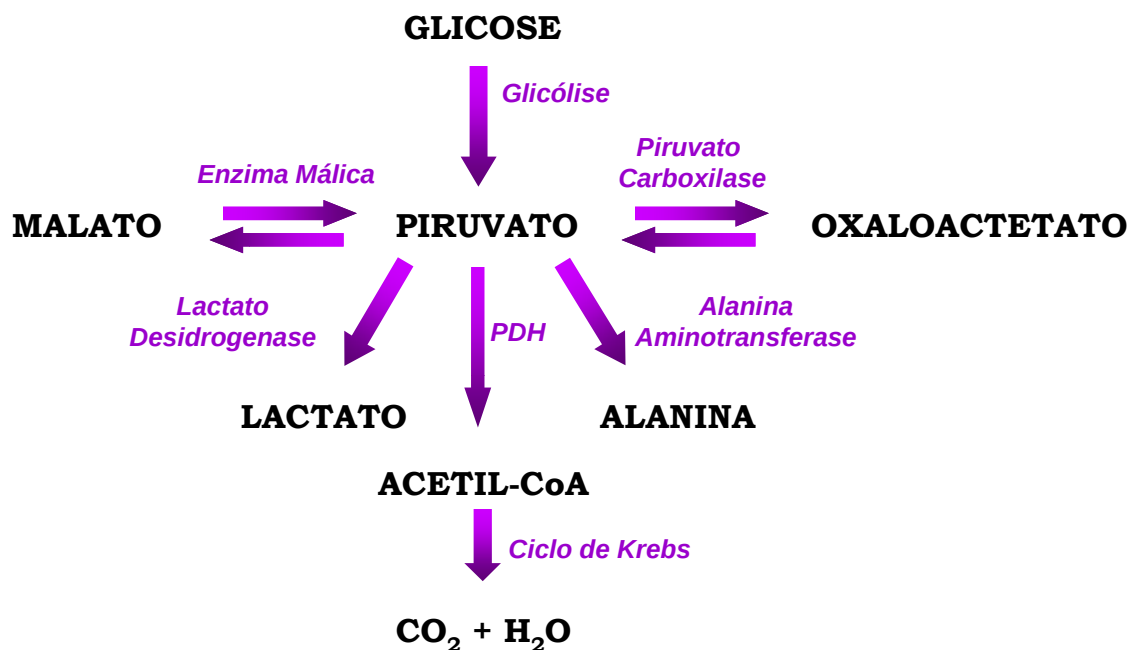


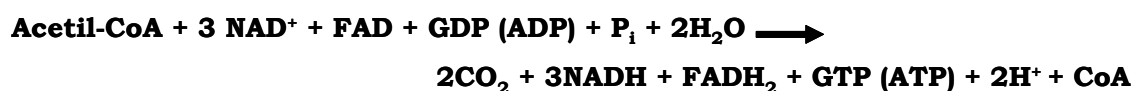
Figura 3: Alguns dos principais destinos para o piruvato em células animais. O piruvato formado na glicólise pode ser reduzido a lactato pela enzima lactato desidrogenase ou, após sua transformação em acetil-CoA pela piruvato desidrogenase (PDH), ser completamente oxidado por uma série de enzimas no ciclo de Krebs gerando dióxido de carbono, água e poder redutor. O piruvato também pode ser usado para a síntese de alanina. Nesta reação a enzima alanina aminotransferase catalisa a transferência de um grupo amino do glutamato para o piruvato, formando alanina e α -cetoglutarato. O piruvato pode ainda gerar oxaloacetato e malato pelas enzimas piruvato carboxilase e enzima málica, respectivamente. Estas duas últimas reações possuem uma importante função na reposição de intermediários do ciclo de Krebs (reações anapleróticas).

1.4.2- Ciclo de Krebs

O ciclo de Krebs (ou “ciclo do ácido cítrico” ou “ciclo dos ácidos tricarboxílicos”) foi descrito pela primeira vez por Hans Krebs, em 1937, sob o nome de ciclo do ácido cítrico. As reações que compõem o ciclo foram descritas em trabalhos prévios de autores como Albert Szent-Gyorgyi, Martius e Knoop. Porém, a natureza cíclica da via foi descrita posteriormente em uma elegante série de experimentos realizados por Krebs (Krebs, 1970).

Quando o piruvato formado na glicólise for completamente oxidado, o mesmo inicialmente é transportado para matriz mitocondrial, através de um sistema de transporte específico, onde é descarboxilado oxidativamente pelo complexo da piruvato desidrogenase mitocondrial, com a participação de NAD^+ e coenzima A, formando acetil-CoA, NADH e CO_2 . A primeira reação do ciclo de Krebs, ou ciclo do ácido cítrico é a condensação do acetil-CoA com uma molécula de oxaloacetato, catalisada pela enzima citrato sintase, resultando em uma molécula de citrato. O citrato é então transformado em isocitrato, e este é desidrogenado, com perda de CO_2 , formando α -cetoglutarato. Este último também perde CO_2 oxidativamente e liberando succinil-CoA que formará então, succinato e GDP (ou ATP). O succinato é convertido à oxaloacetato em três reações adicionais, duas oxidações e uma hidratação. Assim, o oxaloacetato é regenerado e pode reagir com uma nova molécula de acetil-CoA, dando continuidade no ciclo. Quatro das oito reações que compõe o ciclo são oxidações e os elétrons são transferidos para NAD^+ e FAD, conservando de maneira eficiente a energia na forma de NADH e FADH_2 . Como resultado final o ciclo produz duas moléculas de CO_2 , três NADH, um FADH_2 e um GTP ou ATP (Figura 2).

Equação global para o ciclo de Krebs:



O ciclo de Krebs oxida tanto carboidratos, como por exemplo, a oxidação de glicose através da formação de piruvato como também ácidos graxos e aminoácidos. No entanto, embora tenha um papel central obtenção de energia de diferentes substratos orgânicos esta via

também apresenta um importante papel biossintético, pois seus intermediários também são utilizados para a síntese de diversas moléculas como aminoácidos, bases nitrogenadas para a síntese de nucleotídeos, colesterol, ácidos graxos e porfirinas (Owen *et al.*, 2002). Neste caso, os seus intermediários são constantemente removidos e a reposição deste ocorre através de reações chamadas “anapleróticas”, como as reações da enzima málica e piruvato carboxilase descritas anteriormente (Figura 3).

1.4.3-Fosforilação Oxidativa

O NADH e FADH₂ formados durante a oxidação de carboidratos, lipídios e proteínas irão transferir seus elétrons, através de um sistema de transporte de elétrons (STE), ao O₂, reduzindo-o a H₂O (Figura 2). A fosforilação oxidativa é o processo no qual ATP é formado como resultado desta transferência e é a finalização de várias transformações energéticas chamadas de respiração celular.

O STE está localizado na membrana mitocondrial interna e compreende quatro grandes complexos protéicos chamados NADH-Q oxiredutase, succinato-Q redutase, Q-citocromo c oxiredutase e citocromo c oxidase, ou simplesmente complexos I, II, III e IV, respectivamente. Duas outras moléculas transportadoras também atuam neste sistema, a ubiquinona (Q), uma quinona hidrofóbica, e o citocromo c, uma proteína associada à membrana que contém heme. Durante o transporte de elétrons os complexos I, III e IV bombeiam prótons através da membrana mitocondrial interna, gerando um gradiente eletroquímico de prótons consistindo de um potencial de membrana (gradiente elétrico, $\Delta\Psi$) e um gradiente de pH (ΔpH). Estes prótons retornam à matriz através da FoF1-ATP sintase. Esta enzima utiliza fosfato importado para a mitocôndria pelo carreador de fosfato para a fosforilação do ADP à ATP. O ATP sintetizado é exportado para o citosol em troca de ADP pelo translocador de nucleotídeos de adenina

(ANT). A utilização do transporte de prótons através da membrana para a síntese de ATP na matriz mitocondrial pela FoF1-ATP sintase é chamado de acoplamento quimiosmótico. No entanto, estes prótons podem retornar a matriz sem que ocorra a síntese de ATP, pela permeabilidade intrínseca da membrana interna, caracterizando o que é chamado de ‘desacoplamento’ entre o transporte de elétrons ao oxigênio e a síntese de ATP, ou vazamento de prótons (*proton leak*, em inglês). Os prótons ejetados do meio interno da mitocôndria pelos complexos do STE retornam a ele sem passar pelo canal Fo da FoF1-ATP sintase, passo essencial para a fosforilação do ADP. Isto pode ocorrer devido à presença de proteínas desacopladoras, (UCP, do inglês *uncoupling protein*), presentes na membrana mitocondrial interna, que promovem retorno do próton à matriz. O retorno de prótons à matriz mitocondrial também pode ocorrer através da alteração da permeabilidade da membrana interna que em condições de morte celular pode levar a formação de poros transitórios ou PTPC (do inglês *permeability transition pore complex*). O desacoplamento causado por estes mecanismos de ‘vazamento de prótons’ pode estimular o consumo de oxigênio e gerar calor.

Regulação da fosforilação oxidativa

A produção de energia nas células envolve várias vias metabólicas ligadas por intermediários comuns e que agem de forma integrada para realizar sua principal função que é liberar e distribuir energia. A necessidade de ATP, e a produção de precursores para construção de outras moléculas tornam essencial o controle destas vias.

Os fatores que controlam a respiração dependem de uma série de características como o tamanho do sistema analisado (mitocôndria, célula, órgão), as condições presentes (taxa de utilização de ATP, hormônios) e o órgão ou célula examinado. Uma análise de diversas teorias é apresentada na revisão de Brown (1992).

As propostas de Lardy e Wellman (1952) e Chance e Williams (1955, 1956) trouxeram avanços para a compreensão do mecanismo básico pelo qual a respiração mitocondrial é regulada. Baseados em seus trabalhos com mitocôndrias isoladas, introduziram o conceito de que a respiração mitocondrial e a síntese de ATP são controladas pela demanda celular de ATP. Segundo estes trabalhos, o mecanismo pelo qual o aumento na utilização de ATP leva a um aumento na respiração é simplesmente um efeito de limitação pelo substrato: a fosforilação oxidativa é limitada pelas concentrações de ADP (e P_i) e o aumento na utilização de ATP leva a um aumento nos níveis de ADP (e P_i). A partir destes estudos *in vitro*, Chance e Williams definiram os estados respiratórios da mitocôndria (Tabela 1 e Figura 4). Quando a respiração é sustentada apenas por substratos endógenos, sem adenilatos e com fosfato inorgânico no meio de respiração é definido o estado 1. A transição para o estado 2 se faz pela adição de ADP, levando a uma ativação inicial para a depleção dos substratos endógenos. O estado 2 torna-se, então, limitado pelo substrato. O estado 3 é alcançado quando se obtém a ativação da respiração na presença de ADP e substrato, como por exemplo o succinato, na presença de rotenona para inibir o complexo I. Neste estado, a respiração é acelerada e o ADP será gradativamente fosforilado à ATP. Com decréscimo na quantidade de ADP, a respiração fica limitada, caracterizando a transição para o estado 4. Uma segunda adição de ADP irá levar novamente a respiração para o estado 3 com posterior transição para o estado 4. No final, a respiração será limitada pela quantidade de oxigênio disponível na câmara do oxígrafo, estabelecendo o estado 5. Em um protocolo alternativo (Estabrook, 1967), a transição estado 1 para estado 2 é realizada pela adição direta do substrato (piruvato ou succinato por exemplo). O estado 3 é obtido com a adição de ADP e o estado 4 com a fosforilação do ADP à ATP.

Tabela 1. Definição dos estados respiratórios mitocondriais

Estado 1:	Mitocôndria (na presença de Pi)
Estado 2:	Adição de substrato, respiração lenta devido a falta de ADP
Estado 3:	Quantidade limitante de ADP adicionada, respiração é aumentada
Estado 4:	Todo ADP convertido a ATP, respiração se torna mais lenta
Estado 5:	Anoxia

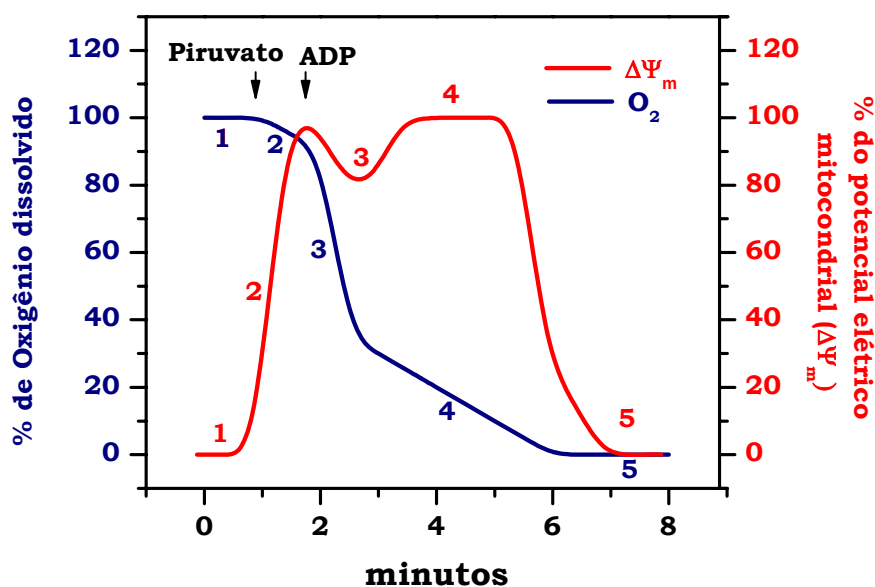


Figura 4: Os estados respiratórios mitocondriais. A figura apresenta a taxa de consumo de oxigênio e o potencial de membrana mitocondrial nos diferentes estados respiratórios definidos por Chance e Williams (1955, 1956). Os números correspondem aos estados respiratórios como definidos na Tabela 1.

1.5- ALTERAÇÕES NO METABOLISMO ENERGÉTICO DE CÉLULAS TUMORAIS

Otto Warburg foi pioneiro em demonstrar que a transformação de uma célula provocava mudanças significativas em seu metabolismo energético quando comparadas com suas células de origem (Warburg, 1956).

A alteração no metabolismo energético mais notória em células tumorais é o aumento em sua capacidade glicolítica. A glicose é um elemento essencial tanto como fonte de energia como uma fonte de carbono para síntese de diversas moléculas essenciais para a célula. Então, não é inesperado que o metabolismo desta molécula seja elevado em muitos tipos celulares, particularmente naqueles com altas taxas de crescimento (Warburg *et al.*, 1956; Pedersen, 1978). Entretanto, em células normais a maior parte da glicose consumida é transformada em piruvato e este último é oxidado na mitocôndria a dióxido de carbono e água. Este processo libera energia livre que é utilizada para a síntese de ATP. Em contraste, células tumorais, mesmo quando em ambientes ricos em oxigênio, transformam o piruvato proveniente da glicose sanguínea em lactato ao invés de oxidá-lo a dióxido de carbono e água, fazendo com que a glicólise seja responsável por uma parte expressiva da geração de energia para a síntese de ATP. Este processo, denominado “efeito Warburg” ou “glicólise aeróbica” é amplamente observado em células tumorais e, de algum modo, contrasta com a regulação das células normais onde a presença do O₂ inibe a glicólise láctica (“efeito Pasteur”). Especula-se que esta característica forneça uma série de vantagens para as células tumorais em relação a suas células de origem. Através da via glicolítica e da utilização da glicose 6-fosfato na via das pentoses, uma série de precursores para biossíntese de ácidos nucleicos, porfirinas, ácidos graxos, colesterol e fosfolipídios são formados. Estes precursores biossintéticos são extremamente úteis para células com altas taxas de crescimento. Outra vantagem está

relacionada com a proteção e invasão destas células. O lactato produzido é liberado acidificando o meio próximo à célula. Esta acidificação do ambiente é prejudicial para as células saudáveis próximas, o que facilita a invasão pelas células tumorais que são resistentes a esta alteração do meio. Além disso, estas células seriam capazes de sobreviver por mais tempo caso o oxigênio se torne limitante (Gatenby e Gillies, 2004).

É importante ressaltar que o “efeito Warburg” (isto é, aumento na taxa glicolítica mesmo na presença de oxigênio) não significa que a célula tumoral utilizará predominantemente ou exclusivamente a glicólise para produção de energia. O que é observado de fato é que a glicólise passa a ter uma contribuição na produção de energia muito mais significativa do que em células normais, que obtém muito mais energia da respiração do que da fermentação, como demonstrado por Warburg (Warburg, 1956). Por exemplo, em um dos casos mais extremos estudados, a produção de ATP mitocondrial foi estimada em torno de 40% e a glicolítica em torno de 60% da produção total (Nakashima *et al.*, 1984). Em contraste, as mitocôndrias da maioria das células normais contribuem com mais de 90% do ATP produzido.

Embora descrito há mais de 70 anos e comprovado em várias linhagens celulares, o “efeito Warburg”, ainda não tem suas causas totalmente esclarecidas e muitos trabalhos têm sido realizados na tentativa de estabelecer os mecanismos que levam a este fenótipo. Uma dificuldade de se encontrar as reais respostas está na necessidade de encontrar um padrão de comportamento e alterações metabólicas que representem todos os diferentes tipos celulares ou ao menos uma grande parte destes. Muitos mecanismos têm sido propostos, no entanto, poucos comprovaram ter uma participação realmente expressiva nesta característica. Um mecanismo que contribui de forma significativa para este fenótipo envolve a ativação de HIF, um fator de transcrição que é estabilizado em resposta à hipóxia.

HIF é um heterodímero composto por duas subunidades HIF-1 α e HIF-1 β . Em condições de hipóxia a subunidade HIF-1 α é estabilizada, seus níveis aumentam, e como consequência a expressão de vários genes é regulada de forma positiva ou negativa. Em adição à hipóxia, o HIF-1 α pode ser induzido por citocinas, fatores de crescimento, espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico ou ainda, pelos intermediários metabólicos, piruvato, lactato e oxaloacetato (Dalgard *et al.*, 2004; Thomas *et al.*, 2004). Em células normais o HIF-1 α está sob um constante processo de degradação e uma ineficiência deste processo pode ser a causa do seu elevado nível em tumores malignos (Guppy *et al.* 2000). As respostas ao aumento nos níveis de HIF1- α incluem uma rápida mudança para o fenótipo glicolítico e um aumento na angiogênese. A angiogênese ocorre em resposta ao aumento nos níveis de VEGF e proporciona o re-estabelecimento de um ambiente apropriadamente suprido de oxigênio e nutrientes para o tumor em crescimento. Uma importante resposta ao HIF-1 α é o aumento de enzimas associadas à membranas, transportadores e trocadores (Pouyssegur *et al.* 2006). Um exemplo é o aumento na expressão de transportadores de glicose (GLUT-1 e GLUT-3) e enzimas glicolíticas (Semenza, 2003; Brahimi-Horn *et al.*, 2007; Moreno-Sánchez *et al.*, 2007). Dois trabalhos recentes mostraram que HIF-1 α também age reprimindo a fosforilação oxidativa. Isto aconteceria devido à indução da piruvato desidrogenase cinase-1, que por sua vez inibiria o complexo da piruvato desidrogenase. Desta forma, o metabolismo de piruvato a acetil-COA seria suprimido (Kim *et al.*, 2006; Papandreou *et al.*, 2006). Atualmente, também já é conhecida a participação de certos oncogenes no “efeito Warburg”, como AKT (Elstrom *et al.*, 2004; Plas *et al.*, 2005), MYC (Kim e Dang, 2005), RAS (Chen *et al.*, 2001; Blum *et al.*, 2005) e de supressores de tumor como a succinato desidrogenase, fumarato hidratase (Gottlieb e Tomlinson, 2005) e p53, estando este último

envolvido com uma deficiência na síntese da citocromo oxidase (Matoba *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2007).

Uma outra alteração marcante que ocorre no metabolismo em decorrência da transformação celular é a alteração na expressão da enzima hexocinase (HK). Em células de mamíferos, existem quatro diferentes isoformas de HK (HK-I, -II, -III e -IV, ou glicocinase) (Wilson, 1995, 1997, 2003). Estas isoformas apresentam diferenças quanto sua distribuição tecidual, peso molecular, distribuição intracelular e parâmetros cinéticos, como a afinidade pelo substrato e a regulação por moduladores. A HK-II é a principal isoforma encontrada em células tumorais, com exceção dos tumores cerebrais, nos quais a principal isoforma é a HK-I. Ambas as isoformas I e II possuem um segmento N-terminal específico, os dez primeiros aminoácidos, que permite que as mesmas se associem à mitocôndria assim como podem ser encontradas livres no citosol. A dinâmica do movimento da HK entre os compartimentos mitocondriais e citosólicos envolve uma série de fatores que incluem concentrações fisiológicas de glicose 6-fosfato, ATP, fosfato inorgânico e pH intracelular (Wilson, 2003). A associação com a mitocôndria ocorre através do canal aniônico dependente de voltagem (VDAC, do inglês *voltage-dependent anion channel*) e parece conferir algumas importantes vantagens no metabolismo das células tumorais. Quando associada à mitocôndria, a enzima apresenta maior atividade específica, é menos sensível à inibição pelo seu produto, a glicose 6-fosfato (um mecanismo de regulação presente nas isoformas solúveis, i.e, não associadas à mitocôndria) e tem um acesso preferencial ao ATP sintetizado pela FoF1-ATP sintase, tornando a reação de formação da glicose 6-fosfato mais eficiente, uma vez que o ATP sintetizado não precisa se difundir no citosol para atingir o sítio catalítico da enzima. Esta localização também já foi implicada como um importante mecanismo de defesa antioxidante, através de um mecanismo de reciclagem do ADP mitocondrial (da-Silva *et al.*, 2004, Hagland *et al.*, 2007). Embora este mecanismo tenha sido demonstrado em

mitocôndrias de células normais, é possível que também seja importante em células tumorais, devido à baixa defesa antioxidante comumente encontrada nessas células (Oberley e Buettner, 1979; Sun *et al.*, 1993).

Além destes fatores, a associação da HK com a mitocôndria parece interferir com a apoptose, prevenindo a mesma, conseqüentemente promovendo a sobrevivência da célula (Gottlob *et al.*, 2001; Pastorino *et al.*, 2002; Vyssokikh *et al.*, 2002; Majewski *et al.*, 2004). A cascata apoptótica em mamíferos compreende várias etapas (Costantini *et al.*, 2000; Hengartner, 2000; Wang, 2001; Kiechle e Zhang, 2002; Youle, 2007). Durante a fase de iniciação, segundos mensageiros pró-apoptóticos que variam de acordo com o estímulo apoptótico presente, acumulam no citosol. Estes agentes irão induzir a permeabilização da membrana mitocondrial levando as células para a fase de decisão. As mudanças apoptóticas da mitocôndria consistem em uma perda do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), inchamento da matriz mitocondrial, ruptura mecânica da membrana externa e/ ou sua permeabilização não específica por poros gigantes e a liberação de proteínas solúveis intermembranares (PSIMs) através da membrana externa (Wolter *et al.*, 1997; Desagher *et al.*, 1999; Youle e Strasser, 2008). A perda da função de barreira da membrana gera várias consequências que contribuem para a morte celular, como alterações bioenergéticas, perda da homeostase redox e perturbação da homeostase iônica. A fase final da cascata apoptótica compreende a ativação de proteases (caspases) e nucleases pelas PSIMs, que irão realizar a degradação intracelular (Zamzami *et al.* 1996; Susin *et al.* 1997; Zou *et al.*, 1997; Hengartner, 2000). Citocromo c, algumas pró-caspases (em particular pró-caspase 2 e 9), SMAC/DIABLO e AIF estão entre as PSIMs que fazem a conexão entre a permeabilização da membrana mitocondrial e ativação do processo de degradação. Destes fatores, o mais estudado é o citocromo c, que se liga a APAF-1 e leva a montagem de um complexo chamado apoptossoma, o qual pode se ligar

e ativar a pró-caspase-9, que por sua vez ativa a caspase-3, levando a degradação de uma série de substratos e ativação de DNases (Wang, 2000; Shi, 2006). Embora o mecanismo de permeabilização da membrana mitocondrial não seja completamente conhecido, acredita-se que Bax e Bak, membros pró-apoptóticos da família Bcl-2, sejam cruciais para este processo. Os membros anti-apoptóticos desta família, como Bcl-2 e Bcl-XL, inibem Bax e Bak, enquanto membros pró-apoptóticos como Bim, Bid, Bad, Bik e outros, ativam Bax e Bak através da ligação e inibição direta da Bcl-2 e outros membros anti-apoptóticos (Wolter *et al.*, 1997; Willis *et al.*, 2007; Youle e Strasser, 2008). No entanto, um modelo oposto propõe a ativação direta de Bax e Bak por algumas proteínas pró-apoptóticas (Bim, tBid e Puma) (Youle, 2007). A permeabilização da membrana mitocondrial interna é um evento crucial no processo de apoptose e algumas evidências sugerem que este evento possa ser causado pela abertura do poro de transição de permeabilidade (PTPC). Entre as proteínas que compõem este complexo está o canal aniônico dependente de voltagem (VDAC), um componente crítico da fase mitocondrial de apoptose. Já foi demonstrado que a dissociação da HK do VDAC está envolvida na liberação do citocromo c para o citosol e na indução de apoptose (Azoulay-Zohar *et al.*, 2004; Abu-Hamad *et al.*, 2008). A prevenção da ligação dos membros pró-apoptóticos Bax e Bak na mitocôndria pela HK mitocondrial (mt-HK) e a participação da proteína cinase B (PKB, também conhecida por Akt) foram sugeridos como mecanismos envolvidos neste processo (Gottlob *et al.*, 2001; Robey e Ray, 2005).

Embora muito destaque seja dado para o metabolismo de glicose pelas células tumorais, outro importante substrato para o metabolismo energético destas células é a glutamina. A glicose e a glutamina estão entre os nutrientes mais abundantes no plasma e juntas são responsáveis pela maior parte do metabolismo de carbono e nitrogênio nas células de mamíferos. A utilização de glutamina é semelhante a da glicose, ou seja, sua utilização pelas células em uma variedade de vias

metabólicas suporta a bioenergética e biossíntese. Assim como demonstrado por Warburg (1956) que células tumorais apresentam um alto consumo de glicose, evidências experimentais indicam que o metabolismo de glutamina pelas células tumorais também excede o uso de outros aminoácidos não-essenciais, sendo esta o principal substrato respiratório para as células tumorais. Tumores em cultura requerem ao menos dez vezes mais glutamina do que qualquer outro aminoácido (Eagle *et al.*, 1956; Kovacevic e McGivan, 1983). Nas células, a glutamina é convertida pela enzima glutaminase, numa reação dependente de fosfato, em amônia e glutamato (Figura 5), e este último segue uma série de reações que geram intermediários metabólicos importantes para o crescimento celular (Figura 6). Como esperado, as células tumorais apresentam uma alta atividade de glutaminase e esta atividade está correlacionada com o consumo de glutamina pelo tumor e suas taxas de crescimento (Linder-Horowitz *et al.*, 1969).

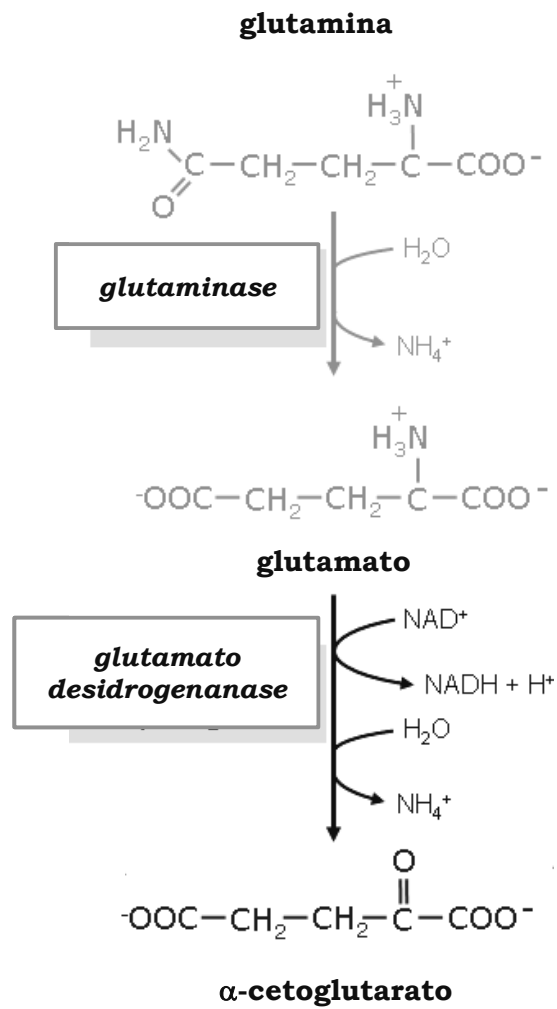


Figura 5: Reações da glutaminase e da glutamato desidrogenase.

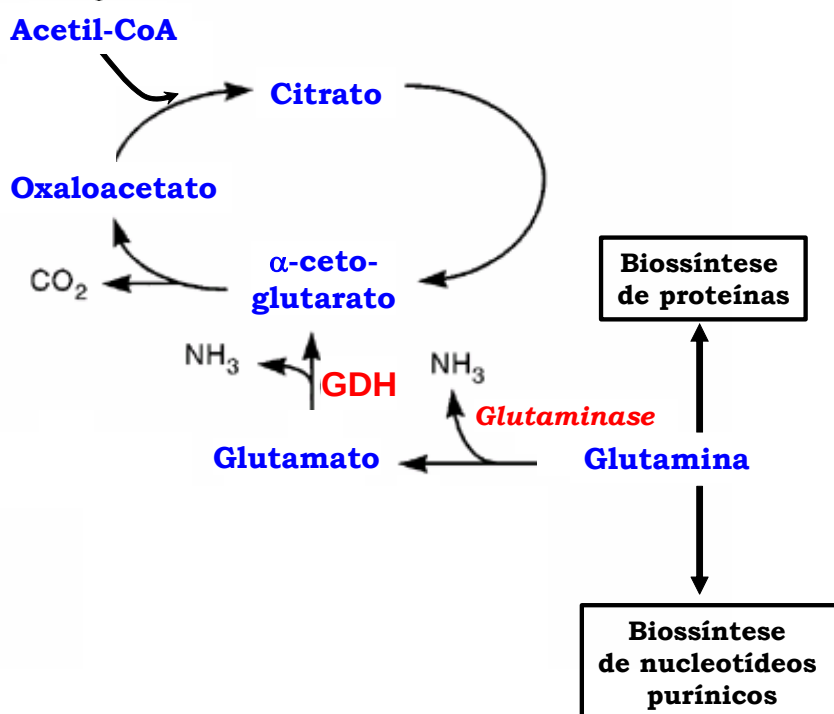


Figura 6: Principais destinos da glutamina em células tumorais. Altas taxas de glutaminólise explicam os elevados níveis de amônia observados em estágios avançados de malignidade. A captação de glutamina pelas células tumorais fornece substrato para a biossíntese de nucleotídeos de purina (síntese do anel purínico) e proteínas, e através da formação de glutamato gera importantes intermediários metabólicos que podem ser utilizados em processos biossintéticos e para produção de energia.

Dados recentes (DeBerardinis *et al.*, 2007) obtidos com a técnica de ressonância magnética nuclear em células SF188 de glioblastoma mostraram que assim como muitas outras células tumorais, estas células exibiram uma alta taxa de consumo de glicose e metabolismo anaeróbico do piruvato. A soma da produção de lactato e alanina representou mais de 90% do metabolismo total de glicose. Portanto, todas as outras atividades dependentes de glicose (glicosilação, síntese de ácidos graxos, gliconeogênese, biossíntese de nucleotídeos, oxidação de piruvato, etc) representaram menos de 10% da utilização total de glicose. Assim como a glicose, a glutamina pode ser degradada à lactato ao invés de ser oxidada completamente (Reitzer *et al.*, 1979).

Os dados de DeBerardinis *et al.* (2007) mostraram que a produção de lactato e alanina representa 60% da utilização total de glutamina (Figura 7). Uma consequência deste fluxo é uma expressiva produção de NADPH pela enzima málica. O fluxo glutaminolítico mostrou-se ser tão alto quanto o fluxo da glicose 6-fosfato desidrogenase na via das pentoses fosfato e pareceu ser maior do que o necessário para síntese de ácidos graxos. Isto pode significar que o NADPH gerado durante a glutaminólise também supre outros processos anabólicos como a biossíntese de nucleotídeos, assim como pode ser usado para a síntese de glutathione, uma importante molécula envolvida na manutenção do estado redox de proteínas e na eliminação de espécies reativas de oxigênio. Assim sendo, o rápido consumo de glutamina pelas células tumorais serve não só para a alta demanda de nucleotídeos, mas também provê uma fonte de carbono para outros processos celulares, como síntese de ácido graxos e outras moléculas, reposição anaplerótica do oxaloacetato no ciclo de Krebs e ainda produção de NADPH, que pode representar um importante fator contribuindo na manutenção do estado redox destas células (Figura 7).

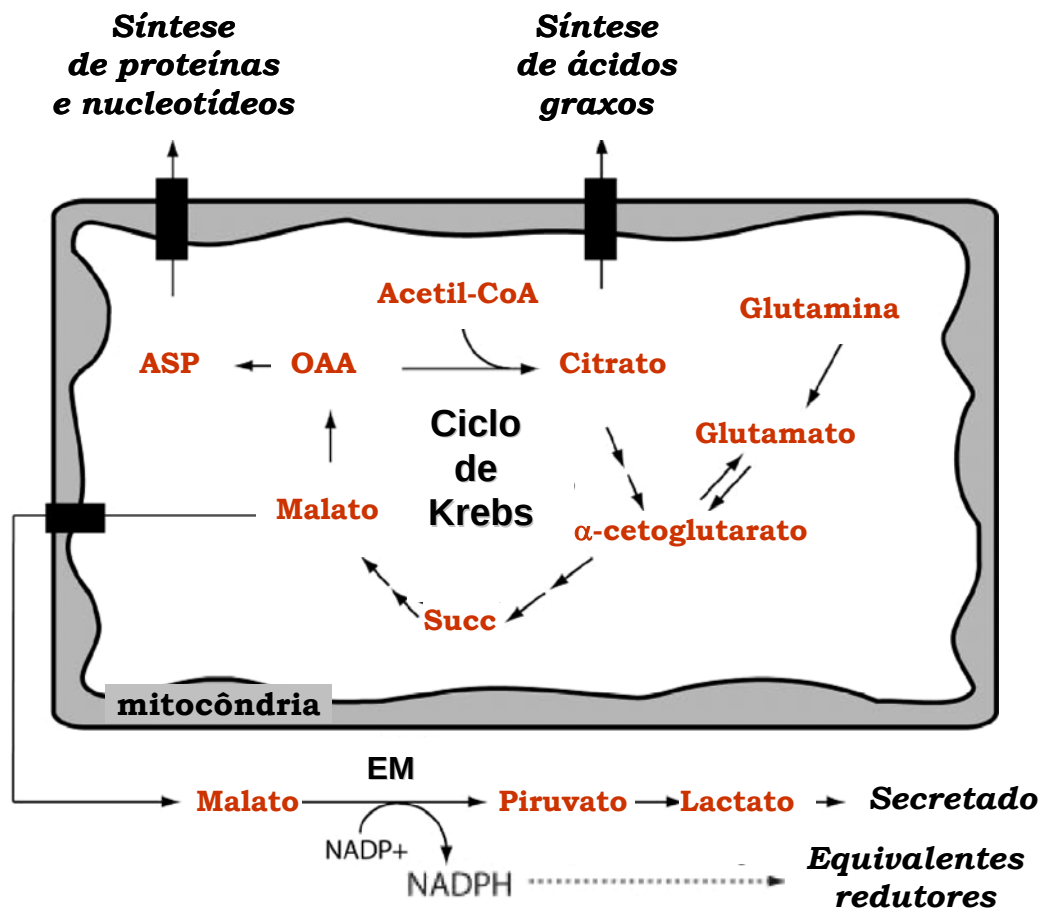


Figura 7: Vias do metabolismo de glutamina em células tumorais. Em tumores existe uma grande retirada de citrato para a síntese de ácidos graxos, oxaloacetato (OAA) para a síntese de proteínas e nucleotídeos, assim como de malato para a síntese de NADPH, piruvato e lactato através da reação da enzima málica. Logo, a glutaminólise é essencial para a reposição do α -cetoglutaratato para a continuidade do ciclo de Krebs. Succ, succinato; OAA, oxaloacetato; Asp, aspartato; EM, enzima málica (adaptado de DeBerardinis *et al.*, 2007).

1.6- 3-BROMOPIRUVATO

A busca por uma molécula com a propriedade de atuar seletivamente nos sistemas de produção de ATP, isto é, na via glicolítica e fosforilação oxidativa de células tumorais, levou Ko e seus colaboradores a testarem o efeito de vários compostos em um modelo de câncer de fígado em coelhos (Ko *et al.*, 2001). Este tumor, o VX2, possui origem epidermóide (Rous *et al.*, 1952), e quando implantado no fígado de coelhos assume as propriedades de crescimento e vascularização similares a HCCs humanos, o que o torna um modelo útil para o estudo do câncer de fígado (Pauser *et al.*, 1996; Geschwind *et al.*, 2000). Além disso, esse modelo apresentou neste estudo o fenótipo bioenergético prevalente de outros HCCs, isto é, alta taxa glicolítica e uma grande fração da hexocinase presente na célula associada à mitocôndria (Ko *et al.*, 2001). Diferentes compostos (2-deoxiglicose (2-DOG), 2-fluor-2-deoxiglicose, 6-fluor-6-deoxiglicose, 3-O-metil glicose, 5-tio-D-glicose-6-fosfato, L-glicose, D-xilose, D-lixose e 3-BrPA) foram testados quanto a sua capacidade de inibição da via glicolítica em fatias isoladas do tumor VX2. Destes, os únicos eficazes em promover uma inibição da via glicolítica foram 2-DOG e 3-bromopiruvato (3-BrPA). No entanto, a concentração de 3-BrPA (2,4 mM) necessária para promover metade da inibição máxima foi significativamente menor do que a concentração necessária de 2-DOG (15 mM) para obter o mesmo efeito. Como os resultados mais promissores foram obtidos com a utilização do 3-BrPA, os autores prosseguiram com objetivo de localizar qual seria o alvo responsável pela ação deste composto na via glicolítica. Devido ao importante papel da hexocinase nesta via e no metabolismo de tumores, o efeito do 3-BrPA em sua atividade foi testado e os resultados mostraram que 5 mM de 3-BrPA inibia completamente a atividade da hexocinase localizada na fração mitocondrial isolada do tumor VX2 (HK-mt). Além disso, o 3-BrPA também foi capaz de inibir completamente a respiração mitocondrial estimulada pela adição de succinato (estado 2)

e pela adição de ADP (estado 3), no entanto, em uma concentração menor (1,2 mM) do que a necessária para inibir a atividade da HK-mt (Ko *et al.*, 2001). Ainda neste estudo, este agente foi capaz de suprimir o crescimento de células AS-30D, uma linhagem de HCC derivada de ratos que apresenta altas taxas glicolíticas e contém elevados níveis de hexocinase mitocondrial.

Embora promissores, estes resultados (Ko *et al.*, 2001) foram obtidos *in vitro* e com concentrações muito altas de 3-BrPA e os possíveis efeitos sobre células normais não foram testados. Desta forma, o estudo realizado posteriormente por este mesmo grupo testou a administração intra-arterial do 3-BrPA nos tumores VX2, em uma adaptação do processo de quimioembolização descrito anteriormente (Geschwind *et al.*, 2002). Apesar de utilizar os benefícios da administração intra-arterial, nesta técnica o material embólico foi omitido (a Figura 8 apresenta uma esquematização da técnica proposta). A administração intra-arterial direta de uma única dose de 3-BrPA (25 ml a 0,5 mM) foi capaz provocar necrose em cerca de 90% das células tumorais. De grande importância também, foi a observação de que nenhum dano ocorreu nos tecidos normais adjacentes ao tumor e em outros importantes tecidos submetidos a análises histológicas (cérebro, coração, intestino delgado, cólon, estômago, rins, tecido adiposo e músculo esquelético). O tratamento também foi administrado sistemicamente e neste caso não afetou os tumores implantados no fígado nem os outros tecidos analisados (os mesmos descritos acima), não causando nenhum dano ao animal. No entanto, o tratamento sistêmico foi capaz de eliminar tumores secundários, pois suprimiu grande parte das metástases identificadas no pulmão como resultado da propagação dos tumores implantados no fígado (Geschwind *et al.*, 2002).

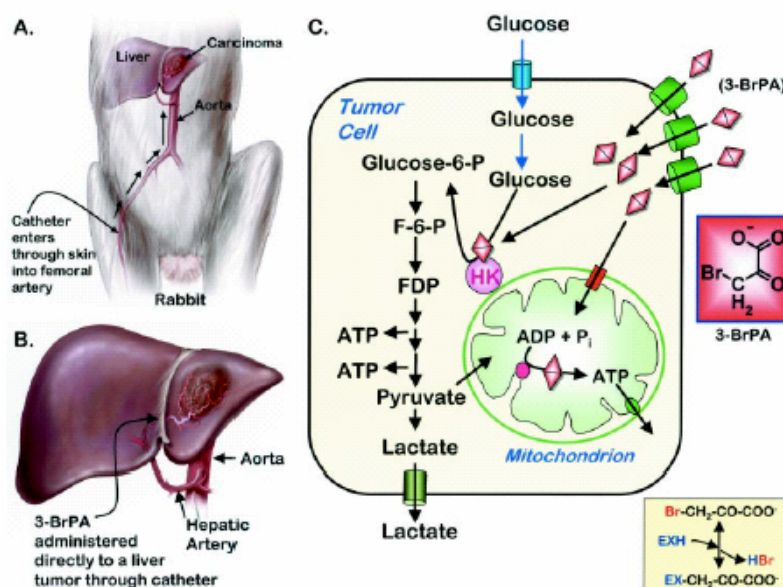


Figura 8. **A** e **B.** Diagramas mostrando o método usado para a administração intra-arterial direta de 3-BrPA em um tumor hepático. **C.** Sítios bioquímicos de ação do 3-BrPA na produção de ATP, sua estrutura, e sua reatividade com grupos funcionais enzimáticos (-XH) (Geschiwind *et al.*, 2002).

Em outro estudo, células AS-30D implantadas em ratos, que cresceram tanto internamente (na cavidade abdominal), quanto externamente (na região dorsal) foram quase completamente erradicadas quando tratadas com injeções intraperitoneais ou intratumorais de 3-BrPA (Ko *et al.* 2004). Nestas mesmas células crescidas em cultura, o 3-BrPA levou a um esgotamento dos níveis de ATP e a perda de viabilidade, enquanto que os hepatócitos não foram afetados. Recentemente foi identificado, em um estudo com um modelo animal para câncer de fígado (VX-2), a dose terapêutica (1,175 mmol/L) e método de administração (uma hora de infusão intra-arterial) mais adequados para o tratamento com o 3-BrPA (Vali *et al.*, 2007).

Os mecanismos que fazem os tecidos saudáveis não serem afetados pelo 3-BrPA ainda não são conhecidos. Devido à sua similaridade

estrutural, o 3-BrPA pode entrar nas células através dos mesmos transportadores que exportam o lactato e especula-se que devido ao maior número de transportadores de lactato presentes nos tumores, quando comparados a células saudáveis, este composto teria um maior acesso às células tumorais. Outra explicação pode ser devido a uma maior quantidade de agentes redutores presentes nas células saudáveis. A ação do 3-BrPA sobre a HK-mt II também já foi especulada como sendo o motivo da diferente sensibilidade entre tecidos saudáveis e tumorais a este agente, devido ao fato desta ser a isoforma predominante nos HCCs, enquanto nos hepatócitos a isoforma é a glicocinase (HK IV ou GK) (Pedersen, 2007a). No entanto, a falta de efeito em células saudáveis deve ser analisada com cuidado, pois em um estudo realizado com coelhos saudáveis, o tratamento com o 3-BrPA mostrou-se tóxico dependendo da concentração utilizada (Chang *et al.*, 2007). Mesmo no trabalho anterior com hepatócitos em cultura, foi observado um efeito tóxico quando usado em concentrações maiores do que as necessárias para afetar as células tumorais (Ko *et al.*, 2004).

Os resultados presentes nestes trabalhos são bastante promissores e fizeram com que o 3-BrPA fosse proposto como um possível agente antitumoral. Mais ainda, este composto foi capaz de eliminar células apresentando o fenótipo de resistência múltipla a drogas (MDR, do inglês *multidrug-resistant*) (Xu *et al.*, 2005). Estas células usam bombas moleculares dependentes de ATP para exportar vários agentes anti-tumorais para o exterior. Então, o esgotamento do ATP intracelular causado pelo 3-BrPA impediria o funcionamento destas bombas, levando à morte celular (como de fato foi observado). As propriedades anti-proliferativas do 3-BrPA são atribuídas à inibição da produção de ATP celular, devido sua ação sobre a fosforilação oxidativa e glicólise, neste caso, agindo diretamente sobre a HK-mt II. Embora os efeitos do 3-BrPA sejam atribuídos quase que exclusivamente a sua ação sobre a hexocinase, é possível que outras enzimas também sejam modificadas/inibidas pelo mesmo. Isto se deve ao fato deste composto

ser um agente alquilante. Então, outras enzimas com grupos tióis e/ou hidroxilas livres que sejam importantes para sua catálise também são potenciais alvos deste agente. De fato, já se demonstrou que várias enzimas relacionadas ao metabolismo energético de mamíferos são inibidas pelo 3-BrPA. Entre estas estão as enzimas málica de fígado de pombo (Chang and Hsu, 1973) e pato (Satterlee e Hsu, 1991), succinato desidrogenase de músculo cardíaco bovino (Sanborn *et al.*, 1971; Kenney, 1975), glutamato desidrogenase de cérebro de camundongo (Tunncliffe, 1978), gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase e 3-fosfoglicerato cinase de espermatozóide de javali (Jones *et al.*, 1995), 6-fosfogliconato desidrogenase de fígado de carneiro (Hanau *et al.*, 1995), piruvato desidrogenase humana (Korotchkina *et al.*, 1999) e piruvato cinase de eritrócito humano (Acan e Ozer, 2001), além do transportador mitocondrial de piruvato em cérebro e fígado de rato (Thomas e Halestrap, 1981). No entanto, grande parte destes trabalhos utilizou ensaios *in vitro* com enzimas purificadas e altas concentrações de 3-BrPA (milimolar), tornando difícil extrapolar estes resultados para situações celulares mais fisiológicas.

Um outro fator importante a ser considerado na ação celular do 3-BrPA é o envolvimento da mitocôndria. Alguns trabalhos mostraram que o 3-BrPA induz a morte celular em HCCs através da ativação de vias mitocondriais de sinalização apoptótica, indicando a importância da mitocôndria na ação desta droga (Gwak *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2007). Gwak *et al.* (2005) observaram que a incubação de células Huh-BAT (uma linhagem derivada de HCC humano) com 0,1 mM de 3-BrPA, por 60 min., promovia a liberação de citocromo c, Smac/DIABLO e AIF no citosol e ativação de caspase 3. Xu *et al.* (2005) demonstraram que a incubação de células HL-60 (linhagem derivada de leucemia humana) com 3-BrPA (0,1-0,3 mM) levava à desfosforilação da Bad (com a desfosforilação máxima em 8 horas de incubação), ocorrendo um simultâneo deslocamento da Bax para a mitocôndria, seguida da liberação de citocromo c para o citosol e a clivagem da

caspace 3. Mais recentemente foi demonstrado que o tratamento de células Huh-BAT ou MH134 (uma linhagem derivada de HCC de camundongo) com 0,1 mM de 3-BrPA por 3 horas causou uma diminuição dos níveis de mt-HK-II em imunoprecipitados de PTPC destas células e induziu apoptose através da ativação da via de sinalização apoptótica mitocondrial (Kim *et al.* 2007).

O conhecimento atual sobre as propriedades do 3-BrPA indica um futuro promissor para o uso desta molécula no tratamento contra HCCs. Entretanto, maiores informações quanto aos mecanismos e efeitos deste agente em células de HCCs humanos em cultura, assim como em outros tipos celulares são necessárias e seriam de grande valor para seu futuro uso terapêutico. Este tipo de informação auxiliará não somente na sua aplicação em HCCs, mas também em outros tipos de neoplasias e poderá também evitar possíveis efeitos não desejáveis em células normais.

2-OBJETIVOS

De acordo com o exposto na introdução desta tese, este trabalho visa estabelecer um melhor entendimento da ação do 3-BrPA no metabolismo energético de células HepG2, derivadas de um HCC humano. Um interesse especial quanto a sua ação na respiração mitocondrial foi estabelecido devido à importância desta organela na sobrevivência celular, seu envolvimento na ação deste composto e a falta de informações disponíveis a este respeito.

Os seguintes objetivos foram, então, delineados:

- Estabelecer uma relação entre a dose e tempo de exposição ao 3-BrPA na viabilidade celular, utilizando para isto diferentes concentrações e tempos de incubação com o mesmo;
- Analisar o efeito da incubação das células com 3-BrPA na glicólise e avaliar a participação da hexocinase mitocondrial neste processo;
- Estabelecer os mecanismos de ação do 3-BrPA na respiração mitocondrial;
- Analisar o efeito de diferentes substratos energéticos disponíveis para as células na resposta ao 3-BrPA.

3-MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Cultura de células

Neste estudo foram utilizadas células HepG2, uma linhagem derivada de carcinoma hepatocelular humano. As células foram obtidas através da American Type Collection (ATCC; USA) e mantidas em uma câmara de incubação umidificada a 37°C e 5% de CO₂ (Forma Scientific, CO₂ Water Jacketed Incubator). A cultura foi realizada em recipientes de plásticos apropriados (TPP, Suíça) e em meio de cultura MEM (*Minimum Essential Medium*, Invitrogen Corporation, EUA, nº 41500-083) com L-glutamina 2 mM, D-glicose 5,5 mM, sais de Earle's e aminoácidos não-essenciais. Este meio foi suplementado com soro fetal bovino 10% , bicarbonato de sódio 0,22% e Hepes 0,2%, pH 7,4.

As células foram plaqueadas em uma densidade de 10⁵ células/ml. Após 48 horas do plaqueamento, as células tinham metade de seu meio de cultura renovado. O sub-cultivo destas células era realizado duas a três vezes por semana com sua remoção da superfície de cultivo através da adição de uma solução de tripsina-EDTA 0,25% (p/v) e transferência para novos recipientes com superfície e meio de culturas adequados para seu crescimento. Para os ensaios foram utilizadas células com 90-95% de confluência, mantidas em placas de Petri de plástico (60,1 cm²), com exceção dos ensaios de viabilidade, quando foram utilizadas placas de 24 poços.

3.2- Solução neutra de 3-bromopiruvato

A solução de 3-BrPA utilizada em todos os ensaios deste trabalho foi preparada em Tris-HCl 0,5 M pH 7,4, para uma concentração final de 25 mM de 3-BrPA e quando necessário, diluições adicionais foram realizadas utilizando o mesmo tampão.

3.3-Viabilidade celular

3.3.1-Ensaio MTT

MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazoliobrometo) é um composto amarelo-pálido que quando reduzido assume uma coloração roxa. Ao ser adicionado à cultura celular, o composto é reduzido por desidrogenases mitocondriais de células metabolicamente ativas/viáveis, formando um precipitado roxo, denominado formazan, que pode ser quantificado espectrofotometricamente e correlacionado com a proliferação/ viabilidade celular. Este método foi descrito pela primeira vez por Mosmann (1983) e estudos posteriores confirmaram sua eficácia (Ferrari *et al.*, 1990; Van De Loosdrecht *et al.*, 1994).

No início do experimento, diferentes concentrações (0,005 a 5 mM) de uma solução neutra de 3-BrPA foram adicionadas à cultura celular e incubadas por 30, 60, 90 e 180 min. a 37°C. Em seguida, o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas duas vezes com uma solução de BSS (Na₂HPO₄ 0,16g/L, NaCl 8g/L, KCl 0,4g/L, CaCl₂, 0,16g/L, MgSO₄ 0,154g/L, Glucose 1,1g/L, pH 7,4) e incubadas com uma solução de MTT (0,5 mg/ml) preparada em BSS, por 3h a 37°C. Após o período de incubação, a solução de MTT foi removida e o precipitado de formazan formado foi dissolvido mediante a adição de uma solução de HCl 0,04 M em isopropanol. A solução resultante foi centrifugada a 17.000g por 2 min. e a absorvância do sobrenadante resultante foi medida a 570 nm e 690 nm com a utilização de um espectrofotômetro (UV mini 1240, Shimadzu, Japão). A diferença entre os valores de absorvância obtidos a 570 nm e 690 nm (usado como “background”) foi considerado como um índice de viabilidade celular.

3.3.2- Ensaio de viabilidade por exclusão de azul de tripan

Azul de tripan é um corante derivado da toluidina, utilizado para corar seletivamente células mortas. Como células são muito seletivas quanto aos compostos que passam através de suas membranas, em uma célula viável, o azul de tripan não será absorvido. No entanto, ele atravessa a membrana de uma célula morta. Desta forma, células vivas ou com membranas intactas não são coradas, enquanto que células mortas apresentam uma coloração azul distinta quando observadas ao microscópio.

3.4-Animais

Foram utilizados camundongos suíços disponíveis no biotério localizado no Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas, forradas com maravalha autoclavada, em ambiente com temperatura (20°C) e ciclo de luz (12h/12h) controlados, recebendo suplemento vitamínico semanal, ração comercial apropriada e água filtrada. O sacrifício dos animais foi realizado através do deslocamento cervical.

3.5- Produção de lactato pelas células HepG2

O meio de cultura das células foi removido e duas lavagens com PBS (NaCl 8g/L, KCl 0,2g/L, Na₂HPO₄ 1,2g/L, KH₂PO₄ 0,2g/L, pH 7,4) foram realizadas. Em seguida, novos meios de cultura foram adicionados às células. Dois diferentes meios foram utilizados: meio sem glicose (DMEM, Invitrogen, USA, nº 11966-025) o qual contém apenas glutamina (4 mM) como substrato oxidável ou meio sem glicose suplementado com glicose (5 mM). Ambos os meios foram suplementados com Hepes 0,02 %. Em seguida, 3-BrPA 150 µM foi adicionado à cultura e incubado a 37°C por até 60 min. Aos 30 min. de

incubação 2µg/ml de antimicina A foi adicionada à cultura (com a finalidade de inibir a respiração mitocondrial). Amostras do meio de cultura foram retiradas durante a incubação nos tempos indicados (0, 15, 30, 40, 50, 60 min.), e mantidas em gelo para posterior quantificação de lactato. O ensaio para a quantificação de lactato foi realizado em um tampão glicina/hidrazina, pH 9,2 contendo 15 mM NAD⁺, 30 U/ml de lactato desidrogenase, a amostra a ser analisada (50 µl) em um volume final de reação de 200 µl. Uma curva padrão de lactato foi realizada nas mesmas condições de ensaio descritas acima e utilizada como referência. A absorvância das amostras devido à formação de NADH foi monitorada em um leitor de microplacas (SpectraMax M5, Molecular Devices, USA) por 30 min. a 340nm e correlacionada com a presença de lactato nas amostras da curva padrão (Hamilton e Padue, 1984).

3.6- Isolamento de mitocôndrias de cérebro de camundongos

Mitocôndrias de cérebro de camundongo (30 g) foram isoladas por centrifugação diferencial como descrito anteriormente (da-Silva *et al.*, 2004; Maciel *et al.*, 2004) com pequenas modificações. Após o sacrifício dos animais seus encéfalos eram rapidamente removidos e colocados em 3 volumes de um tampão gelado contendo manitol 225 mM, sacarose 75 mM, K⁺-EGTA 1 mM, albumina livre de ácidos graxos de soro bovino 0,1%, K⁺-HEPES 10 mM, pH 7,2. O tecido foi cortado em pequenos pedaços com a utilização de tesoura cirúrgica e lavado diversas vezes com o tampão. Em seguida, o tecido foi homogeneizado manualmente em 10 ciclos com o auxílio de um homogeneizador Potter-Elvehjem (Wheaton Sci.,USA). O homogeneizado foi centrifugado por 3 min. a 2.000g (Hitachi SCR 20B, Tokyo, Japão). Após a centrifugação, o sobrenadante foi centrifugado novamente por 8 min. a 12.000g. O

precipitado final foi adicionado ao mesmo tampão descrito acima e após a quantificação de proteínas foi utilizado nos experimentos.

3.7- Preparação de glicocinase de fígado de camundongos

Glicocinase foi preparada a partir de extratos solúveis de fígado de camundongos. Após o sacrifício do animal, o fígado foi removido e homogeneizado em 10 ciclos com o auxílio de um homogeneizador Potter-Elvehjem contendo 3 volumes do seguinte tampão gelado: trietanolamina 20 mM, EGTA 5 mM, glucose 100 mM, KCl 100 mM, DTT 1 mM, glicerol 5%, EDTA 5 mM, NaN₃ 0,25%, PMSF 0,5 mM pH 7,5. O homogeneizado foi centrifugado a 100.000g por 40 min. Ao sobrenadante resultante foi adicionado (NH₄)₂SO₄ para 45% de saturação (25,8 g/ 100 ml), seguido de centrifugação a 15.000g por 10 min. Ao novo sobrenadante foi adicionado (NH₄)₂SO₄ para 65% de saturação (14 g/ 100 ml). O precipitado final foi adicionado ao mesmo tampão utilizado na homogeneização e após a quantificação de proteínas foi utilizado nos experimentos.

3.8- Preparação da fração mitocondrial de células HepG2

A fração mitocondrial de células HepG2 foi obtida através de centrifugação diferencial segundo uma adaptação do protocolo descrito por Graham e Rickwood (1997). O meio de cultura foi removido e foram realizadas duas lavagens com PBS para sua remoção completa. As células foram lisadas pela adição de N₂ líquido, seguido da adição de um tampão contendo Tris 10 mM, NaF 20 mM, DTT 1 mM, sacarose 250 mM, EDTA 5 mM, PMSF 1 mM, leupeptina 10 µM, pepstatina A 1 µM, pH 7,0. A suspensão foi centrifugada a 1.000g por 5 min a 4°C, e o sobrenadante resultante centrifugado a 10.000g por 15 min a 4°C. O

precipitado final foi adicionado ao mesmo tampão descrito acima e após a quantificação de proteínas foi utilizado nos experimentos.

3.9- Medida das atividades da HK mitocondrial tipo I, HK mitocondrial tipo II e glicocinase

Para a medida da atividade da hexocinase mitocondrial tipo I (HK-mt I) foram utilizadas mitocôndrias isoladas do cérebro de camundongos. A atividade da hexocinase mitocondrial tipo II (HK-mt II) foi medida na fração mitocondrial de células HepG2. A isoforma solúvel da hexocinase, a hexocinase tipo IV, ou glicocinase (GK), teve sua atividade medida em preparações obtidas a partir de extratos citosólicos de fígado de camundongo. Os procedimentos realizados para estas preparações encontram-se descritos nas seções 3.7, 3.8 e 3.9.

As medidas de atividades foram realizadas através de uma adaptação de um ensaio radiométrico descrito previamente (Sola-Penna *et al.*, 2002; Pereira da Silva *et al.*, 2004). O ensaio foi realizado a 37°C em 0,4 ml de um meio de reação contendo Tris-HCl (pH 7,5) 20 mM, MgCl₂ 5 mM, [γ -³²P] ATP (3000 cpm/nmol ATP) 1 mM, glicose 10 mM (mt-HK I e II) ou glicose 100 mM (GK), NaVO₄ 1 mM, NaN₃ 5 mM e diferentes concentrações de 3-BrPA. Duplicatas foram realizadas para todos os ensaios e brancos foram obtidos na ausência de glicose. A reação foi iniciada pela adição de proteína (0,1 mg/ml) e interrompida pela adição de 1 ml carvão ativado em HCl 0,1 N e manitol 0,5 M, para remoção do [γ -³²P] ATP não utilizado na reação. Após centrifugação (1000g por 15 min.), alíquotas de 0,4 mL dos sobrenadantes foram adicionadas a um *vial* contendo líquido de cintilação e contado em um cintilador (Tri-Carb 1600CA, Packard Corporation, USA). A radioatividade resultante era relacionada a [³²P]-glicose-6-fosfato formada pela reação catalisada pela hexocinase.

3.10- Atividade da succinato desidrogenase de células HepG2

A atividade da succinato desidrogenase (SDH) foi determinada espectrofotometricamente usando DCPIP(2,6-dichlorophenolindophenol) como um acceptor artificial de elétrons e succinato como substrato (Paul *et al.*, 2007; Robinson e Lemire, 1995). DCPIP é um composto azul usado como um corante redox. DCPIP oxidado é azul, enquanto o reduzido é incolor. O ensaio foi realizado à temperatura ambiente em um volume final de 1 ml de um meio de reação contendo tampão fosfato 20 mM (pH 7,2), 0,1 % Triton X-100, NaN_3 4 mM, succinato 5 mM, DCPIP 0,05mM e as concentrações de 3-BrPA indicadas (2,5 a 300 μM). Brancos foram obtidos na ausência de succinato. A reação foi iniciada pela adição de 0,1 mg/ml de fração mitocondrial de HepG2 e a redução do DCPIP foi monitorada por 3 min. à temperatura ambiente. A fração mitocondrial das células HepG2 foi preparada exatamente como descrito para dosagem da atividade da hexocinase, no entanto, o tampão utilizado neste processo não continha DTT. A atividade da SDH foi calculada usando o coeficiente de extinção molar do DCPIP de $21,0 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ e foi expressa como nanomoles de DCPIP reduzido por minuto por miligrama de proteína. A atividade da SDH na presença do 3-BrPA é apresentada como um valor percentual da atividade controle.

3.11- Quantificação de proteínas

As quantificações de proteínas das preparações para dosagem das atividades enzimáticas das isoformas de hexocinase e succinato desidrogenase foram realizadas pelo método descrito por Lowry *et al.* (1951).

3.12- Consumo de oxigênio em células HepG2

3.12.1- Preparação das células para análises do consumo de oxigênio

Para as medidas de consumo de oxigênio realizadas em células permeabilizadas com digitonina, o meio de cultura das células foi removido e duas lavagens com BSS a 37°C foram realizadas. As células foram removidas dos recipientes de cultivo pela adição de uma solução de tripsina-EDTA 0,25% (p/v). Esta suspensão foi adicionada a um tubo tipo *falcon* contendo meio MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, e centrifugada por 5 min. a 1.000g (Fanem, Excelsa II, São Paulo, Brasil). O precipitado de células foi ressuspensionado em BSS a 37°C e novamente centrifugado por 5 min. a 1.000g. Este procedimento foi repetido por mais três vezes e o precipitado final foi adicionado a um meio de respiração descrito anteriormente por Sakurai e Cederbaum (1998), com algumas modificações (manitol 0,25 M, albumina livre de ácidos graxos de soro bovino 0,1%, MgCl₂ 10 mM, KH₂PO₄ 10 mM, pH 7,2). Para as medidas realizadas em células intactas, o mesmo procedimento descrito acima foi realizado, exceto a adição de digitonina. O BSS utilizado nas lavagens foi substituído por meio de cultura e o precipitado final de células foi ressuspensionado neste mesmo meio.

O efeito do 3-BrPA nas propriedades respiratórias das células HepG2 foi analisado das seguintes formas descritas abaixo (Figura 9):

3.12.2- Consumo de oxigênio de células HepG2 permeabilizadas com digitonina na presença de diferentes concentrações de 3-BrPA

Neste ensaio o consumo de oxigênio foi medido polarograficamente em um oxígrafo usando um eletrodo do tipo Clark (Oxytherm, Hansatech Instrument, United Kingdom) inserido em uma câmara de 1 ml de volume equipada com um agitador magnético. O

eletrodo foi calibrado entre 0 e 100% de saturação com o oxigênio atmosférico a 37°C. A suspensão de células (5×10^6) obtida como descrito na seção anterior foi adicionada à câmara do aparelho contendo o meio de respiração e em seguida foram permeabilizadas pela adição de digitonina (0,005% w/v). Quando indicado, succinato 10 mM (substrato do complexo II), ADP 100 μ M (modulador, substrato da síntese de ATP) 3-BrPA (0,05 mM a 0,4 mM) e 1 μ M FCCP (ionóforo com ação desacopladora entre o consumo de oxigênio e a síntese de ATP) foram adicionados.

3.12.3- Consumo de oxigênio de células HepG2 intactas pré-incubadas com 3-BrPA

O procedimento realizado para pré-incubação com o 3-BrPA foi o mesmo realizado para os ensaios de quantificação de lactato. O meio das células foi removido e duas lavagens com PBS foram realizadas. Foram adicionados às células meio sem glicose, que continha apenas glutamina (4 mM) ou meio com glicose , que continha glicose (5 mM) e glutamina (4 mM), suplementados com Hepes 0,02 %. Em seguida, 3-BrPA 150 μ M foi adicionado à cultura e incubado a 37°C por 30 min.

Após a pré-incubação as células foram preparadas como descrito na seção 3.12.1 para células intactas, e o mesmo meio usado na incubação foi utilizado nas lavagens e para ressuspender o precipitado final de células.

Aproximadamente 5×10^6 células foram adicionadas à camara do oxígrafo (Oxytherm, Hansatech Instrument, United Kingdom) contendo meio sem glicose ou meio com glicose e o consumo de oxigênio foi medido usando um eletrodo tipo Clark como descrito acima.

A respiração basal foi registrada após a adição das células ao meio e representa o consumo de oxigênio das células intactas com os substratos endógenos e presentes no meio de cultura. A respiração

insensível à oligomicina, ou *proton leak*, foi acessada após a adição de 1 µg/ml de oligomicina. A oligomicina inibe o retorno dos prótons localizados no espaço intermembranas para a matriz mitocondrial devido à inibição que exerce na subunidade Fo do complexo V ou FoF1-ATP sintase, localizada na membrana mitocondrial interna. Desta forma, o consumo de oxigênio remanescente após sua adição é devido a passagem dos prótons para o interior da mitocôndria por outros meios independente da passagem pela subunidade Fo da FoF1-ATP sintase. Este consumo é considerado como consumo de oxigênio não associado à síntese de ATP e reflete o estado de permeabilidade da membrana interna mitocondrial aos prótons.

Com o intuito de avaliar a capacidade máxima de transporte de elétrons pelo STE, o consumo de oxigênio máximo foi obtido após a adição de FCCP, um ionóforo que carrega os prótons de volta à matriz mitocondrial levando à um desacoplamento entre o consumo de oxigênio e a síntese de ATP.

3.12.4- Consumo de oxigênio de células HepG2 permeabilizadas com digitonina pré-incubadas com 3-BrPA

O procedimento de pré-incubação das células com 3-BrPA foi o mesmo descrito na seção 3.12.3. A preparação da suspensão de células foi realizada como descrita na seção 3.12.1 para células permeabilizadas.

Para esta avaliação foi utilizada respirometria de alta resolução (OROBOROS® Oxygraph-2K, Instruments, Innsbruck, Austria). Este equipamento permite a utilização de um número menor de células e fornece resultados com um grau de resolução muito superior, uma vez que é possível acompanhar pequenas mudanças no fluxo de consumo de oxigênio pelas células em tempo real, permitindo a identificação de pequenas diferenças entre os tratamentos.

Aproximadamente $2,5 \times 10^6$ células foram adicionadas à câmara do aparelho contendo meio de respiração (volume final 2 ml). Após o registro da respiração basal, as células foram permeabilizadas com digitonina (0,005% w/v). Quando indicado os seguintes substratos e/ou moduladores foram adicionados: piruvato 10 mM + malato 10 mM (substratos relacionados ao complexo I), succinato 10 mM, rotenona 1 μ M (inibidor do complexo I), ADP 50 μ M, oligomicina 1 μ g/ml e FCCP nas concentrações indicadas.

O fluxo de consumo de oxigênio em tempo real é dado pela equação do programa DatLab:

$$J_{O_2} = -dC_{O_2}/dt \cdot 10^3 - (C_{O_2} \cdot b^0 + a^0)$$

Onde:

J_{O_2} = Fluxo de oxigênio volume específico (pmol . s⁻¹ . ml⁻¹);

C_{O_2} = Concentração de O₂ em μ M;

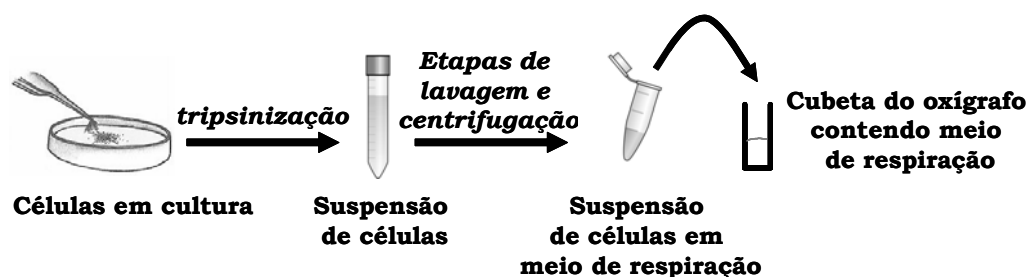
J^0_{v, O_2} = Fluxo do consumo de oxigênio pelo sensor polarográfico
($C_{O_2} \cdot b^0 + a^0$);

b^0 = Pendente da reta;

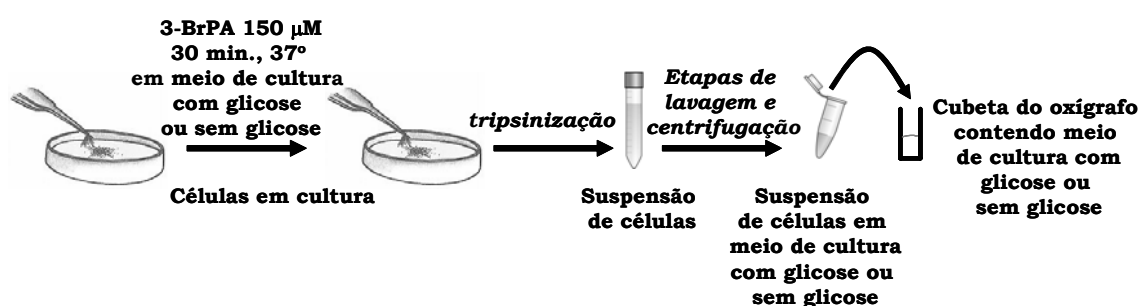
a^0 = Fluxo de retrodifusão de O₂ do sistema a zero oxigênio dissolvido (-1,5 pmol . s⁻¹ . ml⁻¹).

Os valores a^0 e b^0 são previamente determinados na calibração do oxigênio dissolvido no oxígrafo OROBOROS® Oxygraph-2K.

Consumo de oxigênio de células HepG2 permeabilizadas com digitonina na presença de diferentes concentrações de 3-BrPA



Consumo de oxigênio de células HepG2 intactas pré-incubadas com 3-BrPA



Consumo de oxigênio de células HepG2 permeabilizadas com digitonina pré-incubadas com 3-BrPA

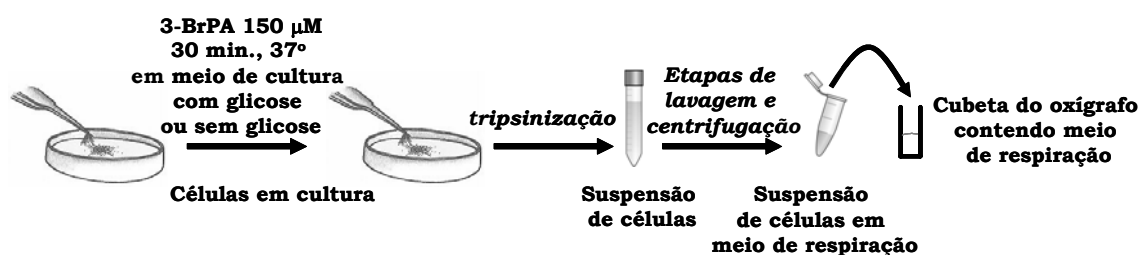


Figura 9. Esquemas mostrando um resumo das etapas do procedimento realizado para as medidas de consumo de oxigênio em células HepG2 (maiores detalhes são descritos no texto).

3.13-Determinação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

O potencial de membrana mitocondrial foi medido em células HepG2 permeabilizadas pelo uso do sinal de fluorescência do corante catiônico safranina O, que é acumulado no interior da mitocôndria e tem sua fluorescência suprimida em função do potencial elétrico negativo da matriz, e positivo no espaço intermembranas (Akerman e Jarvisalo, 1980). As células foram preparadas exatamente como descrito na seção 3.12.1 para o consumo de oxigênio em células permeabilizadas. Aproximadamente 5×10^6 células em suspensão foram adicionadas a uma cubeta com volume final 2 ml, contendo o meio de respiração, digitonina (0,005% w/v) e safranina O 5 μ M. Diferentes substratos/moduladores foram adicionados e são indicados na legenda da figura (Figura 15), quando apresentado o resultado. A fluorescência foi detectada no comprimento de onda de 586 nm (slit 4 nm) após a excitação da amostra em 495 nm (slit 5 nm), em um espectrofluorímetro Hitachi modelo F-3010 (Tokyo, Japan).

3.14- Análise Estatística

A análise estatística e a construção dos gráficos foram realizadas no programa Origin® 7.5 (OriginLab Corporation, USA). Os resultados são apresentados como médias $\pm$ erro padrão para n experimentos independentes. A significância estatística foi determinada pelo teste t de Student. Diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$ ou $p < 0,01$.

4-RESULTADOS

4.1- 3-BrPA reduz a viabilidade de células HepG2.

A viabilidade de células HepG2 incubadas na presença de 3-BrPA foi acessada com a utilização do método MTT como descrito na seção Material e métodos. Com o intuito de melhor caracterizar a relação entre a concentração e o tempo de exposição ao composto e a perda da viabilidade celular, foram utilizadas diversas concentrações de 3-BrPA (5 μ M a 5000 μ M) e diferentes tempos de incubação (30, 60, 90 e 180 min.). A Figura 10A mostra que a incubação com 3-BrPA causa a perda da viabilidade das células HepG2 de uma forma dependente da concentração e do tempo utilizado. Enquanto a concentração mais baixa utilizada (5 μ M) não foi capaz de alterar a viabilidade das células em nenhum dos tempos testados, concentrações mais altas (1-5mM) promoveram mais do que 30% de redução na viabilidade em todos os tempos testados ($p < 0,05$). A maior concentração (5 mM) diminuiu em 70% ($p < 0,05$) a viabilidade das células em apenas 30 min. de incubação. No tempo mais longo de incubação (180 min.), esta concentração (5 mM) eliminou 100% das células viáveis. Pode-se ainda observar que enquanto a incubação com 5-100 μ M de 3-BrPA por 60 min. não alterou de forma significativa a viabilidade das células, uma concentração baixa (50 μ M) foi capaz de reduzir em 50% a viabilidade quando incubada por tempos mais longos, como 180 min. ($p < 0,05$).

Um outro método de análise da viabilidade celular, o método de exclusão do azul de tripan, também foi utilizado. Foram testados três tempos de incubação (30, 60 e 180 min.) e três concentrações de 3-BrPA (5, 50 e 150 μ M). Os resultados apresentados na Figura 10B confirmam os resultados obtidos com o método MTT e confirmam a eficácia deste para a avaliação da viabilidade das células HepG2 incubadas na presença de 3-BrPA.

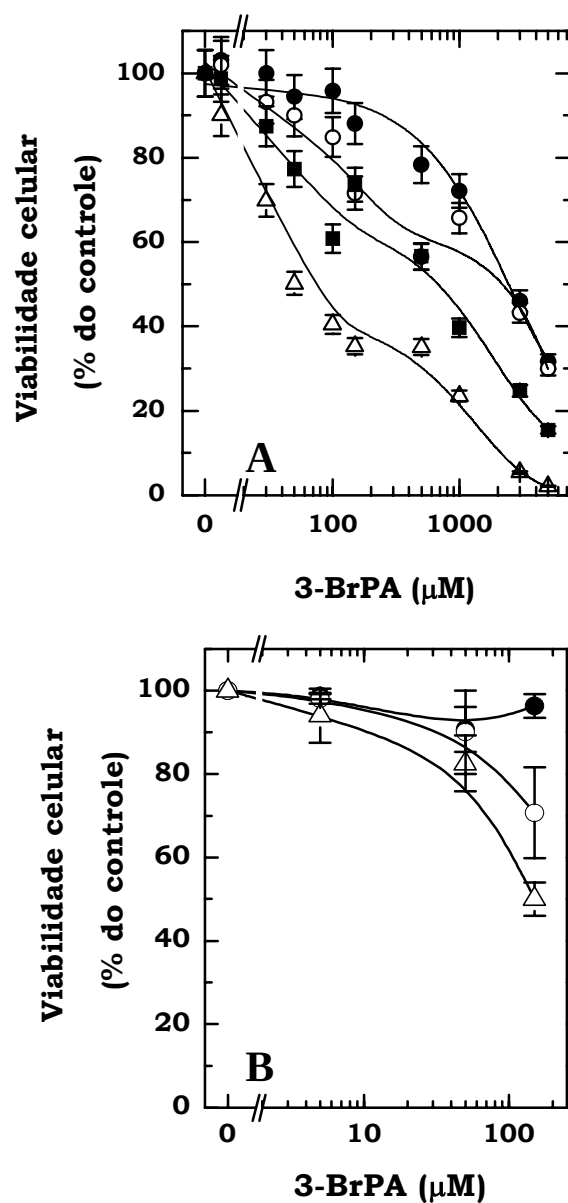


Figura 10. Incubação com 3-BrPA diminui a viabilidade de células HepG2 de um modo dependente do tempo e concentração. (A) As células em cultura foram incubadas com diferentes concentrações de 3-BrPA (5 μM a 5000 μM) por (●) 30, (○) 60, (■) 90 ou (Δ) 180 min. Após, a viabilidade das células foi determinada pelo método MTT como descrito em Material e métodos. **(B)** Células em cultura incubadas com 0, 5, 50, 150 μM de 3-BrPA por (●) 30, (○) 60, ou (Δ) 180 min. tiveram suas viabilidades determinadas adicionalmente pelo método de exclusão do azul de tripan. Os valores representam a média ± erro padrão; n=5.

Tabela 2: Valores de IC₅₀ para a viabilidade celular em diferentes tempos de incubação com 3-BrPA (Os valores representam a média $\pm$ erro padrão; n=5).

Tempos (min)	IC ₅₀ (mM)
30	2,4 $\pm$ 0,14
60	2,1 $\pm$ 0,12
90	0,68 $\pm$ 0,04
180	0,076 $\pm$ 0,04

4.2- 3-BrPA em baixa concentração diminui a produção de lactato pelas células HepG2.

A disponibilidade de glicose é um importante fator no controle da produção de energia para sobrevivência de células tumorais. Para avaliar a participação da via glicolítica na perda de viabilidade das células HepG2 causada pelo 3-BrPA, a produção de lactato foi analisada em células incubadas com 150 μ M de 3-BrPA por até 60 min (Figura 11). A escolha desta concentração e tempo foi feita com base nos resultados apresentados na Figura 10. Esta concentração não apresentou alterações significativas na viabilidade celular em até 30 min. de incubação e apresentou uma redução de apenas 25% na viabilidade em 60 min. de incubação (Figura 10). Desta forma, seria possível estabelecer uma relação temporal entre a causa e o efeito de perda de viabilidade pelas células na presença de 3-BrPA. Além disso, com o objetivo de avaliar a contribuição da utilização de substratos endógenos, como o glicogênio, e da utilização de glutamina (através da glutaminólise, ver Figura 7) na produção de lactato e o efeito do 3-BrPA nestas condições, as células foram incubadas em um meio com glicose (contendo glicose e glutamina como substratos oxidáveis) ou em um meio sem glicose (contendo somente glutamina como substrato oxidável).

Aos 30 min. de incubação de todos os tratamentos foi adicionada ao meio de cultura das células antimicina A, um inibidor da fosforilação oxidativa (inibe a transferência de elétrons pelo complexo III do STE) (Figura 11). Esta situação tornaria as células dependentes somente da glicólise para a produção de ATP, uma vez que a fosforilação oxidativa estaria comprometida. Nesta condição, é esperado que a formação de lactato seja estimulada, mimetizando o “efeito Pasteur” (D'Aurelio *et al.* 2001 and Merlo-Pich *et al.*, 2004). De fato, a adição de antimicina A ao meio de cultura das células controle incubadas em um meio com glicose, causou um aumento de 3 vezes na produção de lactato (Figura

11A, círculos abertos) ($p<0,05$). A incubação das células com 3-BrPA em um meio com glicose causou uma diminuição de 3 vezes na produção de lactato quando comparadas às células controle ($p<0,05$) (Figura 11A, círculos fechados e abertos, respectivamente). Um fato intrigante foi que nenhuma alteração na produção de lactato foi observada quando antimicina A foi adicionada a estas células (células incubadas com 3-BrPA na presença de glicose) (Figura 11A, círculos fechados). A falta de resposta à adição de antimicina A sugere que a fosforilação oxidativa destas células já se encontrava inibida pelo 3-BrPA.

Como esperado, as células controle que foram incubadas em um meio sem glicose apresentaram uma diminuição significativa (16 vezes) na taxa de formação de lactato quando comparadas às células controle incubadas em um meio com glicose (Figura 11A, círculos e triângulos abertos, respectivamente) ($p<0,05$). A Figura 11B mostra uma ampliação dos dados obtidos na ausência de glicose apresentados na Figura 11A (triângulos), tornando mais visível a resposta à adição de antimicina A na produção de lactato pelas células controle. Nestas células, a adição de antimicina A induziu um aumento de 8,5 vezes na taxa de formação de lactato (Figura 11B, triângulos abertos) ($p<0,05$). Um fato interessante foi que a incubação das células com 3-BrPA em um meio sem glicose inibiu a produção de lactato em 1,5 vezes (Figura 11B, triângulos fechados) e a adição de antimicina A não causou nenhum efeito nesta produção, de modo semelhante ao observado quando usado o meio com glicose.

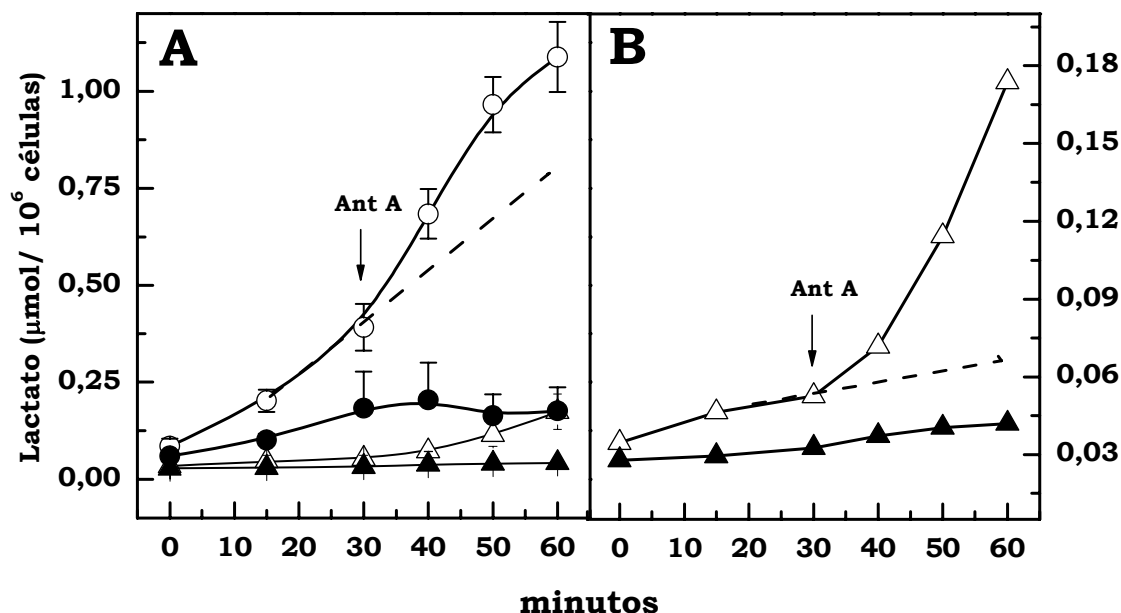


Figura 11. Incubação com uma baixa concentração de 3-BrPA diminui a produção de lactato pelas células HepG2 tanto em um meio com glicose quanto em um meio sem glicose. (A) As células HepG2 em cultura foram incubadas na ausência (símbolos abertos) ou na presença (símbolos fechados) de 150 μM de 3-BrPA em um meio de cultura com glicose (círculos) ou sem glicose (triângulos) por até 60 minutos, como descrito em Material e métodos. Aos 30 minutos de incubação, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de antimicina A (setas) foram adicionadas à cultura. Amostras do meio de cultura foram coletadas nos tempos indicados na figura e analisados para quantificação de lactato. **(B)** Dados obtidos na ausência de glicose apresentados na Figura A (triângulos), mostrando uma amplificação da escala de produção de lactato. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão; $n=4$.

4.3- Distribuição intracelular da atividade da hexocinase de células HepG2.

A hexocinase catalisa a primeira reação da glicólise e possui um papel de extrema importância nesta via. A inibição desta enzima poderia ser responsável pelo efeito do 3-BrPA observado na produção de lactato pelas células HepG2 (Figura 11), como de fato já foi descrito anteriormente para um modelo de tumor de fígado, o tumor VX2 (Ko *et al.*, 2001). No entanto, antes de avaliar esta possibilidade é importante caracterizar a distribuição desta enzima nestas células, uma vez que é conhecido que a mesma pode se apresentar tanto no citosol como associada à mitocôndria de determinados tipos celulares (Wilson, 2003). Em células tumorais, a isoforma predominante é a mitocondrial. Assim ocorre com HCCs, que apresentam majoritariamente a isoforma mitocondrial do tipo II (HK-mt II) (Pedersen, 2007b). Neste trabalho, a análise das atividades desta enzima na fração citosólica e mitocondrial de células HepG2 revelou que a atividade específica na mitocôndria é nove vezes maior do que a encontrada no citosol ($0,09 \mu\text{mol de G6P} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg ptn}^{-1}$ e $0,01 \mu\text{mol de G6P} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg ptn}^{-1}$, respectivamente) (Figura 12A). A distribuição intracelular da atividade mostrou que apesar de haver uma atividade significativa no citosol ($46,2 \mu\text{mol de G6P} \times \text{min}^{-1}$), a maior parte da atividade encontra-se na mitocôndria destas células ($65,6 \mu\text{mol de G6P} \times \text{min}^{-1}$) (Figura 12B), representando 58% da atividade total (Figura 12B). Por esta razão, a fração mitocondrial contendo a HK-mt II foi utilizada nos experimentos seguintes.

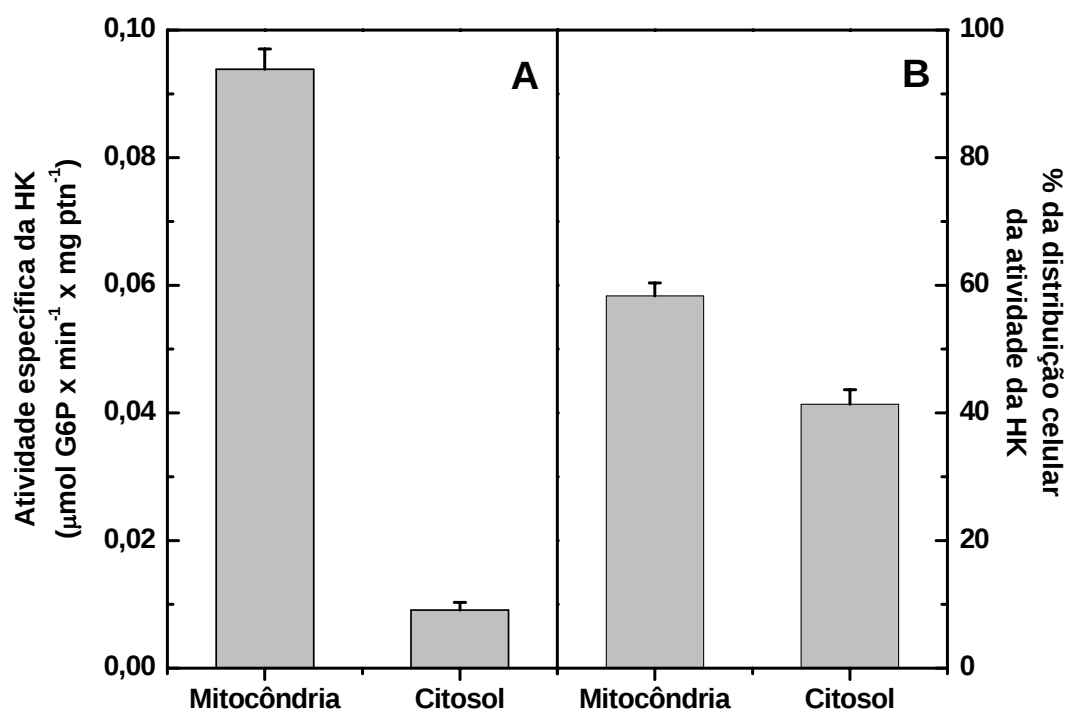


Figura 12. Distribuição intracelular da atividade total da hexocinase nas frações mitocondrial e citosólica de células HepG2. (A) Atividade específica da hexocinase na fração mitocondrial e no citosol de células HepG2. **(B)** Distribuição relativa da atividade total da hexocinase na fração mitocondrial e no citosol de células HepG2. A atividade total de cada fração foi obtida pela multiplicação da atividade ($\mu\text{mol G6P} \times \text{min}^{-1}$) pela quantidade total de proteína (mg) da fração e expressa como percentual da atividade total somada das duas frações. 100% de atividade representa o valor de $111,8 \mu\text{mol G6P} \times \text{min}^{-1}$. A quantidade de proteína total da fração mitocondrial foi de $1,0 \pm 0,1 \text{ mg}$ e do citosol de $5,5 \pm 0,4 \text{ mg}$. A atividade da enzima foi determinada como descrito em Material e métodos. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão; $n=3$.

4.4- Baixas concentrações de 3-BrPA não inibem a atividade da hexocinase mitocondrial, mas inibem a respiração mitocondrial e a formação de potencial de membrana em células HepG2 permeabilizadas.

O ensaio para a atividade da HK-mt revelou que somente 20% de diminuição em sua atividade foi observado em 20 minutos de reação com uma concentração de 5 mM de 3-BrPA ($p<0,05$) (Figura 13A, círculos abertos). Para verificar se a inibição da atividade da HK-mt era dependente do tempo de exposição da enzima ao 3-BrPA, a produção de glicose 6-fosfato foi acompanhada por até 60 min. (Figura 13B). Quando a reação foi feita na presença de 150 μ M de 3-BrPA, nenhuma alteração em seu curso temporal foi observada. Por outro lado, uma inibição de 30% na atividade da enzima ($3,01\pm0,3$ para $2,1\pm0,1$ μ mol G6P x mg ptn⁻¹) foi observada na presença de 5 mM do composto após 60 min. ($p<0,05$).

3-BrPA é um agente alquilante, e portanto o mesmo pode reagir com grupos tióis e ou hidroxilas de diversas enzimas. Desta forma, é esperado que existam diferenças na reatividade de enzimas de diferentes tecidos ou células. Por esta razão, o padrão de inibição de diferentes isoformas da hexocinase pelo 3-BrPA (HK-mt I, derivada de cérebro de camundongo e GK derivada de fígado de camundongo) foi avaliado. Os resultados apresentados na Figura 13A mostram uma maior sensibilidade ao 3-BrPA pela GK, quando comparada com as isoformas mitocondriais (HK-mt I e II). A metade da inibição máxima para a GK foi obtida com 300 μ M, enquanto que para as duas outras isoformas, 5 mM de 3-BrPA causou apenas uma pequena inibição (20%) ($p<0,05$). Estes resultados indicam que a HK-mt de células HepG2 não é inibida pelo 3-BrPA nas condições que promovem a inibição do fluxo glicolítico observado na Figura 11.

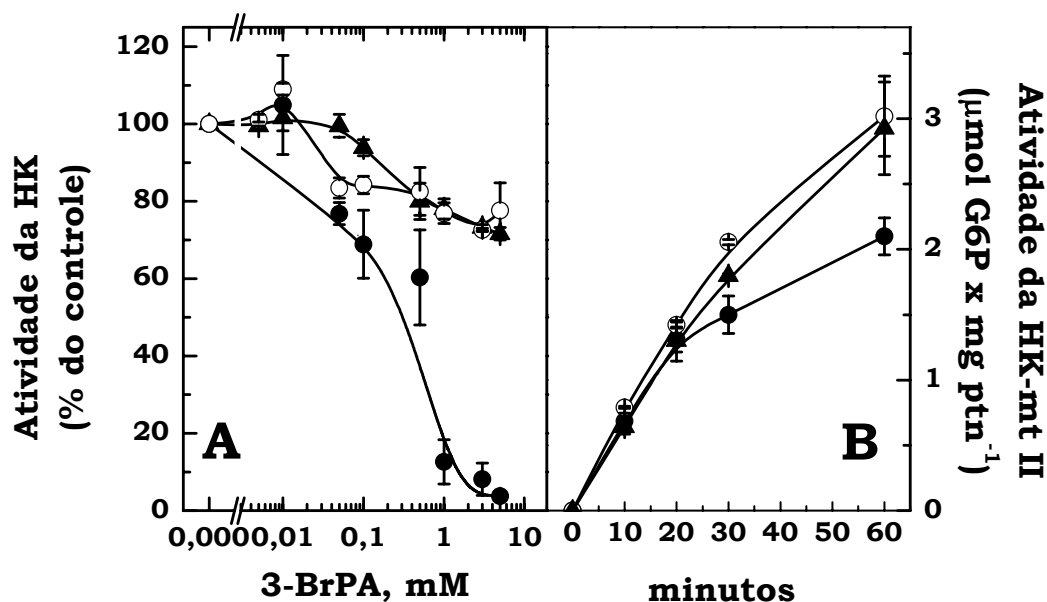


Figura 13. 3-BrPA afeta distintamente as isoformas de hexocinase, e baixas concentrações não inibem a HK-mt II. (A) Atividade da (▲) HK-mt I, (○) HK-mt II e (●) GK na presença de 3-BrPA (0,01 a 5 mM). (B) Curso temporal da atividade da HK-mt II na (○) ausência, (▲) 150 μM ou (●) 5 mM de 3-BrPA. A atividade das enzimas foi medida como descrito em Material e métodos. Os valores representam a média ± erro padrão; n=5.

Embora tenha sido sugerido em um trabalho anterior (Ko *et al.*, 2001) que a respiração mitocondrial é afetada pelo 3-BrPA, não existem dados disponíveis na literatura sobre os mecanismos envolvidos neste processo. O efeito direto do 3-BrPA na respiração mitocondrial das células HepG2 foi avaliado através de medidas de consumo de oxigênio dessas células permeabilizadas após a adição de diferentes concentrações de 3-BrPA. A Figura 14 mostra que a adição de 3-BrPA às células HepG2 permeabilizadas inibe severamente a respiração no estado 3 (respiração estimulada pela adição de succinato e ADP, acoplada à síntese de ATP). Quando aproximadamente 200 μM de 3-BrPA foi adicionado, o consumo de oxigênio foi significativamente inibido (Figuras 14A e B). A metade da inibição máxima (IC_{50}) foi obtida com 150 μM de 3-BrPA (Figura 14B). Esta inibição do consumo de oxigênio pelo 3-BrPA é provavelmente devida a um bloqueio da transferência de elétrons no STE, uma vez que a adição de um ionóforo de prótons (FCCP), que deveria estimular ao máximo o consumo de oxigênio se a inibição fosse ao nível do sistema de troca e síntese de nucleotídeos (ANT/ FoF1-ATP sintase), não foi capaz de aumentar o consumo de oxigênio pelas células (Figura 14A). Este dado sugere que o STE é um alvo potencial de ataque do 3-BrPA e não o sistema ANT/ FoF1-ATP sintase.

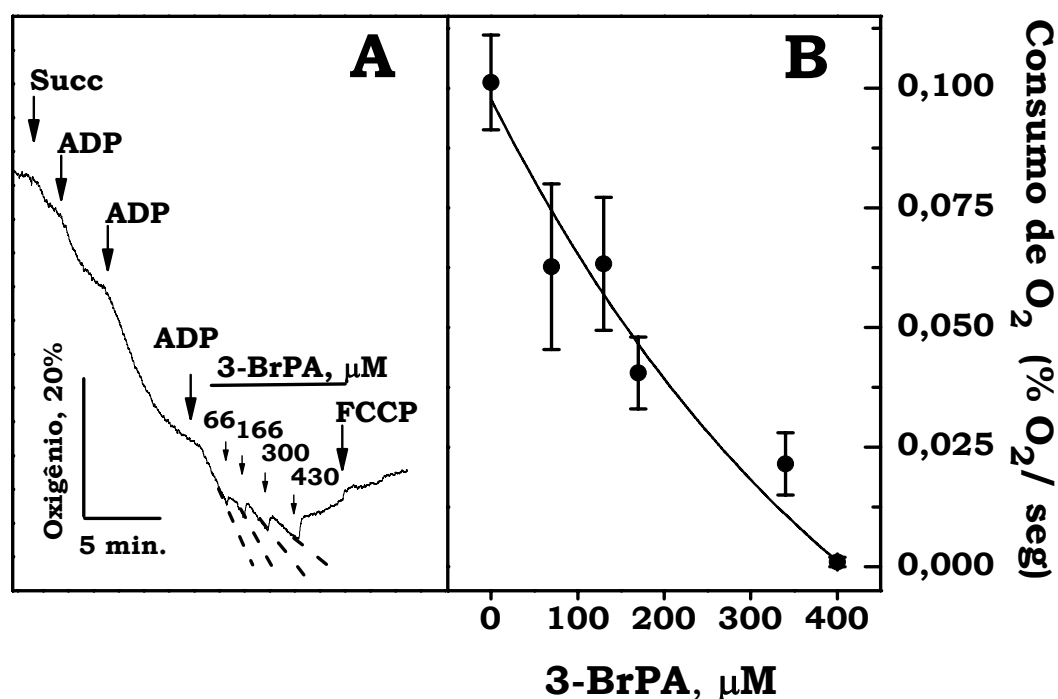


Figura 14. 3-BrPA diminui o consumo de oxigênio mitocondrial em células HepG2. (A) Experimento representativo do consumo de oxigênio mitocondrial de células HepG2 permeabilizadas, na presença de diferentes compostos. O consumo de oxigênio foi medido em um tampão de respiração após adição das células e digitonina (0,005%) (w/v), como descrito em Material e métodos. Quando indicado por setas os seguintes substratos/moduladores foram adicionados: succinato (Succ) 10 mM, ADP 200 μM , 3-BrPA nas concentrações finais indicadas e FCCP 1 μM . **(B)** Taxas de consumo de oxigênio mitocondrial pelas células HepG2 na presença de diferentes concentrações de 3-BrPA. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão; $n=4$.

Na Figura 15A está mostrado um perfil típico de potencial de membrana medido com safranina O em células HepG2 permeabilizadas. A adição das células em um meio de respiração contendo digitonina (0,005% p/v) e safranina O promove uma rápida formação do potencial de membrana, indicando a presença de substratos respiratórios endógenos ainda presentes nas células permeabilizadas. A adição de rotenona provocou a imediata perda do potencial de membrana que foi posteriormente recuperado por meio da ativação do complexo II pela adição de succinato. A inclusão subsequente de antimicina A induziu a rápida perda do potencial de membrana nas mitocôndrias das células permeabilizadas. A ativação do complexo IV por meio da adição de TMPD/Asc foi capaz de resgatar mais uma vez o potencial de membrana. Finalmente a adição de FCCP levou a despolarização permanente das mitocôndrias. Neste experimento fica evidente a participação dos três complexos do STE na formação da força próton-motriz em células HepG2 permeabilizadas.

A análise da formação do potencial de membrana nas células HepG2 permeabilizadas confirmou que o 3-BrPA age no STE destas células. A Figura 15B mostra a formação do potencial de membrana após a adição das células HepG2 ao meio de respiração, indicando a presença de substratos endógenos capazes de induzir a formação deste potencial. A adição de substratos do complexo I (piruvato/malato) levou a uma hiperpolarização deste potencial. Como previsto, a adição de ADP (200 μ M) foi capaz de provocar uma despolarização associada à síntese de ATP (Figura 15B, ver também Figura 4). O bloqueio do complexo I por rotenona, seguido da adição de succinato foi capaz de manter o potencial em níveis próximos ao induzido pela adição prévia de ADP. Nestas condições a adição de 200 μ M de 3-BrPA provocou uma imediata e rápida perda de potencial de membrana indicando uma inibição do bombeamento de prótons mediado pelo complexo da succinato desidrogenase. Este resultado é confirmado pela adição de oligomicina

que não foi mais capaz de promover a hiperpolarização do potencial. Situação oposta foi observada quando a oligomicina foi adicionada antes do 3-BrPA (Figura 15C), o que levou a interrupção da síntese de ATP e o aumento do potencial de membrana. Intrigantemente, nesta situação a adição de 3-BrPA não foi tão potente na dissipação do potencial como foi observado na Figura 15B. A adição de antimicina A assim como o 3-BrPA observado anteriormente, interrompe o fluxo de elétrons e rapidamente leva à dissipação do potencial.

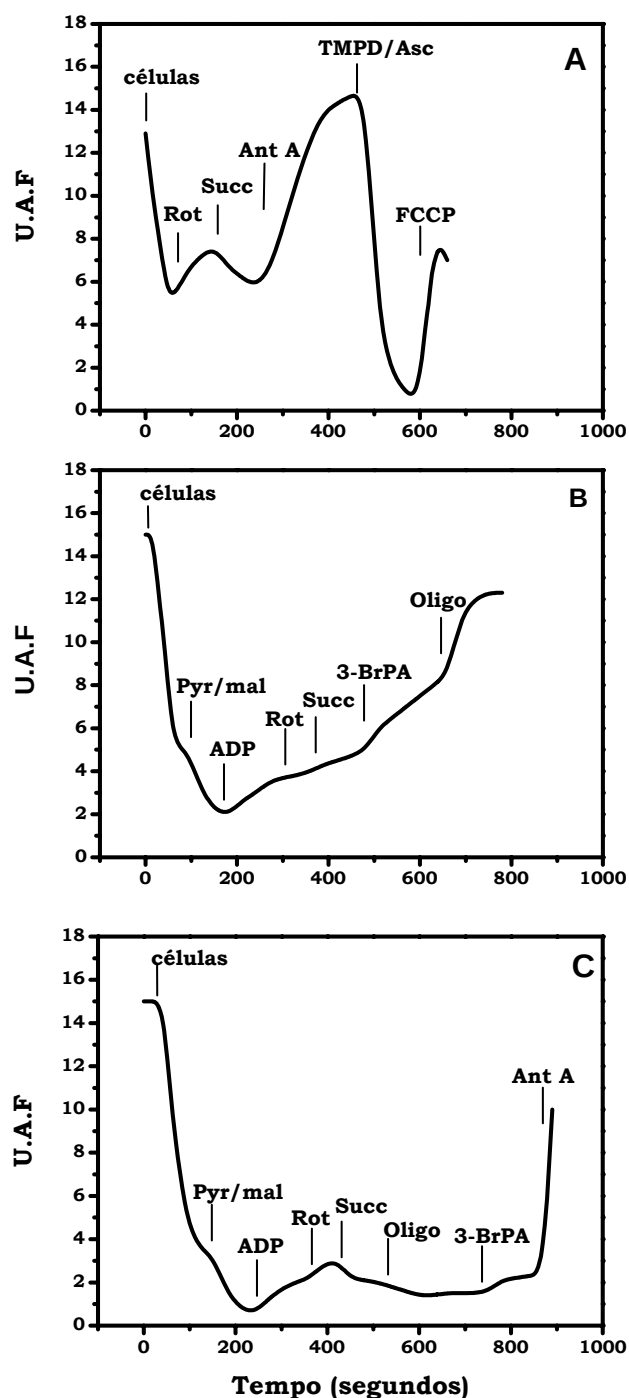


Figura 15. Efeito do 3-BrPA no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) de células HepG2 permeabilizadas. A formação do $\Delta\Psi_m$ foi medida em um tampão de respiração após a adição de safranina O (5 μ M), aproximadamente 5×10^6 células e digitonina (0,005%) (w/v), como descrito em Material e Métodos. **(A)** Experimento típico de medida do potencial de membrana em células HepG2 permeabilizadas. **(B)** e **(C)** Efeito da adição de 3-BrPA na formação do potencial de membrana em células HepG2 permeabilizadas. Quando indicado por traços os seguintes substratos/moduladores foram adicionados: piruvato/malato (pyr/mal) 5 mM, rotenona (Rot) 1 μ M, succinato (Succ) 10 mM, TMPD 0,8 mM e ascorbato 0,2 mM (TMPD/Asc), ADP 200 μ M, 3-BrPA 250 μ M, antimicina A (Ant A) 2 μ g/ml, oligomicina (oligo) 1 μ g/ml e FCCP 1 μ M. UAF: unidades arbitrárias de fluorescência.

4.5- Pré-incubação com 3-BrPA afeta os parâmetros respiratórios de células HepG2 intactas.

Embora os efeitos do 3-BrPA na respiração mitocondrial tenham ficado bastante evidentes na Figura 14, esses ensaios foram realizados com células permeabilizadas, e portanto o 3-BrPA teria um acesso direto às mitocôndrias dessas células. Mais ainda, as células se encontravam em suspensão, de forma que as respostas encontradas nestas situações poderiam ser bastante diferentes das respostas de células em condições de cultura. Devido a esta razão resolvemos adotar uma estratégia que se assemelhasse mais as condições fisiológicas das células. Para isso adotamos uma estratégia utilizada previamente por nosso grupo que se mostrou uma ferramenta bastante útil para a avaliação da disfunção mitocondrial causada pela infecção pelo vírus dengue-2 (Anexo II). Neste procedimento o tratamento/infecção das células é realizado com as mesmas em cultura e posteriormente estas células são removidas das placas de cultura e as medidas de consumo de oxigênio são avaliadas tanto nas células intactas quanto após sua permeabilização, sendo possível assim avaliar a atividade dos complexos do STE.

Assim sendo, em adição aos efeitos diretos do 3-BrPA sobre a respiração, o consumo de oxigênio pelas células HepG2 também foi acessado após a pré-incubação das células em condições de cultivo com este composto. Assim como nos ensaios de produção de lactato, as células foram incubadas em um meio com glicose ou sem glicose para se avaliar as possíveis diferenças nos efeitos do 3-BrPA na respiração quando glicólise e fosforilação oxidativa são diferentemente estimuladas. As Figuras 16A e B mostram gráficos de experimentos representativos. As médias das taxas do consumo de oxigênio destas células em diferentes regimes de respiração são apresentadas nas Figuras 16C e D. As células pré-incubadas com 150 μ M de 3-BrPA em um meio sem glicose por 30 min. apresentaram um decréscimo de 50%

em sua respiração basal ($3,1 \pm 0,19$ para $1,6 \pm 0,13$ nmol O_2 / min. $\times 10^6$ cel.) e na respiração máxima induzida pela adição de FCCP ($3,5 \pm 0,22$ para $1,9 \pm 0,3$ nmol O_2 / min. $\times 10^6$ cel.) ($p < 0,01$). Adicionalmente, não foi observada diferença no consumo de oxigênio não acoplado à síntese de ATP, o *proton-leak* (respiração insensível à oligomicina) (Figuras 16A e C). Uma situação distinta foi observada quando a pré-incubação com 3-BrPA foi feita em um meio com glicose (Figuras 16B e D). Neste caso foi observado um decréscimo de apenas 20% na respiração basal das células pré-incubadas com 3-BrPA quando comparadas com as células controle ($2,1 \pm 0,12$ para $1,6 \pm 0,1$ nmol O_2 / min. $\times 10^6$ cel.) ($p < 0,05$) e nenhuma diferença foi detectada na respiração máxima induzida por FCCP. Curiosamente, embora a pré-incubação com 3-BrPA em um meio com glicose tenha causado um pequeno efeito aparente na respiração basal das células, a respiração insensível à oligomicina dobrou quando comparada com as células controle ($0,6 \pm 0,1$ para $1,1 \pm 0,1$ nmol O_2 / min. $\times 10^6$ cel.) ($p < 0,05$) (Figuras 16B e D). Os resultados indicam que os substratos disponíveis para a célula influenciam os efeitos causados pelo 3-BrPA na respiração de células HepG2.

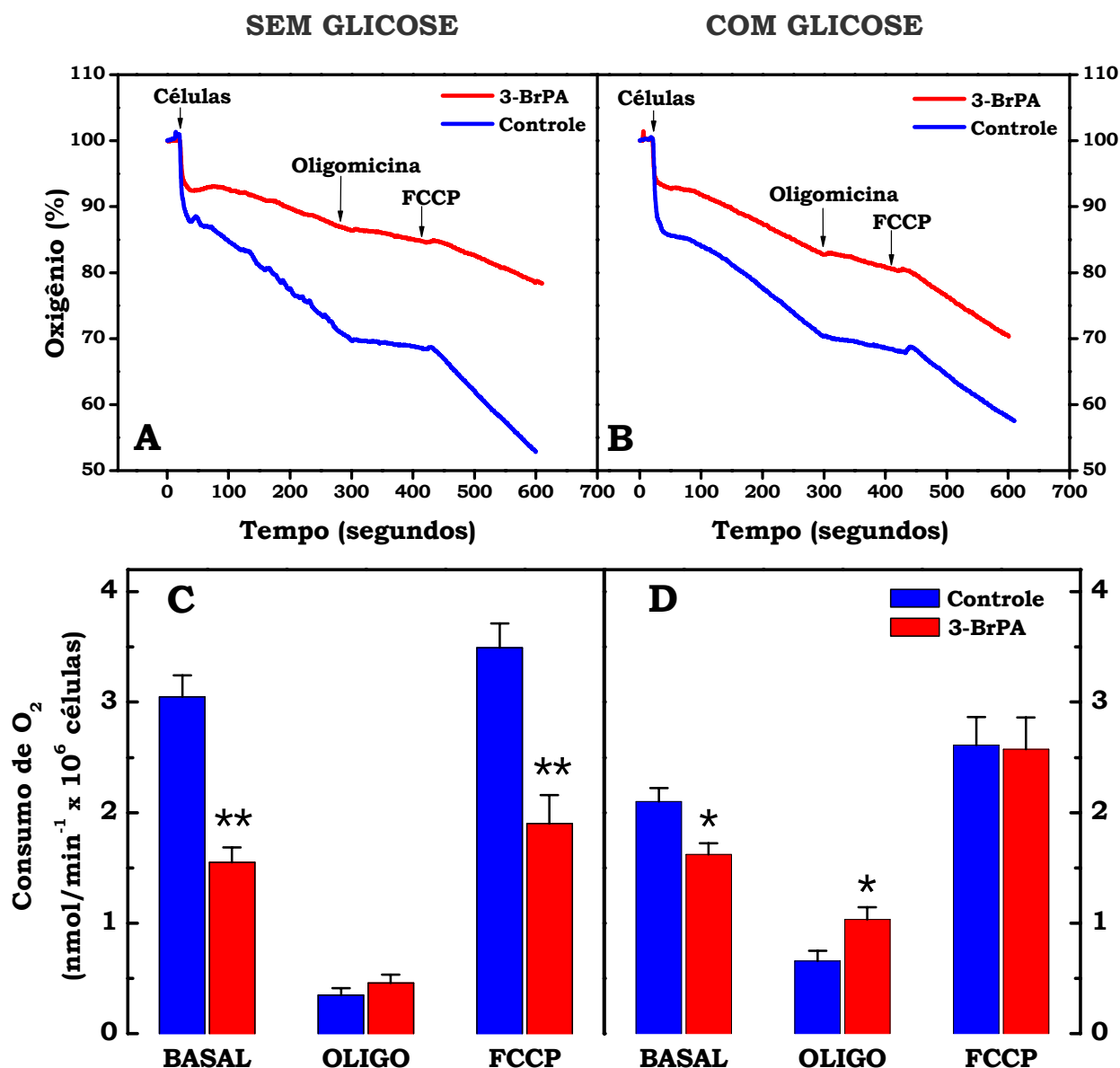


Figura 16. Pré-incubação com 3-BrPA afeta o consumo de oxigênio de células HepG2 intactas. As células em cultura foram pré-incubadas com 150 μ M de 3-BrPA por 30 min. em um meio **(A, C)** sem glicose ou **(B, D)** com glicose como descrito em Material e métodos. O consumo de oxigênio temporal foi medido no mesmo meio utilizado na pré-incubação. **A** e **B**, experimentos representativos. **C** e **D**, taxas de consumo de oxigênio basal (BASAL), independente de oligomicina (OLIGO, 1 μ g/ml) e máximo induzido por FCCP (FCCP, 1 μ M). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão; n=5. ** ou * são significativamente diferentes quando comparados ao controle ($p < 0,01$ ou $p < 0,05$ respectivamente).

4.6- Pré-incubação com 3-BrPA afeta os parâmetros respiratórios de células HepG2 permeabilizadas ao nível do complexo I e/ou II.

Com o objetivo de analisar os efeitos da pré-incubação com 150 μM de 3-BrPA por 30 min. na função mitocondrial e nas atividades dos complexos do STE, o consumo de oxigênio foi medido em células permeabilizadas com digitonina, usando respirometria de alta resolução (Figuras 17 e 18). A Figura 17 apresenta experimentos representativos onde foi possível acompanhar em tempo real tanto a concentração de oxigênio (Figuras 17A e C) quanto a taxa de consumo de oxigênio pelas células (Figuras 17B e D) após a adição dos substratos e moduladores. As taxas médias de consumo de oxigênio nestas condições são apresentadas na Figura 18. As células pré-incubadas com 3-BrPA em um meio sem glicose apresentaram um decréscimo na respiração associada ao complexo I ($7,8 \pm 1,4$ para $3,8 \pm 0,6$ pmol $\text{O}_2/\text{seg.} \times 10^6$ cel.) e na respiração associada ao complexo II ($54 \pm 9,3$ para $29,6 \pm 3,5$ pmol $\text{O}_2/\text{seg.} \times 10^6$ cel.) ($p < 0,05$) (Figuras 17B e 18A). A capacidade de transporte de elétrons máxima após adições de FCCP foi significativamente diminuída ($84,6 \pm 8,3$ para $44,4 \pm 9$ pmol $\text{O}_2/\text{seg.} \times 10^6$ cel.) ($p < 0,05$), enquanto o consumo de oxigênio insensível à oligomicina não foi significativamente alterado (Figuras 17B e 18A), resultados que estão em acordo com as observações feitas em células intactas (Figura 16A).

Diferentes efeitos nos parâmetros respiratórios foram observados nas células pré-incubadas com 3-BrPA em um meio com glicose (Figuras 17D e 18B). Somente o consumo de oxigênio induzido por succinato sofreu uma diminuição significativa ($35,7 \pm 5,7$ para $15 \pm 4,4$ pmol $\text{O}_2/\text{seg.} \times 10^6$ cel) ($p < 0,05$). Semelhante ao observado para as células intactas, a pré-incubação com 3-BrPA em um meio com glicose não afetou a respiração máxima induzida por FCCP e promoveu um aumento significativo (3 vezes) na respiração insensível à oligomicina

das células permeabilizadas ($4,4 \pm 0,95$ para $14,2 \pm 4,2$ pmol O_2 /seg. $\times 10^6$ cel.) (Figuras 17D e 18B) ($p < 0,05$).

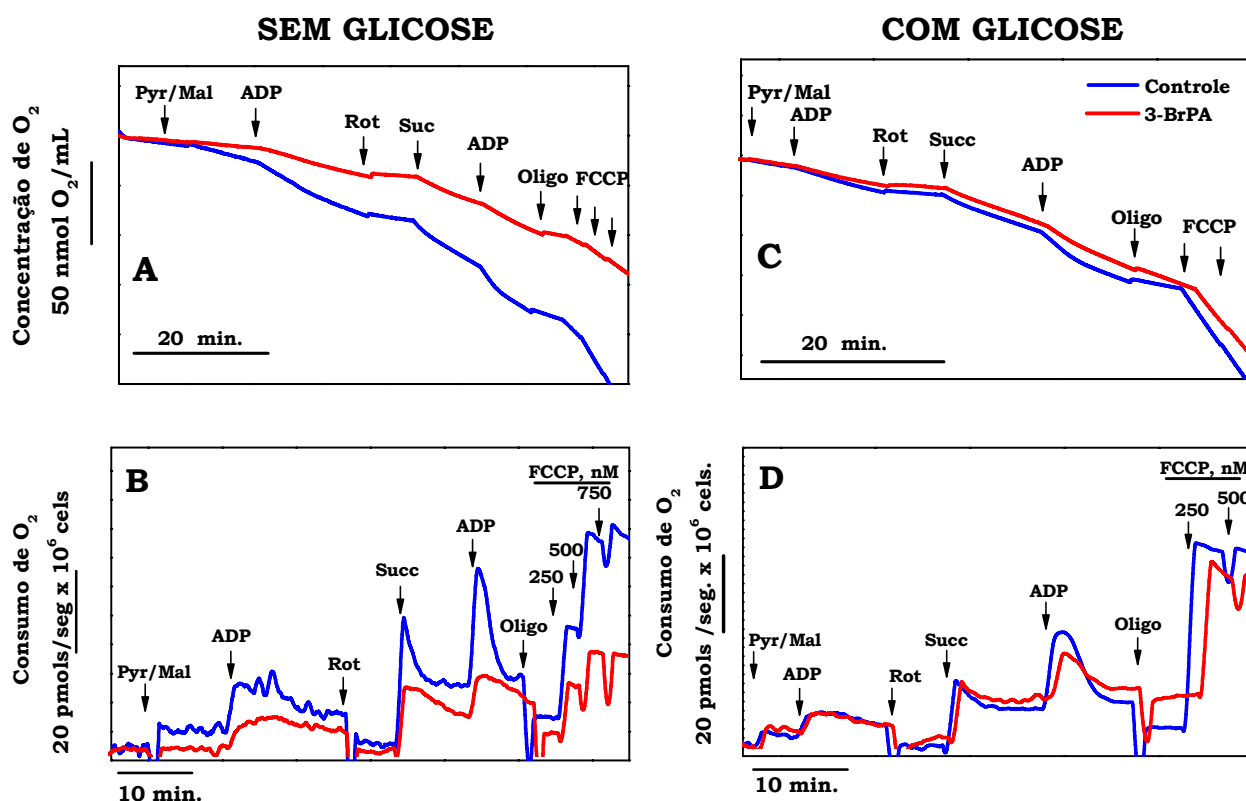


Figura 17. Pré-incubação com 3-BrPA afeta o consumo de oxigênio de células HepG2 permeabilizadas. Experimentos representativos mostrando (A,C) a concentração e (B,D) a taxa de consumo de oxigênio de células HepG2 permeabilizadas. As células em cultura foram pré-incubadas com 150 μ M de 3-BrPA por 30 min. em um meio (A,B) sem glicose ou (C,D) com glicose, como descrito em Material e métodos. O consumo de oxigênio foi medido em um tampão de respiração após adição das células e digitonina (0,005%) (w/v). Quando indicado foi adicionado piruvato + malato 10 mM (Pyr/Mal), ADP 50 μ M, rotenona 1 μ M (Rot), succinato 10 mM (Succ), oligomicina 1 μ g/ml (Oligo) e FCCP nas concentrações finais indicadas na figura.

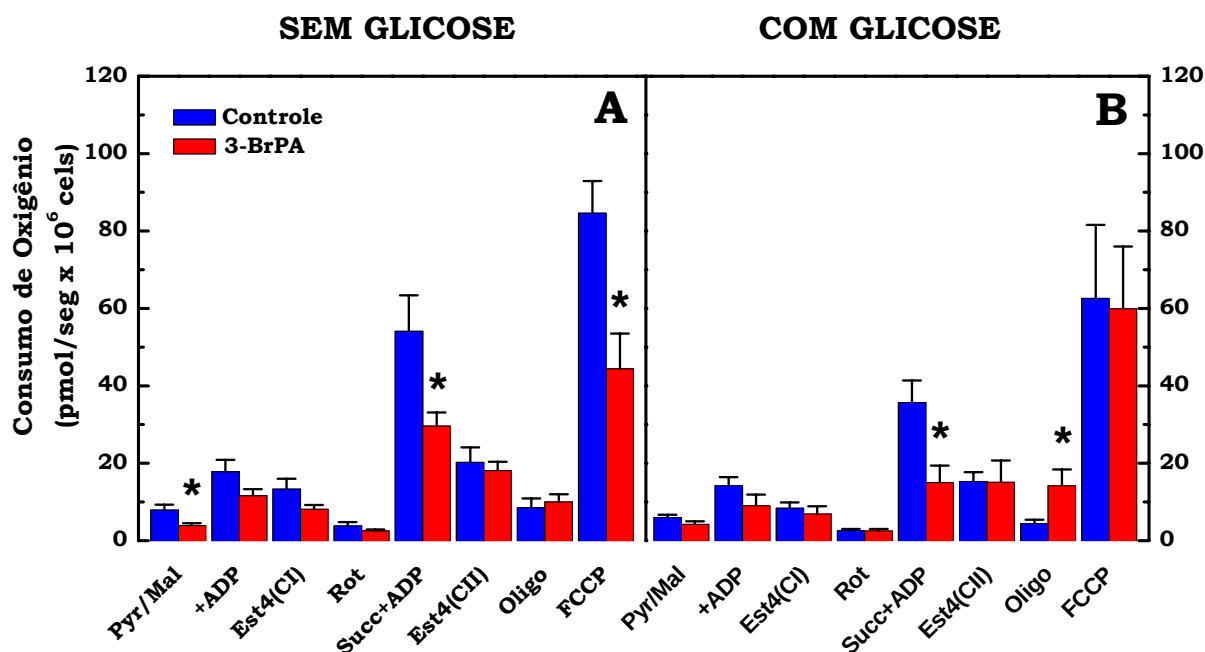


Figura 18. Taxas de consumo de oxigênio de células HepG2 permeabilizadas pré-incubadas com 3-BrPA. Os dados foram obtidos como descrito na Figura 17. Est.4 (CI) e Est.4 (CII) representam o estado 4 da respiração (obtido após a conversão do ADP adicionado em ATP pela mitocôndria) obtido quando substratos associados ao complexo I (Pyr/Mal) ou o complexo II (Succ) são adicionados, respectivamente. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão; n=4. * significativamente diferente quando comparado ao controle ($p < 0,05$).

Interessantemente, foi observado um atraso no controle respiratório induzido pela adição de ADP nas células pré-incubadas com 3-BrPA em um meio sem glicose tanto com piruvato/malato quanto com succinato como substratos respiratórios (Figura 17B). No entanto, nas células pré-incubadas com 3-BrPA em um meio com glicose a resposta ao ADP não foi alterada na respiração estimulada por piruvato/malato, mas se tornou mais lenta quando succinato foi utilizado como substrato (Figura 17D). A Figura 19 mostra em destaque os efeitos na resposta ao ADP quando succinato foi utilizado como substrato para as células pré-incubadas com 3-BrPA.

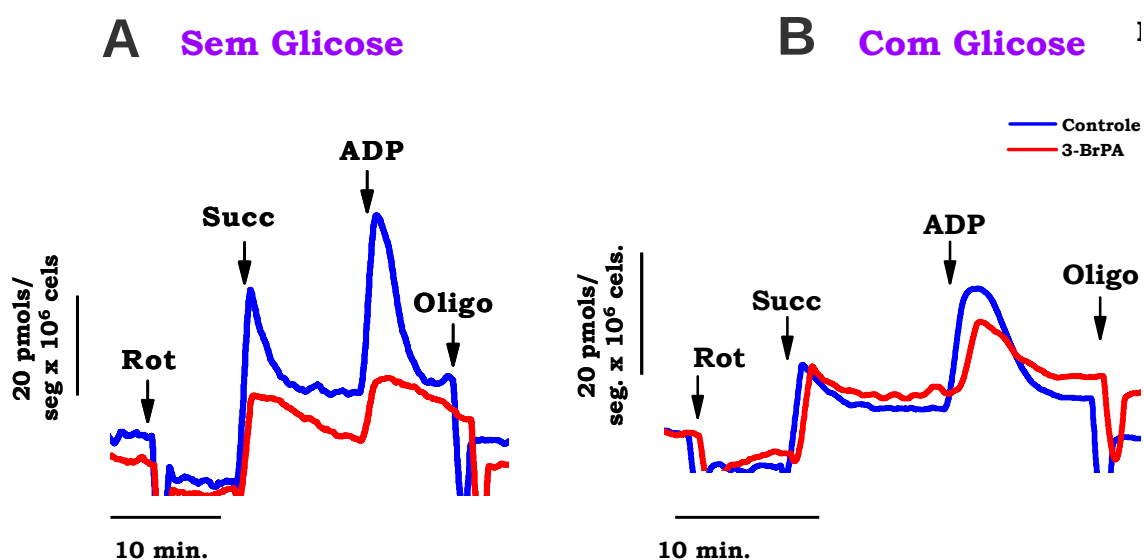


Figura 19. Efeito da pré-incubação com 3-BrPA na resposta do fluxo de consumo de oxigênio pelas células HepG2 permeabilizadas ao succinato e ADP. A figura mostra em detalhe a resposta ao succinato e ADP apresentados na Figura 17. As células em cultura foram pré-incubadas com 150 μ M de 3-BrPA por 30 min. em um meio (A) sem glicose ou (C) com glicose, como descrito em Material e métodos. O consumo de oxigênio foi medido em um tampão de respiração após adição das células e digitonina (0,005%) (w/v). Quando indicado foi adicionado: rotenona 1 μ M (Rot), ADP 50 μ M, succinato 10 mM (Succ) e oligomicina 1 μ g/ml (Oligo).

4.7- 3-BrPA inibe a atividade da succinato desidrogenase em mitocôndrias de células HepG2. Implicações para o limiar da resposta respiratória ao 3-BrPA

O grupo de resultados apresentados nas Figuras 17 e 18 mostra que a respiração dependente do complexo II é inibida pelo 3-BrPA em ambas as condições de incubação testadas (meio com glicose e meio sem glicose). Estes dados apontam para uma possível inibição preferencial da atividade da succinato desidrogenase (SDH) do complexo II do STE nas células HepG2. Para verificar esta hipótese foi medido o efeito direto do 3-BrPA sobre a atividade da SDH da fração mitocondrial de células HepG2, usando succinato como substrato doador de elétrons e DCPIP como um aceptor artificial de elétrons. Os dados obtidos confirmaram a inibição da SDH de células HepG2 pelo 3-BrPA. A Figura 20 mostra um curso temporal da atividade da SDH na presença de 100, 200 e 300 μM de 3-BrPA. Os resultados mostram uma inibição da atividade da SDH pelo 3-BrPA em todas as concentrações testadas. Na presença de um conhecido inibidor competitivo, o malonato, a atividade desta enzima foi completamente inibida (círculos cheios). O perfil de inibição da SDH por diferentes concentrações de 3-BrPA (Figura 21A) mostrou que a enzima é bastante sensível a este agente, apresentando um valor de IC_{50} entre 10 e 20 μM para o 3-BrPA.

Entretanto, o padrão de inibição observado para a SDH poderia não estar diretamente correlacionado com a inibição da respiração. Para analisar os efeitos de diferentes níveis de inibição de um determinado complexo do STE na respiração mitocondrial, é possível usar crescentes concentrações de um inibidor deste complexo e medir a atividade individual deste complexo e a respiração mitocondrial global nas mesmas condições. O efeito de diferentes concentrações de 3-BrPA na atividade da SDH é mostrado na Figura 21A, enquanto que o efeito deste composto na respiração mitocondrial é apresentado na Figura 14.

Com estes dados foi construído o gráfico denominado curva de “limiar metabólico” apresentado na Figura 21B. Este gráfico mostra a percentagem da taxa de respiração mitocondrial das células HepG2 como uma função do percentual de inibição da SDH na mesma concentração de 3-BrPA. Ao observar o gráfico, fica claro que a diminuição na atividade da SDH deve exceder um valor crítico (aproximadamente 60%) antes que um decréscimo na respiração mitocondrial possa ser observado. Fica aparente que aos 50% de inibição da atividade da SDH, nenhuma inibição significativa da respiração mitocondrial das células HepG2 foi observada, podendo significar um excesso de atividade da SDH que funcionaria com um “tampão” para o fluxo de elétrons. No entanto, acima deste grau de inibição, um grande decréscimo na taxa respiratória foi detectado. Mais importante, com 150 μ M de 3-BrPA, o qual corresponde a 70% de inibição da atividade da SDH, a respiração foi inibida em 60% (Figura 21B).

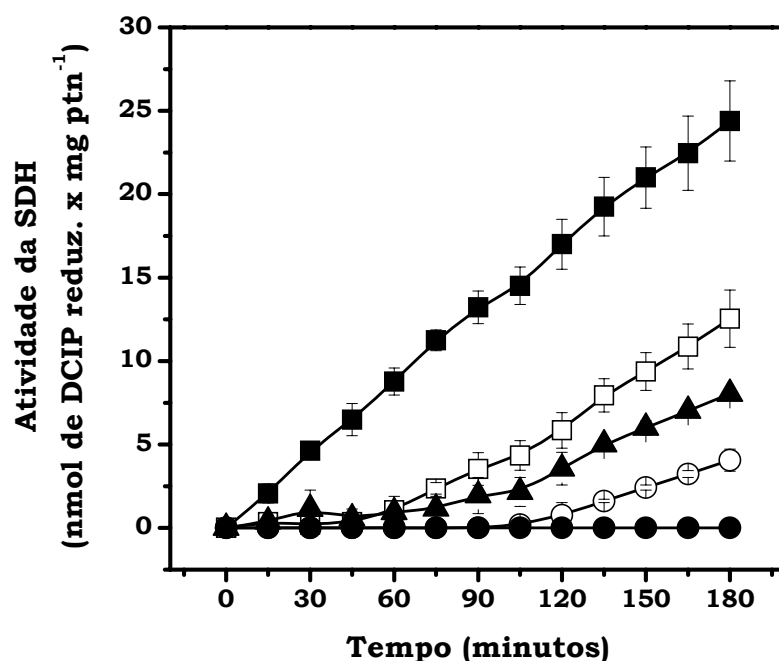


Figura 20. Curso temporal da atividade da succinato desidrogenase (SDH) na presença de 3-BrPA ou malonato. A atividade da SDH foi medida na fração mitocondrial de células HepG2, por um método espectrofotométrico utilizando DCPIP como aceptor artificial de elétrons e succinato como substrato, como descrito em Material e métodos. A reação foi iniciada pela adição da fração mitocondrial (0,01 mg/ml) e os brancos obtidos na ausência de succinato. Controle (■), 100 μ M de 3-BrPA (□), 200 μ M de 3-BrPA (▲), 300 μ M de 3-BrPA (○), 10 mM de malonato (●).

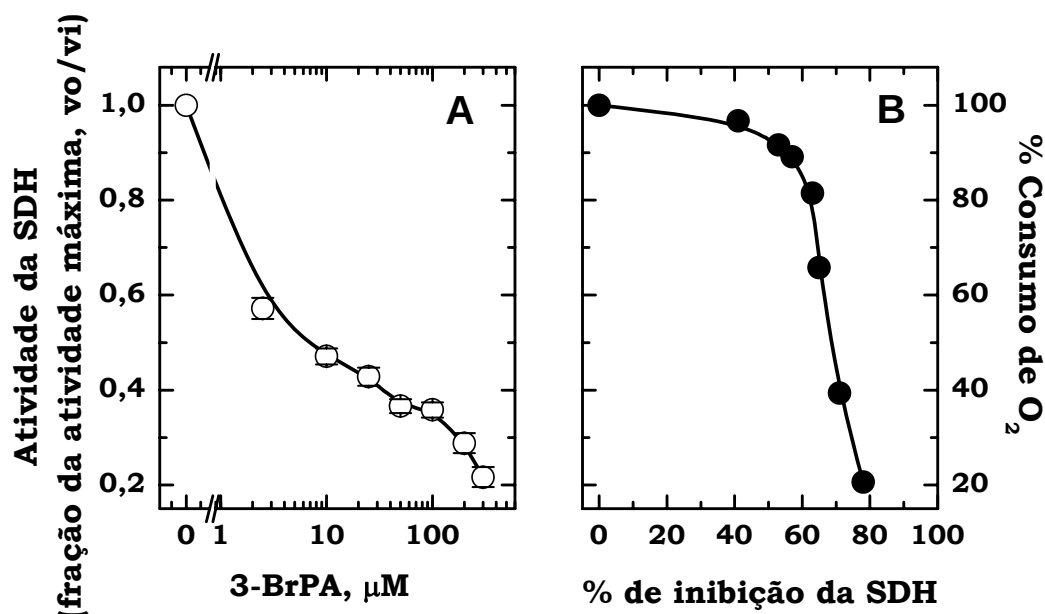


Figura 21. Inibição da atividade da succinato desidrogenase (SDH) por diferentes concentrações de 3-BrPA e curva de limiar metabólico. (A) Atividade da SDH em mitocôndrias de células HepG2 na presença de diferentes concentrações de 3-BrPA. A reação foi iniciada pela adição da fração mitocondrial (0,01 mg/ml) na ausência ou na presença de 2,5 a 300 μM de 3-BrPA. Os valores são apresentados como fração da atividade máxima da SDH (vo/vi), sendo que quando vo/vi = 1, atividade é igual à $9,1 \pm 1,1$ nmol DCIP/min x mg ptn. **(B)** Curva limiar do percentual da taxa de consumo de oxigênio como uma função do percentual de inibição da atividade da SDH pelo 3-BrPA. Cada ponto é proveniente da curva de titulação com 3-BrPA para SDH (Figura 21A) e consumo de oxigênio (Figura 14B) e representa a percentagem do consumo de oxigênio como uma função da percentagem da atividade da SDH para a mesma concentração de 3-BrPA.

5-DISSCUSSÃO

O HCC é um importante problema de saúde, sendo um dos tipos de câncer mais fatais no mundo inteiro, causando mais de um milhão de mortes anualmente (Lopez *et al.*, 2006). Infelizmente, existem poucas opções de tratamento, devido à falta de respostas satisfatórias, alta toxicidade e altas taxas de recorrência (Venook, 1994; Llovet *et al.*, 2003; Kulik *et al.*, 2007). A procura por uma terapia eficiente para esta enfermidade levou a descoberta de uma nova abordagem, a qual consiste na administração intra-arterial direta de uma molécula, o 3-BrPA, ao tumor. O tratamento com 3-BrPA elimina as células do HCC aparentemente sem afetar os tecidos sadios adjacentes ou o restante do organismo (Geschwind *et al.*, 2002; Ko *et al.*, 2004). Acredita-se que as propriedades benéficas deste agente são devidas a sua capacidade de inibir as vias celulares produtoras de energia, ou seja, a glicólise e a fosforilação oxidativa (Ko *et al.*, 2001). No entanto, o conhecimento dos alvos metabólicos específicos e dos mecanismos de ação do 3-BrPA em células derivadas de HCC humano, particularmente seus efeitos na bioenergética mitocondrial são muito limitados. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do 3-BrPA sobre a glicólise e fosforilação oxidativa de células HepG2, uma linhagem celular derivada de HCC humano.

Foi mostrado previamente que 100 μ M de 3-BrPA induzia a morte de células HepG2 após 24 horas de exposição (Gwak *et al.*, 2005). No entanto, uma caracterização mais detalhada do efeito da incubação por tempos mais curtos e diferentes concentrações de 3-BrPA no metabolismo celular destas células ainda não havia sido investigado. A análise realizada no presente estudo indica que dependendo da concentração e do período de incubação, diferentes sítios intracelulares estão sendo afetados pelo 3-BrPA com distintas afinidades e/ ou reatividades (Figura 10). Este resultado está em acordo com a proposta prévia de que o 3-BrPA agiria na glicólise e fosforilação oxidativa (Ko *et al.* 2001) e, mais importante, permitiu um melhor conhecimento do

curso temporal de ação deste composto nas células utilizadas neste estudo.

Uma característica marcante observada em células tumorais é uma acelerada glicólise, mesmo na presença de quantidades adequadas de oxigênio, um fenômeno conhecido como “efeito Warburg” (Warburg, 1956; Matoba *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2007). Embora os mecanismos moleculares exatos envolvidos nesta transformação metabólica ainda não estejam elucidados, a profunda alteração bioquímica no metabolismo energético de células tumorais fornece instigantes oportunidades para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas focadas na via glicolítica, eliminando desta forma, preferencialmente as células tumorais. Várias moléculas capazes de inibir a glicólise em sistemas experimentais têm mostrado promissoras atividades anti-tumorais *in vitro* e *in vivo* (Galluzzi *et al.*, 2006; Pelicano *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007; Pedersen, 2007a).

Acredita-se que a ação anti-tumoral do 3-BrPA esteja relacionada com os mecanismos expostos acima (Pedersen, 2007a). Portanto, uma vez que a inibição da glicólise foi considerada anteriormente como o sítio responsável pela ação do 3-BrPA na viabilidade de células tumorais, este trabalho investigou se este seria o caso para as células HepG2. Foi observado que as células HepG2 seguem o padrão de fenótipo glicolítico apresentado por outras células tumorais, pois somente um aumento de 3 vezes na taxa de produção de lactato foi observado quando a fosforilação oxidativa foi inibida (adição de antimicina A) (Figura 11A, círculos abertos). Em células não transformadas, este estímulo na produção de lactato pela antimicina pode chegar a mais de 10 vezes (D'Aurelio *et al.*, 2001; Merlo-Pich *et al.*, 2004). O efeito observado pela adição de antimicina A mimetiza o “efeito Pasteur” (descrito pela primeira vez em leveduras por Louis Pasteur em 1857, por isso o nome). No “efeito Pasteur”, as células, por falta de oxigênio em quantidade suficiente, aumentam o consumo de glicose para garantir que quantidades adequadas de ATP sejam produzidas

através de sua transformação em lactato, um processo menos eficiente com relação ao número de moléculas de ATP sintetizadas por glicose consumida, quando comparado com a fosforilação oxidativa (por isso a necessidade de aumentar o consumo de glicose) (Krebs, 1972). O pequeno efeito observado na produção de lactato nas células HepG2, após a adição de um inibidor da fosforilação oxidativa, sugere que estas já se encontravam próximas à sua capacidade glicolítica máxima (Figura 11A). Como esperado, a quantidade de lactato produzida pelas células HepG2 foi significativamente diminuída na presença de 3-BrPA, indicando um efeito inibitório na glicólise (Figura 11A, círculos fechados). Esta ação ocorreu imediatamente após a adição do composto, sugerindo que este processo precede a perda de viabilidade pelas células.

No entanto, ao contrário do proposto anteriormente (Ko *et al.*, 2001), o efeito do 3-BrPA sobre a glicólise não poderia ser explicado pela inibição da atividade da HK-mt observada na presença deste composto, pois durante 60 min. de reação nenhuma mudança no curso temporal da atividade desta enzima foi observada quando usada uma condição semelhante à utilizada no ensaio de produção lactato (150 μ M) (Figuras 13A e B). Embora o trabalho anterior tenha mostrado que 5 mM 3-BrPA inibiu quase completamente a HK-mt de tumores VX2 (Ko *et al.*, 2001), no presente trabalho foi observado um máximo de 30% de inibição em 60 min. de reação com a mesma concentração deste composto (Figura 13B). Estes resultados aparentemente contrastantes podem ser explicados, ao menos em parte, pelo protocolo utilizado para o ensaio de atividade da enzima nos dois estudos. No presente estudo, as reações foram iniciadas em um meio contendo ATP, glicose e 3-BrPA. No estudo prévio, 5mM de 3-BrPA foi adicionado à preparação de HK-mt antes da adição de glicose (Ko *et al.*, 2001). Interessantemente, Tiedge *et al.* (2000) mostraram que os resíduos de cisteína do sítio catalítico da GK e da HK-mt II são muito menos sensíveis a reagentes de grupos tióis

quando os complexos enzima/substrato ([E.S]) são favorecidos pelo aumento de substratos no meio reacional.

A análise da ação do 3-BrPA sobre outras isoformas de HK mostrou que a GK, a principal isoforma das células normais do fígado, foi muito mais sensível à inibição pelo 3-BrPA (Figura 13A) quando comparada às outras isoformas mitocondriais. A GK é caracterizada por uma alta susceptibilidade a oxidação por grupos tióis (Tippett e Neet, 1983) e uma forte sensibilidade a reagentes contra grupos sulfidrilas (Lenzen *et al.*, 1987, 1988a, 1988b, 1990; Lenzen e Munday, 1991). Grupos tióis em resíduos de cisteína na vizinhança do sítio de ligação da hexose (Cys 213, Cys 220, Cys 230, Cys 233, e Cys 252) assim como resíduos de cisteínas distantes do sítio ativo (Cys 364, Cys 371, e Cys 382) são importantes para atividade da GK de células beta humanas. O alinhamento das sequências de proteína indicam que a GK está muito mais relacionada à enzima de 100-kDa HK-mt do que à enzima de levedura de 50 k-DA, por exemplo (Tsai e Wilson, 1995; Wilson, 1995, 1997). Então, seria esperado que a HK-mt reagisse seus grupos tióis com o 3-BrPA causando uma inibição semelhante à observada para a GK. No entanto, a inibição seletiva da GK não pode ser atribuída ao grande número de cisteínas. Isto se torna aparente pela localização espacial dos resíduos de cisteína na cataliticamente ativa porção C-terminal da HKs de baixo Km, tipo I e tipo II (Mulichak *et al.*, 1998; Aleshin *et al.*, 1996, 1998), as quais exibem uma densidade de cisteínas comparável à GK (Bernstein *et al.*, 1977). Em contraste com a GK, as HKs de baixo Km mostram uma sensibilidade 100 vezes menor à inibição da atividade enzimática por reagentes de grupos tióis como o aloxano (Lenzen *et al.*, 1987, 1990; Munday *et al.*, 1993). Os dados na Figura 13A mostram uma menor inibição pelo 3-BrPA da HK-mt II quando comparada a GK de fígado de camundongo. Então, pode-se sugerir que o 3-BrPA age com grupos tióis seguindo um padrão muito semelhante daqueles reagentes de grupos tióis descritos previamente para GK e HKs de baixo Km (Tiedge *et al.*, 2000).

O efeito inibitório do 3-BrPA na via glicolítica poderia ser explicado devido a presença de outros potenciais alvos deste composto nesta via. Duas enzimas em particular, a gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase e a fosfoglicerato cinase, mostraram ser imediatamente inibidas de uma forma competitiva pelo 3-BrPA em experimentos avaliando a oxidação de glicose e frutose em espermatozóides de javali (Jones *et al.*, 1995). Com relação a estas observações, uma interessante abordagem seria comparar os efeitos do 3-BrPA nas atividades de enzimas glicolíticas (diferentes da HK) de HCC e hepatócitos não transformados.

Embora nos trabalhos anteriores com o 3-BrPA muita importância tenha sido dada aos seus efeitos na via glicolítica, este agente também mostrou afetar a mitocôndria de células tumorais (Ko *et al.*, 2001; Gwak *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2007). Considerando a importância desta organela na sobrevivência celular, é surpreendente que nenhum outro trabalho até o momento tenha estudado com maior profundidade os efeitos deste composto sobre a bioenergética mitocondrial. De fato, esta organela tem sido considerada como um importante alvo terapêutico no tratamento de tumores (Costantini *et al.*, 2000; Galluzzi *et al.*, 2006). Outro importante fator que deve ser considerado são os dados que mostram que muitos dos efeitos deletérios de drogas em diversos órgãos, entre eles o fígado, está relacionado à ação prejudicial destas drogas sobre a função mitocondrial. Várias drogas já foram retiradas do mercado devido à citototoxicidade apresentada no fígado causada por uma função mitocondrial danificada (Scatena, 2004; Masubuchi *et al.*, 2006; Ong *et al.*, 2006). Infelizmente, muitos destes efeitos dependem de cada indivíduo e não são descobertos antes que uma grande parcela da população de pacientes tenha sido exposta. No entanto, este tipo de acontecimento pode ser evitado com o conhecimento dos mecanismos de ação de um determinado agente nas mitocôndrias das células alvo. Desta forma pode-se avaliar não somente a ação nas mitocôndrias das

células alvo, mas também ter uma projeção de possíveis efeitos em células normais.

Os dados obtidos neste trabalho também indicam um efeito nas mitocôndrias das células HepG2 causado pelo 3-BrPA. Este efeito é observado quando nenhum acréscimo na produção de lactato foi observado após a adição de antimicina A nas células que foram incubadas com 3-BrPA, indicando que a taxa de produção de lactato já se encontrava em seu fluxo máximo (Figura 11A). Quando se compara o efeito de retirada de glicose do meio com o efeito do 3-BrPA na produção de lactato, nota-se que este último não inibiu completamente a produção de lactato pela via glicolítica (Figura 11A). Portanto, a adição de um inibidor da fosforilação oxidativa deveria, ao menos em teoria, estimular a produção de lactato por estas células na presença de 3-BrPA. A falta de efeito sugere que a fosforilação oxidativa já se encontrava inibida. O efeito do 3-BrPA na função mitocondrial é mais claramente observado quando a produção de lactato foi medida nas células incubadas com este composto em um meio sem glicose (Figuras 11 A e B, triângulos). Nesta situação, as fontes de carbono para a síntese de lactato são o glicogênio e principalmente a oxidação de glutamina, como mostrado anteriormente (Reitzer *et al.*, 1979; DeBerardinis *et al.*, 2007) (Figura 7). A substituição da glicose pela glutamina (meio sem glicose, Figura 11B, triângulos abertos) induziu uma estimulação máxima da fosforilação oxidativa. Isto é sugerido devido ao fato de que a adição de antimicina A nas células controle em um meio sem glicose causa um estímulo de 8,5 vezes na produção de lactato, indicando que as células estavam mais oxidativas antes de sua adição. O observado decréscimo na formação de lactato devido ao tratamento com 3-BrPA indica uma diminuição na glutaminólise e, portanto, uma diminuição na capacidade oxidativa mitocondrial. Uma outra possibilidade seria a inibição da formação de lactato a partir dos estoques de glicogênio presentes nas células. Neste caso o 3-BrPA estaria agindo em outras reações que não a da HK, mais uma vez

indicando a possibilidade de outros alvos na via glicolítica para ação deste agente. Em adição, pode-se também hipotetizar que a inibição pelo 3-BrPA de certas enzimas, como a glutamato desidrogenase (Baker e Rabin, 1969), SDH (Sanborn *et al.*, 1971; Kenney *et al.*, 1975) e enzima málica (Chang e Hsu, 1973; Satterlee e Hsu, 1991), todas envolvidas na produção de lactato a partir de glutamina, também podem estar contribuindo para os efeitos inibitórios mostrados na Figura 11B.

Coerentes com esta hipótese estão os resultados apresentados nas Figuras 14-18, que mostram os efeitos do 3-BrPA na função mitocondrial. Além dos parâmetros respiratórios mitocondriais, foi observado também que o 3-BrPA afeta a formação do potencial de membrana mitocondrial e os dados sugerem que de acordo com o estado respiratório da mitocôndria, o 3-BrPA pode estar afetando de forma diferente os complexos respiratórios (Figura 15). A pré-incubação com 3-BrPA causa um significativo decréscimo na taxa de consumo de oxigênio tanto nas células HepG2 intactas (Figura 16) quanto nas células permeabilizadas (Figuras 17 e 18), indicando que ele pode estar reagindo irreversivelmente com grupos tióis de enzimas do STE das células em cultura. Estes dados estão em acordo com estudos prévios *in vitro*, utilizando SDH de músculo cardíaco bovino (Sanborn *et al.*, 1971; Kenney, 1975) e PDH humana (Korotchikina, 1999). Nestes trabalhos foi observado que ambas as enzimas são bastante sensíveis à inibição por 3-BrPA e que este estaria agindo irreversivelmente com grupos tióis das mesmas.

Curiosamente, o grau de inibição da respiração das células HepG2 pelo 3-BrPA dependeu da fonte de carbono fornecida para as células. A glicose e a glutamina presentes no meio de cultura são rapidamente consumidas durante a proliferação de tumores e a utilização destes substratos está envolvida na manutenção de uma alta razão $[ATP]/[ADP]$ e $[NAD(P)H]/[NAD(P)^+]$. Nos experimentos realizados no presente trabalho com células pré-incubadas com 3-BrPA em um

meio sem glicose, um aumento na expressão de proteínas envolvidas na fosforilação oxidativa não seria esperado, porque 30 a 60 min. é um período curto para adaptação oxidativa mitocondrial (Rossignol *et al.*, 2004). Então, a inibição do STE pelo 3-BrPA ao nível de substratos relacionados ao complexo I (pyruvate/malate) (Figuras 17B e 18A), observada somente quando a pré-incubação foi realizada em um meio sem glicose, poderia ser o resultado de um decréscimo da relação $[NADH]/[NAD^+]$ e $[NADPH]/[NADP^+]$. Esta condição (ausência de glicose) poderia favorecer a formação de enzimas livres de substratos (devido a menor formação de piruvato e NADH) mais reativas ao 3-BrPA, assim como seu alterado estado redox, facilitando desta forma a alquilação de grupos tióis críticos ao nível da PDH e/ ou complexo I (Korotchkina, 1999). De fato, a inclusão de agentes redutores ou a adição de substratos protegem certas enzimas da inativação pelo 3-BrPA, entre elas a PDH (Kenney, 1975; Chang e Hsu 1977; Korotchkina *et al.*, 1999). Em adição, as vias de utilização de glutamina envolvem a glutamato desidrogenase e a enzima málica, as quais já demonstraram ser inibidas pelo 3-BrPA em sistemas de mamíferos. Estes potenciais alvos do 3-BrPA poderiam aumentar a inibição da respiração. Este parece não ser o caso quando as células são pré-incubadas com 3-BrPA em um meio com glicose, porque esta aumentaria a razão $[ATP]/[ADP]$, $[NADH]/[NAD^+]$ e $[NADPH]/[NADP^+]$, devido em parte, a operação da glicólise e da via das pentoses fosfato. De acordo, com glicose e glutamina no meio de incubação a inibição da utilização dos substratos relacionados ao complexo I não é aparente (Figuras 17B e 18D). No entanto, em ambas as condições, a respiração relacionada ao complexo II, i.e., a atividade da SDH, foi significativamente alterada (Figuras 17 e 18), em acordo com o efeito direto do 3-BrPA na SDH de células HepG2 apresentados na Figuras 20 e 21.

Os resultados obtidos com a inibição pelo 3-BrPA da atividade da SDH de células HepG2 (Figura 21A) comparados com os efeitos observados no consumo de oxigênio por estas células permeabilizadas

(Figura 14B) revelaram uma interessante relação (Figura 21B), onde se observa que mesmo tendo em uma determinada concentração de 3-BrPA uma significativa inibição da enzima SDH, nenhuma alteração da respiração é observada nas mesmas condições. Vários autores mostraram que é possível inibir consideravelmente a atividade de um complexo respiratório até um valor crítico, sem afetar a taxa de respiração mitocondrial ou a síntese de ATP. Este fenômeno é chamado de “efeito de limiar metabólico” e já foi demonstrado para os complexos I, II e IV, FoF1-ATP sintase, ANT, carreador de fosfato e carreador de piruvato em mitocôndrias isoladas e células humanas permeabilizadas (Letellier *et al.*, 1994; Rossignol *et al.* 1999; Rossignol *et al.* 2003). Este fenômeno de “limiar metabólico” pode ser demonstrado por curvas limiares, e pode ser explicado por três diferentes mecanismos: mobilização de uma reserva de atividade enzimática, regulação cinética dos complexos do STE e modulação da atividade global do STE por metabólitos intermediários. O primeiro mecanismo poderia ser explicado por um “excesso de complexos respiratórios ativos”, que poderiam ser utilizados como uma reserva para compensar um *déficit* de atividade. O *plateau* na curva limiar indica que esta reserva pode ser diminuída sem nenhum efeito no fluxo global da respiração (Rossignol *et al.*, 1999). Um outro mecanismo que poderia explicar o efeito de compensação é a regulação direta das enzimas envolvidas na fosforilação oxidativa em resposta a um decréscimo na produção de energia. Neste caso seriam observadas modificações nas propriedades cinéticas dos complexos (Rossignol *et al.*, 2003). Ainda, as atividades dos complexos respiratórios poderiam ser reguladas pelo gradiente eletroquímico de prótons (Elliot *et al.*, 2002). E por último, um outro mecanismo que poderia explicar o fenômeno de limiar metabólico seria um “tamponamento cinético” (compensação) da perturbação da atividade de uma enzima no fluxo global da rede metabólica através de variações nos intermediários metabólicos (coenzima Q, citocromo c, gradiente eletroquímico de prótons), os quais por vez sua modulariam a

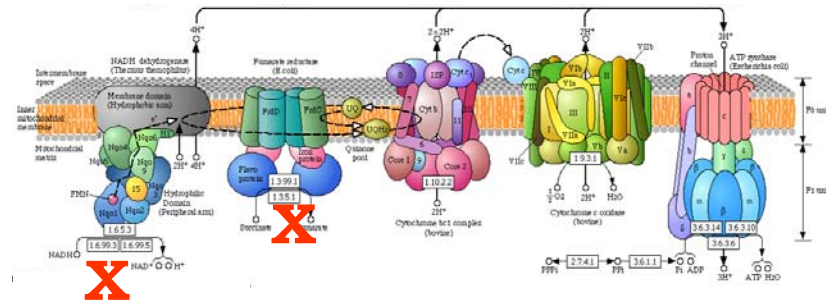
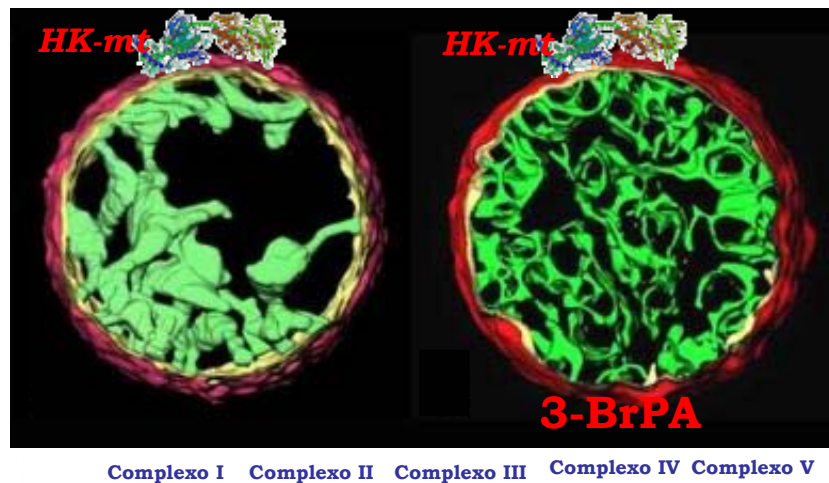
atividade de outras enzimas do sistema (complexos do STE), mantendo o fluxo respiratório inalterado (Reder, 1988; Rossignol *et al.*, 2003).

Uma outra significativa e, até então, desconhecida observação foi o aumento no vazamento de prótons nas células pré-incubadas com 3-BrPA em um meio com glicose (Figuras 16D e 18B). Este proton-leak pode representar a formação do poro de transição formado na membrana mitocondrial e este fenômeno é observado tanto em apoptose como em necrose (Lemasters, 1999; Armstrong, 2006a, 2006b; Tsujimoto e Shimizu, 2007). Uma possível explicação para este aumento no *proton-leak* seria a inibição da via glicolítica em uma reação após a reação da HK-mt, o que causaria um aumento nos níveis de glicose 6-fosfato levando a dissociação da HK-mt da membrana mitocondrial, favorecendo a ligação de proteínas pró-apoptóticas ao VDAC ou mesmo um aumento nos níveis de cálcio citoplasmático e captação pela mitocôndria, o que poderia provocar a formação de poros de transição de permeabilidade (PTPC). De fato, recentemente foi demonstrado que o 3-BrPA promove a dissociação da HK-mt do VDAC derivado de células Huh-BAT e MH134 (Kim *et al.*, 2007) de HCC. Por outro lado, pode-se especular que esta situação não ocorreria em células pré-incubadas com 3-BrPA em um meio sem glicose, uma vez que não foi observado um aumento na respiração associada ao *proton-leak* (Figuras 16C e 18A). De fato, o fluxo glicolítico parece ser menor na ausência de glicose, o que poderia diminuir o acúmulo de glicose 6-fosfato. Não se pode excluir também a possibilidade de que a reação do 3-BrPA com cisteínas cruciais (Cys 56) localizadas no ANT, uma proteína sabidamente envolvida na formação do PTPC, poderia estar envolvida neste processo (Costantini, 2000b; Halestrap e Brennerb, 2003). Entretanto, nos experimentos realizados neste trabalho não foi possível detectar um aumento na permeabilidade aos prótons quando um meio sem glicose foi utilizado. Um resumo da ação do 3-BrPA nas mitocôndrias das células HepG2 quando a incubação é feita na

presença de glicose e glutamina (com glicose) ou somente glutamina (sem glicose) é apresentado na Figura 22.

Os dados apresentados neste trabalho sugerem o 3-BrPA pode agir em várias enzimas celulares. No entanto, considerando o fato de que o metabolismo tanto de glicose como de glutamina são cruciais para o metabolismo energético de tumores, a SDH se torna um importante alvo de ação do 3-BrPA. Então, os efeitos do 3-BrPA na mitocôndria podem ser responsáveis, ao menos em parte, pelo decréscimo na viabilidade e morte de células de HCC. Esta informação poderá auxiliar no desenvolvimento de novos análogos ou compostos que irão ser mais específicos para as células tumorais, minimizando assim os possíveis danos de efeitos colaterais e o problema da ocorrência de HCC.

Cenário de morte de células HepG2 induzida por 3-BrPA em um meio sem glicose
Mitocôndria participa da morte celular sem envolver hexocinase.



Cenário de morte de células HepG2 induzida por 3-BrPA em um meio com glicose
Mitocôndria participa da morte celular mediada por glicose 6-fosfato e hexocinase.

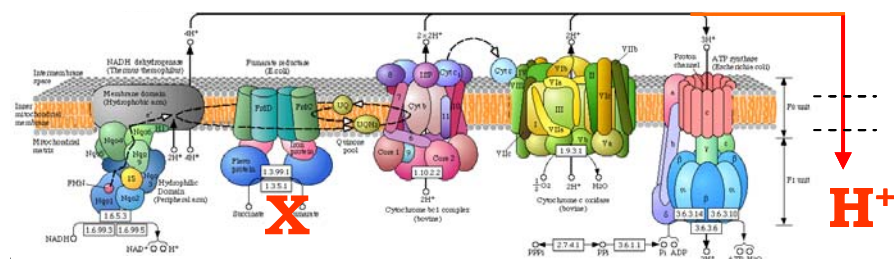
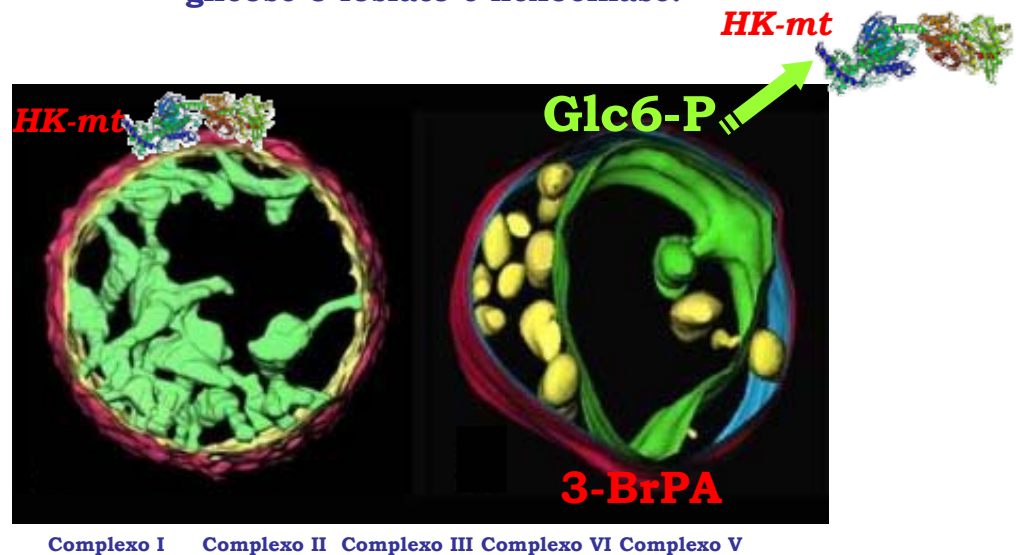


Figura 22: Resumo dos mecanismos propostos para a ação do 3-BrPA na indução da morte de células HepG2. A figura mostra um esquema onde podem ser observados os principais eventos participantes da ação do 3-BrPA em células HepG2, quando a incubação ocorre em um meio com glicose ou em um meio sem glicose. Os mecanismos propostos são discutidos no texto.

6-CONCLUSÕES

- A hexocinase mitocondrial não é o alvo preferencial de ação do 3-BrPA sobre a via glicolítica de células HepG2 nas condições testadas, portanto outras enzimas desta via provavelmente estão envolvidas neste processo;
- Os efeitos do 3-BrPA na respiração mitocondrial de células HepG2 dependem dos substratos presentes, o que pode ser um fator determinante nas respostas *in vivo* a este agente;
- Considerado a importância da utilização da glicose e glutamina nas células tumorais, a succinato desidrogenase representa um importante alvo de ação do 3-BrPA em células HepG2;
- Quando na presença de ambos os substratos (glicose e glutamina) a exposição por um breve período ao 3-BrPA é capaz de promover uma alteração na permeabilidade da membrana mitocondrial interna das células HepG2.
- O conjunto de resultados indica que assim como a via glicolítica, a mitocôndria possui um importante papel na morte celular induzida pelo 3-BrPA em células HepG2;

7-REFERÊNCIAS

- Abu-Hamad S *et al.* (2008) Hexokinase -I protection against apoptotic cell death is mediated via interaction with the voltage-dependent anion channel-1: Mapping the site of binding. *J Biol Chem*, **28**, *in press*.
- Acan NL e Ozer N (2001) Modification of human erythrocyte pyruvate kinase by an active site-directed reagent: bromopyruvate. *J Enzyme Inhib*, **16**, 457-464.
- Adami HO *et al.* (1996) Excess risk of primary liver cancer in patients with diabetes mellitus. *J Natl Cancer Inst*, **88**, 1472-1473.
- Akerman KE e Järvisalo JO (1980) Effects of ionophores and metabolic inhibitors on the mitochondrial membrane potential within isolated hepatocytes as measured with the safranine method. *Biochem J*, **192**, 183-190.
- Aleshin AE *et al.* (1996) Crystallization and preliminary X-ray analysis of human brain hexokinase. *FEBS Lett*, **391**, 9-10.
- Aleshin AE *et al.* (1998) Regulation of hexokinase I: crystal structure of recombinant human brain hexokinase complexed with glucose and phosphate. *J Mol Biol*, **282**, 345-357.
- Armstrong JS (2006a) Mitochondria: a target for cancer therapy. *Br. J. Pharmacol*, **147**, 239-248.
- Armstrong JS (2006b) The role of the mitochondrial permeability transition in cell death. *Mitochondrion*, **6**, 225-234.
- Azoulay-Zohar H *et al.* (2004) In self-defence: hexokinase promotes voltage-dependent anion channel closure and prevents mitochondria-mediated apoptotic cell death. *Biochem J*, **377**, 347-55.
- Baker JP e Rabin BR (1969) Effects of bromopyruvate on the control and catalytic properties of glutamate dehydrogenase. *Eur J Biochem*, **11**, 154-159.
- Berg J, Tymoczko J e Stryer L (2002) Biochemistry, 5th ed., New York: W.H. Freeman and Company.

- Bernstein FC *et al.* (1977) The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. *J. Mol. Biol.* **112**, 535-542.
- Bismuth H, Houssin D e Ornowski Meriggi F (1986) Liver resection in cirrhotic patients: a western experience abstract. *World J Surg*, **10**, 311.
- Blum R *et al.* (2005) Ras inhibition in glioblastoma down-regulates hypoxia-inducible factor-1alpha, causing glycolysis shutdown and cell death. *Cancer Res*, **65**, 999 -1006.
- Brahimi-Horn MC, Chiche J e Pouysségur J (2007) Hypoxia signalling controls metabolic demand. *Curr Opin Cell Biol*, **19**, 223-229.
- Breedis C e Young G (1954) The blood supply of neoplasm of the liver. *Am J Pathol*, **30**, 969-985.
- Brown CG (1992) Control of respiration and ATP synthesis in mammalian mitochondria and cells. *Biochem J*, **284**, 1-13.
- Chang GG e Hsu RY (1973) The substrate analog bromopyruvate as a substrate, an inhibitor and an alkylating agent of malic enzyme of pigeon liver. *Biochem Biophys Res Commun*, **55**, 580-587.
- Chang JM *et al.* (2007) Local toxicity of hepatic arterial infusion of hexokinase II inhibitor, 3-bromopyruvate: In vivo investigation in normal rabbit model. *Acad Radiol*. **14**, 85-92.
- Chang MH *et al.* (1997) Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in children. Taiwan Childhood Hepatoma Study Group. *N Engl J Med*, **336**, 1855-1859.
- Chen C *et al.* (2001) Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. *J Biol Chem*, **276**, 9519-9525.
- Chen MF *et al.* (1989) Hepatic resection in 120 patients with hepatocellular carcinoma. *Ann Surg*, **124**, 1025-1028.
- Chen Z *et al.* (2007) The Warburg effect and its cancer therapeutic implications. *J Bioenerg Biomembr*, **39**, 267-274.

- Cillo U *et al.* (2006) Prospective validation of the Barcelona Clinic Liver Cancer staging system. *J Hepatol*, **44**, 723–731.
- Costantini P *et al.* (2000a) Mitochondrion as a novel target of anticancer chemotherapy. *J Natl Cancer Inst.* **92**, 1042-1053.
- Costantini P *et al.* (2000b) Oxidation of a critical thiol residue of the adenine nucleotide translocator enforces Bcl-2-independent permeability transition pore opening and apoptosis. *Oncogene*, **19**, 307-314.
- Dalgard CL *et al.* (2004) Endogenous 2-oxoacids differentially regulate expression of oxygen sensors. *Biochem J*, **380**, 419-424.
- Dancey J e Sausville EA (2003) Issues and progress with protein kinase inhibitors for cancer treatment. *Nat Rev Drug Discov*, **2**, 296-313.
- da-Silva WS *et al.* (2004) Mitochondrial bound hexokinase activity as a preventive antioxidant defense: steady-state ADP formation as a regulatory mechanism of membrane potential and reactive oxygen species generation in mitochondria. *J Biol Chem*, **279**, 39846-39855.
- D'Aurelio M *et al.* (2001) Decreased Pasteur effect in platelets of aged individuals. *Mech Ageing Dev*, **122**, 823-833.
- DeBerardinis RJ *et al.* (2007) Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **104**, 19345-19350.
- Desagher S *et al.* (1999) Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol*, **144**, 891–901.
- Deuffic S *et al.* (1998) Trends in primary liver cancer. *Lancet*, **351**, 214-215.
- Eagle H (1935) Nutritional needs of mammalian cells in tissue culture. *Science*; **122**, 501-504.

- Elliott SJ *et al* (2002) Detection and interpretation of redox potential optima in the catalytic activity of enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* **1555**, 54-59.
- El-Serag HB (2002) Hepatocellular carcinoma: an epidemiologic view. *J Clin Gastroenterol*, **35**, S72-8.
- El-Serag HB e Mason AC (1999) Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States. *N Engl J Med*, **340**, 745-750.
- El-Serag HB e Mason AC (2000) Risk factors for the rising rates of primary liver cancer in the United States. *Arch Intern Med*, **160**, 3227-3330.
- El-Serag HB e Rudolph KL (2007) Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*, **132**, 2557-2576.
- Elstrom RL *et al.* (2004) Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res*, **64**, 3892-3899.
- Estabrook R (1967) Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP:O ratios. *Methods Enzymol.* **10**: 41-47.
- Fattovich G *et al.* (1997) Morbidity and mortality in compensated cirrhosis type C: a retrospective follow-up study of 384 patients. *Gastroenterology*, **112**, 463-72.
- Ferrari M, Fornasiero MC e Isetta AM (1990) MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. *J. Immunol. Methods.* **131**, 165-172.
- Fruton JS (1972) *Molecules and Life: Historical Essays on the Interplay Of Chemistry and Biology*, Wiley, New York.
- Gallucci BB. (1985) Selected concepts of cancer as a disease: From the Greeks to 1900. *Oncol Nurs Forum*, **12**, 67-71.
- Galluzzi L *et al.* (2006) Mitochondria as therapeutic targets for cancer chemotherapy. *Oncogene*, **25**, 4812-4830.
- Garcia M *et al.* (2007) *Global Cancer Facts & Figures 2007*. Atlanta, GA: American Cancer Society.

- Gatenby RA e Gillies RJ (2004) Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer*, **4**, 891–899.
- Georgiades CS *et al.* (2001) New nonsurgical therapies in the treatment of hepatocellular carcinoma. *Tech Vasc Interv Radiol*, **4**, 193–199.
- Geschwind JF *et al.* (2000) Chemoembolization of liver tumor in a rabbit model: assessment of tumor cell death with diffusion-weighted MR imaging and histologic analysis. *J Vasc Interv Radiol*, **11**, 1245–1255.
- Geschwind JF *et al.* (2002) Novel therapy for liver cancer: direct intraarterial injection of a potent inhibitor of ATP production. *Cancer Research* **62**, 3909–3913.
- Goodman ZD (2007) Neoplasms of the liver. *Mod Pathol*. **20**, S49–60.
- Gottlieb E e Tomlinson IP (2005) Mitochondrial tumour suppressors: a genetic and biochemical update. *Nat Rev Cancer*, **5**, 857–866.
- Gottlob K *et al.* (2001) Inhibition of early apoptotic events by Akt/PKB is dependent on the first committed step of glycolysis and mitochondrial hexokinase. *Genes Dev*, **15**, 1406–1418.
- Gwak G *et al.* (2005) Hypoxia stimulates proliferation of human hepatoma cells through the induction of hexokinase II expression. *Journal of Hepatology*, **42**, 358–364.
- Hagland H *et al.* (2007) Targeting mitochondria in the treatment of human cancer: a coordinated attack against cancer cell energy metabolism and signalling. *Expert Opin Ther Targets*, **11**, 1055–1069.
- Halestrap AP e Brennerb C (2003) The adenine nucleotide translocase: a central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death. *Curr Med Chem*, **10**, 1507–1525.
- Hamilton SD e Pardue HL (1984) Quantitation of lactate by a kinetic method with an extend range of linearity and low dependence on experimental variables. *Clin. Chem.* **30**, 226–229.
- Hanau S *et al.* (1995) Bromopyruvate for the affinity labelling of a single cysteine residue near the carboxylate binding site of lamb liver 6-phosphogluconate dehydrogenase. *Biochem Mol Biol Int*, **37**, 785–793.

- Hengartner MO (2000) *Nature*. The biochemistry of apoptosis. **407**, 770-776.
- Jemal A *et al.* (2007) Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin*, **57**, 43-66.
- Jones AR, Gillan L e Milmlow D (1995) The anti-glycolytic activity of 3-bromopyruvate on mature boar spermatozoa in vitro. *Contraception*, **52**, 317-320.
- Kajanti M *et al.* (1992) Intra-arterial and intravenous use of 4' epidoxorubicin combined with 5-fluorouracil in primary hepatocellular carcinoma: a randomized comparison. *Am J Clin Oncol*, **15**, 37- 40.
- Kenney WC (1975) The reaction of N-ethylmaleimide at the active site of succinate dehydrogenase. *J Biol Chem*, **250**, 3089-3094.
- Kiechle FL e Zhang X (2002) Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. *Clin Chim Acta*, **326**, 27-45.
- Kim JW e Dang CV (2005) Multifaceted roles of glycolytic enzymes. *Trends Biochem Sci*, **30**, 142-150.
- Kim JW *et al.* (2006) HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab*, **3**:177-185.
- Kim W *et al.* (2007) Apoptosis-inducing antitumor efficacy of hexokinase II inhibitor in hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer Ther*, **6**, 2554-2562.
- Ko YH *et al.* (2004) Advanced cancers: eradication in all cases using 3-bromopyruvate therapy to deplete ATP. *Biochem Biophys Res Commun*, **324**, 269-275.
- Ko YH, Pedersen PL e Geschwind JF (2001) Glucose catabolism in the rabbit VX2 tumor model for liver cancer: characterization and targeting hexokinase. *Cancer Lett*, **173**: 83-91.
- Kobayashi N *et al.* (1999) Co-expression of Bcl-2 protein and vascular endothelial growth factor in hepatocellular carcinomas treated by chemoembolization. *Liver*, **19**, 25-31.

- Korotchkina LG, Showkat, AM e Patel MS (1999) Involvement of alpha-cysteine-62 and beta-tryptophan-135 in human pyruvate dehydrogenase catalysis. *Arch Biochem Biophys*, **369**, 277-287.
- Kovacevic Z e McGivan JD. (1983) Mitochondrial metabolism of glutamine and glutamate and its physiological significance. *Physiol*, **63**, 547-605.
- Krebs H (1970) The History of the Tricarboxylic Acid Cycle. *Perspect Biol Med*, **14**, 154-170.
- Krebs HA (1972) The Pasteur effect and the relations between respiration and fermentation. *Essays Biochem*, **8**, 1-34.
- Kulik LM *et al.* (2007) Emerging approaches in hepatocellular carcinoma. *J Clin Gastroenterol*, **41**, 839-854.
- Lawson DH *et al.* (1986) Diabetes mellitus and primary hepatocellular carcinoma. *Q J Med*. **61**, 945-955.
- Lehninger AL, Nelson DL e Cox MM (2002) Lehninger princípios de bioquímica, 3ª ed. São Paulo: Sarvier.
- Lemasters JJ (1999) V. Necrapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. *Am J Physiol*, **276**, 1-6.
- Lenzen S e Munday R (1991) Thiol-group reactivity, hydrophilicity and stability of alloxan, its reduction products and its N-methyl derivatives and a comparison with ninhydrin. *Biochem Pharmacol*, **12**, 1385-1391.
- Lenzen S *et al.* (1990) Alloxan and ninhydrin inhibition of hexokinase from pancreatic islets and tumoural insulinsecreting cells. *Pharmacol Toxicol*, **66**, 157-162.
- Lenzen S, Brand FH e Panten U (1988a) Structural requirements of alloxan and ninhydrin for glucokinase inhibition and of glucose for protection against inhibition. *Br J Pharmacol*, **95**, 851-859.
- Lenzen S, Freytag S e Panten U (1988b) Inhibition of glucokinase by alloxan through interaction with SH groups in the sugar-binding site of the enzyme. *Mol Pharmacol*, **34**, 395-400.

- Lenzen S, Tiedge M e Panten U (1987) Glucokinase in pancreatic B-cells and its inhibition by alloxan. *Acta Endocrinol*, **115**, 21-29.
- Letellier T *et al.* (1994) The kinetic basis of the threshold effects observed in mitochondrial diseases: a systemic approach. *Biochem. J.* **302**, 171-174.
- Linder-Horowitz M, Knox WE e Morris HO. (1969) Glutaminase activities and growth rates of rat hepatomas. *Cancer Res*, **29**, 1195-1199.
- Llovet JM, Burroughs A e Bruix J. (2003) Hepatocellular carcinoma. *Lancet*, **362**, 1907-1917.
- Llovet JM, Fuster J e Bruix J. (1999) Intention-to-treat analysis of surgical treatment for early hepatocellular carcinoma: resection versus transplantation. *Hepatology*, **30**, 1434-1440.
- Lo CM *et al.* (2002) Randomized controlled trial of transarterial lipiodol chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, **35**, 1164-1171.
- Lopez AD *et al.* (2006) Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: Systematic analysis of population health data. *Lancet*, **367**, 1747-1757.
- Ma W *et al.* (2007) A pivotal role for p53: balancing aerobic respiration and glycolysis. *J Bioenerg Biomembr*, **39**, 243-246.
- Maciel EN *et al.* (2004) Mitochondrial permeability transition in neuronal damage promoted by Ca²⁺ and respiratory chain complex II inhibition. *J Neurochem.* **90**, 1025-1035.
- Majewski N *et al.* (2004) Hexokinase-mitochondria interaction mediated by Akt is required to inhibit apoptosis in the presence or absence of Bax and Bak. *Mol Cell*, **16**, 819-830.
- Maluf D *et al.* (2005) Hepatic angiosarcoma and liver transplantation: case report and literature review. *Transplant Proc*, **37**(5), 2195-2199.
- Martin H (1963) A proposed glossary of cancer. *CA Cancer J Clin*, **13**, 227-231.

- Masubuchi Y, Kano S e Horie T (2006) Mitochondrial permeability transition as a potential determinant of hepatotoxicity of antidiabetic thiazolidinediones. *Toxicology*, **222**, 233-239.
- Mathupala SP, Ko YH e Pedersen PL (2006) Hexokinase II: cancer's double-edged sword acting as both facilitator and gatekeeper of malignancy when bound to mitochondria. *Oncogene*, **25**, 4777-4786.
- Matoba S *et al.* (2006) p53 regulates mitochondrial respiration. *Science*. **312**, 1650-1653.
- McGlynn KA *et al.* (2001) International trends and patterns of primary liver cancer. *Int J Cancer*. **94**, 290-296
- McGuire JJ (2003) Anticancer antifolates: current status and future directions. *Curr Pharm*, **9**, 2593-2613.
- Merlo-Pich M *et al.* (2004). Methods to detect mitochondrial function. *Exper Gerontol*, **39**, 277-281.
- Meyers RL (2007) Tumors of the liver in children. *Surg Oncol*, **16**, 195-203.
- Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer (1999) Estimativa da Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil - 1999. Rio de Janeiro. MS/INCA.
- Ministério da Saúde/Instituto Nacional de Câncer (2008) Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2007. 94p.
- Moreno-Sánchez R *et al.* (2007) Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J.* **274**, 1393-1418.
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, **65**, 55-63.
- Mulichak *et al.* (1998) The structure of mammalian hexokinase-1. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 555-560.
- Munday R, Ludwig K e Lenzen S (1993) The relationship between the physicochemical properties and the biological effects of alloxan and

- several N-alkyl substituted alloxan derivatives. *J. Endocrinol.* **139**, 153-63.
- Nakashima RA, Paggi MG e Pedersen PL (1984) Contributions of glycolysis and oxidative phosphorylation to adenosine 5'-triphosphate production in AS-30D hepatoma cells. *Cancer Res.* **44**, 5702-5706.
- Oberley LW e Buettner GR (1979) Role of superoxide dismutase in cancer: a review. *Cancer Res*, **39**, 1141-1149.
- Okuda K, Nakanuma Y e Miyazaki M (2002) Cholangiocarcinoma: recent progress. Part 1: epidemiology and etiology. *J Gastroenterol Hepatol*, **17**, 1049-1055.
- Ong MM, Latchoumycandane C e Boelsterli UA (2007) Troglitazone-induced hepatic necrosis in an animal model of silent genetic mitochondrial abnormalities. *Toxicol. Sci*, **97**, 205-213.
- Owen OE, Kalhan SC e Hanson RW (2002) The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function. *J Biol Chem*, **277**, 30409-30412.
- Papandreou I *et al.* (2006) HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab*, **3**, 187-197.
- Parkin DM *et al.* (1993) Cholangiocarcinoma: epidemiology, mechanisms of carcinogenesis and prevention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **2**, 537-544.
- Parkin DM *et al.* (2001) Estimating the world cancer burden: GLOBOCAN 2000. *Int J Cancer*, **94**, 153-156.
- Parkin DM (1992) Cancer Incidence in five continents, Lyon: IARC Scientific Press.
- Pastorino JG, Shulga N e Hoek JB (2002) Mitochondrial binding of hexokinase II inhibits Bax-induced cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem*, **277**, 7610-7618.
- Pauser S *et al.* (1996) Evaluation of efficient chemoembolization mixtures by magnetic resonance imaging therapy monitoring: an

- experimental study on the VX2 tumor in the rabbit liver. *Cancer Res.* **56**, 1863-1867.
- Pedersen PL (1978) Tumor mitochondria and the bioenergetics of cancer cells. *Prog Exp Tumor Res*, **22**, 190-274.
- Pedersen PL (2007a) The cancer cell's "power plants" as promising therapeutic targets: An overview. *J. Bioenerg. Biomembr* **39**, 1-12.
- Pedersen PL (2007b) Warburg, me and hexokinase 2: multiple discoveries of key molecular events underlying one of cancer's' most common phenotypes, the Warburg Effect", i.e, elevated glycolysis in the presence of oxygen. *J. Bioenerg. Biomembr*, **39**, 211-222.
- Pedersen PL *et al.* (2002) Mitochondrial bound type II hexokinase: a key player in the growth and survival of many cancers and an ideal prospect for therapeutic interventions. *Biochimica et Biophysica Acta* **1555**, 14-20.
- Pelicano H *et al.* (2006) Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene*, **25**, 4633-4646.
- Philips D, Blake, CCF e Watson HC (1981) The enzymes of glycolysis: Structure, activity and evolution. *Phil. Trans. R. Soc. Lon. [Biol.]* **293**, 1-214.
- Plas DR e Thompson CB (2005) Akt-dependent transformation: there is more to growth than just surviving. *Oncogene*, **24**, 7435-7342.
- Pouyssegur J, Dayan F e Mazure NM (2006) Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature*, **441**, 437-443.
- Reder, C (1988) Metabolism control theory: a structural approach. *J. Theor. Biol.* **135**, 175-201.
- Reitzer U, Wice BM e Kennell D (1979) Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. *J Biol Chem*, **254**, 2669-2775.
- Roberts LR e Gores GJ. (2005) Hepatocellular carcinoma: molecular pathways and new therapeutic targets. *Sem Liver Dis*, **25**, 212-225.

- Robey RB e Hay N (2005) Mitochondrial hexokinases. Guardians of the mitochondria. *Cell Cycle* **4**, 654-658.
- Rossignol R *et al.* (2004) Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. *Cancer Res*, **64**, 985-993.
- Rossignol R *et al.* (2003) Mitochondrial threshold effects. *Biochem J*. **370**, 751-762.
- Rossignol, R *et al.* (1999) Threshold effect and tissue specificity. *J. Biol. Chem.* **274**, 33426-33432.
- Rous P, Kidd JG e Smith WE (1952) Experiments on the cause of the rabbit carcinomas derived from virus-induced papillomas. II. Loss by the Vx2 carcinoma of the power to immunize hosts against the papilloma virus. *J Exp Med*, **96**, 159-74.
- Sanborn BM, Felberg NT e Hollocher TC (1971) The inactivation of succinate dehydrogenase by bromopyruvate. *Biochim Biophys Acta*, **227**, 219-231.
- Satterlee J e Hsu RY (1991) Duck liver malic enzyme: sequence of a tryptic peptide containing the cysteine residue labeled by the substrate analog bromopyruvate. *Biochim Biophys Acta*, **1079**, 247-252.
- Scatena R *et al.* (2004) Mitochondrial respiratory chain dysfunction, a non receptor-mediated effect of syntetic PPAR-ligands. Biochemical and pharmacological implications. *Biochem Biophys Res Commun*, **319**, 967-973.
- Semenza GL (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, **3**, 721-732.
- Shi Y (2006) Mechanical aspects of apoptosome assembly. *Curr. Opin. Cell Biol*, **18**, 677-684.
- Souba, WW (1993) Glutamine and cancer. *Ann Surg*, **218**, 715-728.
- Stuart KE, Anand AJ e Jenkins RL (1996) Hepatocellular carcinoma in the United States. Prognostic features, treatment outcome, and survival. *Cancer*, **77**, 2217-2222.

- Sun Y *et al.* (1993) Lowered antioxidant enzymes in spontaneously transformed embryonic mouse liver cells in culture. *Carcinogenesis*, **14**, 1457-1463.
- Susin SA *et al.* (1997) The central executioner of apoptosis: multiple connections between protease activation and mitochondria in Fas/APO-1/CD95- and ceramide induced apoptosis. *J Exp Med*, **186**, 25-37.
- Tanaka Y *et al.* (2002) A comparison of the molecular clock of hepatitis C virus in the United States and Japan predicts that hepatocellular carcinoma incidence in the United States will increase over the next two decades. *Proc Natl Acad Sci*, **99**, 15584-1589.
- Taylor-Robinson SD *et al.* (1997) Increase in primary liver cancer in the UK, 1979-94. *Lancet*, **350**, 1142-1143.
- Thomas AP e Halestrap AP (1981) Identification of the protein responsible for pyruvate transport into rat liver and heart mitochondria by specific labelling with [3H]N-phenylmaleimide. *Biochem J*, **196**, 471-479.
- Thomas DD *et al.* (2004) Hypoxic inducible factor 1alpha, extracellular signal-regulated kinase, and p53 are regulated by distinct threshold concentrations of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 8894-8899.
- Tiedge M, Richter T e Lenzen S (2000) Importance of cysteine residues for the stability and catalytic activity of human pancreatic beta cell glucokinase. *Arch Biochem Biophys*, **375**, 251-60.
- Tippett PS e Neet KE (1983) Interconversions between different sulfhydrylrelated kinetic states in glucokinase. *Arch Biochem Biophys*, **222**, 285-298.
- Triolo VA (1965) Nineteenth century foundations of cancer research advances in tumor pathology, nomenclature, and theories of oncogenesis, *Cancer Res*, **25**, 75-106.
- Tsai HJ e Wilson JE (1995) Functional organization of mammalian hexokinases: characterization of chimeric hexokinases constructed

- from the N- and C-terminal domains of the rat type I and type II isozymes. *Arch Biochem Biophys*, **316**, 206- 214.
- Tsujimoto Y e Shimizu S (2007) Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death. *Apoptosis*, **12**, 835-840.
- Vali M *et al.* (2007) Intraarterial therapy with a new potent inhibitor of tumor metabolism (3-bromopyruvate): identification of therapeutic dose and method of injection in an animal model of liver cancer. *J Vasc Interv Radiol*. **18**, 95-101.
- Van De Loosdrecht AA (1994) A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leukemia. *J Immunol Methods*, **174**, 311-320.
- Venook AP *et al.* (1990) Chemoembolization for hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol*, **8**, 1108– 1114.
- Voet D e Voet JG (1995) Biochemistry, 2nd ed. New York: John Wiley and Sons, Inc.
- Vyssokikh MY *et al.* (2002). Bax releases cytochrome c preferentially from a complex between porin and adenine nucleotide translocator. Hexokinase activity suppresses this effect. *Mol Biol Rep*, **29**, 93-96.
- Wang X (2001) The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*, **15**, 2922-2933.
- Warburg O (1956) On respiratory impairment in cancer cells. *Science*, **124**, 269-270.
- Willis SN *et al.* (2007) Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science* **315**, 856–859.
- Wilson J (2003) Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. *J Exp Biol*, **206**, 2049-2057.
- Wilson JE (1995) Hexokinases. *Physiol Biochem Pharmacol*, **126**, 65-198.
- Wilson JE (1995) Hexokinases. *Physiol Biochem Pharmacol*, **126**, 65-198.

- Wilson JE (1997) An introduction to the isoenzymes of mammalian hexokinase types I-III. *Biochem Soc Trans*, **25**, 103-107.
- Wolter KG *et al.* (1997) Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol*, **139**, 1281-1292.
- Xiong ZP *et al.* (2004) Association between vascular endothelial growth factor and metastasis after transcatheter arterial chemoembolization in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, **3**, 386-390.
- Xu R *et al.* (2005) Inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy to overcome compound resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia. *Cancer Res*, **65**, 613-621.
- Yao FY *et al.* (2003) A follow-up analysis of the pattern and predictors of dropout from the waiting list for liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma: implications for the current organ allocation policy. *Liver Transplantation*, **9**, 684-692.
- Youle RJ (2007) Cell biology. Cellular demolition and the rules of engagement. *Science*, **315**, 776-777.
- Youle RJ e Strasser A (2008) The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**, 47-59.
- Yu MC e Yuan JM (2004) Environmental factors and risk for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, **127**, S72-S78.
- Zamzami N *et al.* (1996) Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med*, **183**, 1533-1544.
- Zou H *et al.* (1997) Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*, **90**, 405-413.

ANEXO 1

Differential Inhibition of Energy-Producing Pathways of HepG2 cells by 3-Bromopyruvate[†]

Ana Paula Pereira da Silva^{a,b}, Tatiana El-Bacha^b, Nattascha Kyaw^a, Reinaldo Sousa dos Santos^a, Wagner Seixas da-Silva^a, Andrea T. Da Poian^b and Antonio Galina^{a#}

^a*Laboratório de Bioenergética e Fisiologia Mitocondrial, Programa de Bioquímica e Biofísica Celular, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av. Brigadeiro Trompowsky, s/n, – CCS, Bl. D, ss13, 21941-590, RJ-Brasil.* ^b*Laboratório de Bioquímica de Vírus, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ-Brasil.*

[†]This work is dedicated to Leopoldo de Meis on his 70th birthday

[#] To whom correspondence should be addressed (e-mail: galina@bioqmed.ufrj.br)
Tel. number: +55-21-2260-9573. Fax number: +55-21-2271635.

Short title: HepG2 energy pathways inhibition by 3-bromopyruvate

Abbreviations used: ANT, adenine nucleotide transporter; 3-BrPA, 3-bromopyruvate; DCPIP, 2,6-dichlorophenol-indophenol; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium; DTT, dithiothreitol; ETS, electron transport system; FBS, fetal bovine serum; FCCP, carbonylcyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone; G6P, glucose 6-phosphate; GFM, glucose-free medium; GK, glucokinase or hexokinase type IV; GM, glucose medium; HCC, hepatocellular carcinoma; IC₅₀, half-maximum inhibition value; MEM, Eagle's Minimum Essential Medium; mt-HK, mitochondrial hexokinase; MTT, 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Oligo, oligomycin; PDH, pyruvate dehydrogenase; Pyr/Mal, pyruvate plus malate; Rot, rotenone; SDH, succinate dehydrogenase; Succ, succinate; VDAC, voltage dependent anion channel.

Synopsis

3-Bromopyruvate (3-BrPA) is an alkylating agent with anti-tumoral activity on hepatocellular carcinoma. This compound inhibits cellular ATP production due its action on glycolysis and oxidative phosphorylation. However, the specific metabolic steps and mechanisms of 3-BrPA action in human hepatocellular carcinoma cell lines, particularly its effects on mitochondrial energetic, are poorly understood. In this study, we report that incubation of HepG2 cells with a low concentration of 3-BrPA for a short period (150 μ M for 30 minutes) significantly affected both lactate production and mitochondrial respiratory functions of HepG2 cells. 3-BrPA was also able to impair lactate production by HepG2 cells in a glucose-free medium. Oxygen consumption of HepG2 cells supported by either pyruvate/malate or succinate was inhibited when the cells were pre-incubated with 3-BrPA in a glucose-free medium. When the cells were pre-incubated in a glucose-medium, respiration of HepG2 was blocked only when succinate was used as oxidizable substrate. An increased oligomycin-independent respiration was observed in HepG2 cells treated with 3-BrPA in glucose, but not in glucose-free medium, indicating that 3-BrPA induces mitochondrial proton leakage besides its blockage in electron transport system. The activity of mitochondrial hexokinase was not inhibited by 150 μ M 3-BrPA, however this concentration causes 70% inhibition of the succinate dehydrogenase activity. These results suggest that the combined action of 3-BrPA on succinate dehydrogenase, as well as the inhibition of glycolysis in a step downstream the glucose phosphorylation, play an important role in HepG2 cell death.

Key words: 3-BrPA, HepG2, tumor cells, hepatocellular carcinoma, mitochondria, glycolysis, oxygen consumption.

INTRODUCTION

Cancer cells depend on large quantities of energy to maintain elevated rates of proliferation. In this regard, specific adaptations in energy metabolic pathways are observed, including activation of glycolysis and down regulation of oxidative phosphorylation, also known as Warburg effect [1-3], a metabolic signature of many tumor cells. Accordingly, the effects of specific drugs designed to interfere with the energy yielding pathways of many types of cancers have been investigated [4-7]. This is the case of the analogue of pyruvate/lactate, 3-BrPA, an alkylating agent able to react with thiol and hydroxyl groups of several enzymes [8-14].

Studies with HCC cells, have demonstrated that the main blocking site of 3-BrPA is the mt-HK type II, what causes an impairment of glycolytic flux [15, 16]. In addition, 3-BrPA seems to affect mitochondrial respiration, although the exact mechanism of mitochondrial collapse was not identified [15]. Subsequent works have confirmed 3-BrPA as an agent able to cause ATP depletion in tumor cells, with no apparent effect to non-transformed cells [17-19]. As a result, 3-BrPA has been considered a potent agent in the treatment against the proliferation of HCC [7, 17, 18, 20, 21]. In addition to 3-BrPA effects on energy homeostasis, few studies have suggested that this compound induces cell death either through activation of mitochondrial pathway of apoptosis or necrosis, reinforcing the involvement of mitochondria in 3-BrPA mechanism of action [7, 16, 19, 22]. Given that the precise mechanisms by which 3-BrPA affects mitochondrial physiology and bioenergetics are still unknown, a detailed characterization of the pharmacological action of this anti-tumoral agent is crucial to the development of more efficient treatments.

In the present study it is demonstrated for the first time that brief exposure of a HCC cell line, HepG2, to 3-BrPA in a micromolar range leads to a severe impairment of mitochondrial respiratory function by affecting specifically succinate-dehydrogenase activity. An interesting observation is that when cells are forced to rely on mitochondrial oxidative phosphorylation rather than glycolysis, 3-BrPA effects on respiratory parameters appears to be more pronounced. Moreover, we show evidences that 3-BrPA, at the concentrations used, inhibits glycolytic flux in a way that seems not to be dependent on mt-HK II inhibition. The metabolic implications of such results to HepG2 cell death are discussed in an attempt to better understand the action of 3-BrPA *in vivo*.

EXPERIMENTAL

Cell culture

HepG2, a human HCC cell line, was obtained from American Type Collection (USA) and grown in MEM with 5mM glucose, supplemented with 10% FBS, 0.22% sodium bicarbonate and 0.2% Hepes, pH 7.4 at 37°C in a humidified incubation chamber with 5% CO₂. For viability assays, cells were grown on 24 well plates. For all other assays, cells were grown on plastic Petri dishes. In each assay, cells were seeded at a density of 10⁵ cells per mL. Cells were sub-cultured every 2 to 4 days and used on experiments when they were nearly 95% confluent.

Cell viability

Different concentrations of 3-BrPA was added to culture medium and incubated at 37°C for 30, 60, 90 and 180 minutes. Then, cells were washed twice with PBS and cells viability was accessed using MTT assay as described previously [23,24]. Additionally, cell viability was also cross checked by using Trypan blue assay by microscopic counting.

Animal care and use

The experimental protocols were approved by the Comittee for Ethics in Animal Research of the Universidade Federal do Rio de Janeiro in compliance with the Brazilian College for Animal Experimentation.

Lactate production

Culture medium was replaced with fresh medium containing 150 µM 3-BrPA and cells were incubated at 37°C. Two different culture media were used: glucose free medium (DMEM, Invitrogen 11966-025), which contains only glutamine as an oxidizable substrate (GFM) and glucose free medium supplemented with 5 mM glucose (GM). Both media were supplemented with 0.02 % Hepes. At the indicated times, samples of 50 or 100 µL from culture medium were collected to evaluate lactate production. The assay for lactate measurement was performed in a hydrazine/ glycine buffer, pH 9.2 containing 10 mg/mL β-NAD⁺ and 30 U/ml lactate dehydrogenase to final volume of 200 µL. The absorbance due to formation of NADH was monitored in a microplate reader (SpectraMax M5, Molecular Devices, USA) for 30 minutes, at 340 nm and correlated with the presence of lactate on samples from a standard curve [25].

Hexokinase isoforms preparations and activities measurements

Mitochondrial fractions for measurements of mt-HK type I (mouse brain) [26] and type II (HepG2 cells) [27] activities were prepared as previously described. HepG2 cells were disrupted by liquid N₂ addition and mixed to a buffer containing 10 mM Tris, 20 mM NaF, 1 mM DTT, 250 mM sucrose, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 10 µM leupeptin, 1 µM pepstatin A, pH 7.0. The suspension was centrifuged at 1000 g for 5 min at 4°C, and the resulting supernatant was centrifuged at 10000 g for 15 min at 4°C. The final pellet was resuspended and used in experiments. GK activity was measured in soluble fractions of mouse liver. Briefly, liver was excised and homogenized with a potter in a medium containing 20 mM Trietanolamine (pH 7.5), 5 mM EGTA, 100 mM glucose, 100 mM KCl, 1 mM DTT, 5% glycerol, 5 mM EDTA, 0.25% NaN₃, 0.5 mM PMSF. The homogenate was centrifuged at 100000 g for 40 min. Ammonium sulfate (NH₄)₂SO₄ for 45% of saturation was added to the supernatant and centrifuged at 15000 g for 10 min. (NH₄)₂SO₄ for 65% of saturation was added to the resulting supernatant

and centrifuged at 15000 g for 10 min. The final pellet was suspended in a small volume of medium and used in the experiments. Activities of mt-HK I, II and GK were measured using an adaptation of a radiometric assay described previously [28]. The assay was performed at 37°C in 0.4 ml of reaction medium containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM MgCl₂, 1 mM [γ -³²P] ATP (3000 cpm/nmol ATP), 10 mM glucose (mt-HK types I and II) or 100 mM glucose (GK), 1 mM NaVO₄, 5 mM NaN₃ and different concentrations of 3-BrPA. Duplicates were performed for all assays and blanks were obtained in the absence of glucose. Reaction was started by addition of protein (0.1 mg/ml) and quenched by addition of 1 ml of activated charcoal in 0.1 N HCl to remove [γ -³²P] ATP not utilized. After centrifugation (1000 g for 15 minutes), 0.4 mL aliquots of supernatant were added to liquid scintillation vials and counted. The resulting radioactivity corresponds to [³²P]-G6P formed from HK catalyzed reaction.

Oxygen consumption of intact and digitonin-permeabilized HepG2 cells

Oxygen consumption rates were measured polarographically in an oximeter using a Clark type oxygen electrode (Oxytherm, Hansatech Instrument, United Kingdom) or using high-resolution respirometry (OROBOROS Oxygraph-O2K). The electrode was calibrated between 0 and 100% saturation with atmospheric oxygen at 37°C. To measure the direct effect of 3-BrPA concentrations on mitochondrial respiration, HepG2 cells were removed from culture dishes through trypsinization and approximately 2.5 to 5x10⁶ cells were added to a respiration medium containing: 0.25 M manitol, 0.1% fatty acid free BSA, 10 mM MgCl₂, 10 mM KH₂PO₄, pH 7.2 as previously described [29] followed by the sequential addition of digitonin (0.005% w/v), 10 mM succinate (complex II substrate), 100 μ M ADP (ATP synthesis substrate), 0.05 mM to 5 mM 3-BrPA and 1 μ M FCCP.

For measurements of mitochondrial respiration following the treatment with 3-BrPA, HepG2 cells were pre-incubated with 150 μ M 3-BrPA for 30 minutes at 37°C, with GM or GFM. After the incubation period, media were removed and cells were either suspended in the same culture medium of pre-incubation, for measurements of oxygen consumption of intact cells, or in the respiration medium described above, for evaluation of respiratory complexes of permeabilized cells. Basal consumption, oligomycin-independent respiration (proton leak) and FCCP-stimulated respiration (maximum respiration) were accessed in intact HepG2 cells as described previously [30]. 3-BrPA effects on respiratory complexes of digitonin-permeabilized HepG2 cells (0.005% w/v) were performed following the addition of different substrates/modulators as 10mM pyruvate + 10 mM malate (complex I- linked substrates), 10 mM succinate, 1 μ M rotenone, 50 μ M ADP, 1 μ g/ml oligomycin and 1 μ M FCCP or titration from 250 to 750 nM FCCP.

Succinate dehydrogenase activity

SDH activity was determined spectrophotometrically using DCPIP as an artificial electron acceptor and succinate as substrate [31, 32]. The assay was performed at room temperature in 1.0 ml of reaction medium containing 20 mM phosphate buffer (pH 7.2), 0.1 % Triton X-100, 4 mM NaN₃, 5 mM succinate, 50 μ M DCPIP and 2.5 to 300 μ M 3-BrPA. Blanks were obtained in the absence of succinate. The reaction was started by adding of 0.1 mg of HepG2 mitochondrial fraction (prepared as described for the mt-HK activity using the same buffer, but without DTT) and reduction of DCPIP was monitored at 600 nm, for 3 minutes. The SDH activity was calculated using the extinction coefficient of reduced DCPIP 21.0 mM⁻¹ cm⁻¹. SDH activity in the presence of 3-BrPA is presented as a percentage of control activity.

Protein determination

The protein concentration in the samples was determined as described by Lowry et al. [33].

Statistical analysis

Statistical analysis were performed using Origin® 7.5 (OriginLab Corporation). All results are expressed as means $\pm$ S.E.M. for n independent experiments. Statistical significance was determined by Student's t test. Differences were considered statistically significant for $p < 0.05$ or $p < 0.01$.

RESULTS

3-BrPA affects HepG2 viability in a dose and time-dependent manner

Figure 1A shows that cell incubation with 10-100 μ M 3-BrPA for up to 60 minutes caused a small 10% decrease in viability. On the other hand, 50 μ M 3-BrPA incubation for 180 minutes caused a significant 50% decrease in HepG2 viability ($p < 0.05$). Higher concentrations of 3-BrPA (1-5mM) were effective to promote more than 30 % reduction in HepG2 viability in all times tested ($p < 0.05$). Similar results were obtained using trypan blue exclusion assay at micromolar range (Figure 1B). These results suggest that depending on the concentration and period of exposure to 3-BrPA, this compound may act on different intracellular targets with distinct affinities and reactivity.

Low concentration of 3-BrPA decreases lactate production by HepG2 cells either GM or GFM media

Glucose availability is an important factor controlling energy production for cancer cell survival. It has been proposed that 3-BrPA inhibits glycolytic flux and that this inhibition is associated with a decrease in cell viability [15, 18]. To check whether this is the case for HepG2 cells, lactate production was followed in cells incubated with 150 μ M 3-BrPA for up to 60 minutes (Figure 2), a condition that cause a 25% decrease in cell viability (Figure 1, open circle).

In order to also evaluate the contribution of the utilization of endogenous substrates, such as glycogen (bypassing HK reaction), on lactate production, cells were incubated with glucose (GM-cells) or glucose-free (GFM-cells) medium. The addition of antimycin A, an inhibitor of oxidative phosphorylation, forces cells to rely only on glycolysis for ATP production. In this situation, it is expected that lactate formation be stimulated, mimicking the Pasteur Effect [34, 35]. Indeed, addition of antimycin A to HepG2 cells incubated with standard GM caused a 3-fold increase ($p < 0.05$) in lactate production (Figure 2A, open circles), indicating that cells were already near maximum glycolytic capacity. On the other hand, treatment of GM-cells with 3-BrPA led to a 3-fold decrease ($p < 0.05$) in lactate production. An intriguing finding was that no net increase in lactate production was observed when antimycin A was added to 3-BrPA treated GM-cells (Figure 2A, closed circles). As expected, GFM-cells presented a 16-fold decrease ($p < 0.05$) in the rate of lactate formation compared to GM-cells (Figure 2A and B, open and closed triangles). Figure 2B shows a magnification of the effect of antimycin A presented in Figure 2A on lactate production by GFM-cells. In contrast to GM-cells, antimycin A induced an 8.5-fold increase ($p < 0.05$) in the rate of lactate production when glucose is withdrawn from the medium (Figure 2B, open triangles). An interesting finding was that 3-BrPA significantly inhibited lactate formation by

about 1.5-fold (Figure 2B, closed triangles) and addition of antimycin A caused no increase in this parameter.

Low concentrations of 3-BrPA does not inhibit mt-HK activity but decreases mitochondrial oxygen consumption of HepG2 cells

In order to evaluate whether mt-HK II inhibition could be responsible for the observed effects of 3-BrPA on glycolysis of HepG2 cells, we tested its direct effect on HK activity measured radiometrically. Surprisingly, only a 20% decrease in mt-HK activity was observed when cells were incubated for 20 minutes with 3-BrPA at concentrations as high as 5mM ($p<0.05$) (Figure 3A, open circles). To check whether the inhibition of mt-HK activity by 3-BrPA was dependent on the time of incubation, we followed G6P production for up to 60 minutes (Figure 3B). When 150 μ M 3-BrPA was used, the time course of reaction was not altered. On the other hand, a 30% inhibition (3.01 ± 0.3 to $2.1\pm0.1\mu\text{mol G6P} \times \text{mg ptn}^{-1}$) of mt-HK activity was observed with 5 mM of the compound ($p<0.05$).

3-BrPA is an alkylating agent acting on SH or/and OH groups of many enzymes [8-14]. Therefore, differences on the reactivity of enzymes from different tissues would be expected. For that reason, we tested the inhibition pattern of different HK isoforms by 3-BrPA (mt-HK I and GK). It becomes apparent that GK presented higher sensitivity for 3-BrPA than mt-HK I or II (Figure 3A, closed circles). The half-maximum inhibition of GK for 3-BrPA was obtained between 300 to 400 μ M, while for the two other HK isoforms, 5 mM 3-BrPA caused only a small inhibition (20%) ($p<0.05$). These results indicate that mt-HK II from HepG2 cells can not be inhibited by 3-BrPA at the conditions that promoted inhibition of the glycolytic flux.

Although it has been suggested that mitochondrial respiration is affected by 3-BrPA [15], there is no available data in the literature about the mechanisms involved in this process. Direct effects of 3-BrPA on mitochondrial respiration of HepG2 cells were evaluated after cell permeabilization and 3-BrPA titration. Figures 3C and D show that when respiration was supported by succinate, oxygen consumption of digitonin-permeabilized HepG2 cells was strongly inhibited by 3-BrPA addition. When 400 μ M of the compound was added, state 3 respiration (ADP stimulated respiration coupled to ATP-synthesis) was completely inhibited (Figure 3C and D). The IC_{50} value for 3-BrPA inhibition was 150 μ M (Figure 3D). The inhibition of oxygen consumption by 3-BrPA probably is due to a blockage of electron transport in ETS, since addition of a proton ionophore (FCCP), that would fully stimulate respiration if the inhibition was at the level of $\text{ADP}\leftrightarrow\text{ATP}$ re-cycling system (ANT/FoF1-ATP synthase), was not able to increase oxygen consumption (Figure 3C). No effect of the same 3-BrPA concentration was observed in the azide sensitive ATPase activity (data not shown).

Pre-incubation with 3-BrPA affects mitochondrial respiratory parameters of intact and permeabilized HepG2 cells

In addition to the direct effects of 3-BrPA, the respiratory parameters of HepG2 cells were also assessed after pre-incubation with this compound (Figures 4, 5 and 6). As for lactate production, cells were incubated with glucose (GM-cells) or glucose-free (GFM-cells) media to analyze possible differences in the effects of 3-BrPA when glycolysis and oxidative phosphorylation were differentially stimulated. Figure 4A shows that GFM-cells pre-incubated with 150 μ M 3-BrPA for 30 minutes present a 50% decrease in basal (3.1 ± 0.19 to $1.6\pm0.13 \text{ nmol O}_2/\text{min} \times 10^6 \text{ cells}$) and FCCP-stimulated maximum respiration (3.5 ± 0.22 to $1.9\pm0.3 \text{ nmol O}_2/\text{min} \times 10^6 \text{ cells}$) ($p<0.01$). Additionally, no difference was observed in the respiratory rate not coupled to ATP

synthesis, the proton leak (oligomycin-independent respiration) (Figure 4A). A different situation was observed in GM-cells (Figure 4B), where 3-BrPA caused only a 20% inhibition of basal respiration (2.1 ± 0.12 to 1.6 ± 0.1 nmol O₂/ min x 10⁶ cells) ($p < 0.05$) and no difference was detected on FCCP-stimulated maximum respiration. Curiously, despite the apparent small effect of 3-BrPA treatment in GM-cells basal respiration, oligomycin-independent respiration was almost twice higher than that measured on control cells (0.6 ± 0.1 to 1.1 ± 0.1 nmol O₂/ min x 10⁶ cells) ($p < 0.05$) (Figure 4B). These results indicate that depending on the carbon source utilized, 3-BrPA has distinct effects on energy metabolism of HepG2 cells.

To analyze in more detail the effects of 3-BrPA on mitochondrial function and ETS complexes activities, oxygen consumption was measured on digitonin-permeabilized cells using high-resolution respirometry (Figures 5 and 6). Following incubation with 150 μ M 3-BrPA for 30 minutes, GFM-cells presented a significant decrease in complex I (7.8 ± 1.4 to 3.8 ± 0.6 pmol O₂/ sec x 10⁶ cells) and succinate-driven respiration (54 ± 9.3 to 29.6 ± 3.5 pmol O₂/ sec x 10⁶ cells) ($p < 0.05$) (Figures 5B and 6A). Total electron transport capacity after FCCP titrations was significantly decreased (84.6 ± 8.3 to 44.4 ± 9 pmol O₂/ sec x 10⁶ cells) ($p < 0.05$) (Figures 5B and 6A), while oxygen flow related to proton leak was not significantly altered (Figures 5B and 6A), as observed with intact cells (Figure 4A). Different effects of 3-BrPA treatment on respiratory parameters were observed in GM-cells when compared to GFM-cells (Figures 5D and 6B). 3-BrPA was able to significantly decrease only the oxygen flow induced by succinate (35.7 ± 5.7 to 15 ± 4.4 pmol O₂/ sec x 10⁶ cells) ($p < 0.05$). In similar manner to the respiratory flow observed for intact GM-cells (Figure 4), 3-BrPA did not affect maximum respiration flow induced by FCCP and promoted a 3-fold increase in proton leak respiration of permeabilized cells (4.4 ± 0.95 to 14.2 ± 4.2 pmol O₂/ sec x 10⁶ cells) ($p < 0.05$) (Figures 5D and 6B). Moreover, the respiratory control induced by ADP was delayed after 3-BrPA treatment in GFM-cells either with pyruvate/malate or succinate as respiratory substrates (Figure 5B). However, in GM-cells, 3-BrPA treatment did not change the response to ADP when pyruvate/malate was used to induce respiration, but the respiratory control induced by ADP was slowed when succinate was the respiratory substrate (Figure 5D).

3-BrPA titration and threshold curves of succinate dehydrogenase activity in HepG2 cells mitochondria

The group of results presented in Figures 5 and 6 points to a preferential inhibition of mitochondrial respiratory complex II succinate dehydrogenase (SDH) activity after 3-BrPA treatment in both GM and GFM-cells. To check this hypothesis, we measured the direct effect of 3Br-PA on the activity of SDH of HepG2 mitochondrial fraction (Figure 7A). Accordingly, the data confirmed that SDH from HepG2 cells was inhibited by 3-BrPA, presenting an IC₅₀ value between 10 to 20 μ M.

SDH inhibition profile may not be strictly correlated with oxidative phosphorylation inhibition and, in fact, may vary among different cell types [36]. This phenomenon of biochemical threshold can be demonstrated by threshold curves, which may indicate either a deficiency or an “excess of enzyme activity” or a “buffering effect by the metabolic network” of a given complex of oxidative phosphorylation response. Figure 7B shows a threshold curve between the rates of oxygen consumption as a function of the degree of SDH inhibition attained by 3-BrPA titration. It becomes apparent that at the level of 50% inhibition of SDH activity, no significant inhibition of HepG2 mitochondrial respiration was observed. However, above this degree of SDH inhibition, a large drop in the respiratory rate was detected. More important, at 150 μ M

3-BrPA, which corresponds to 70 % inhibition of SDH activity, respiration was inhibited in 60% (Figure 7B).

DISCUSSION

HCC is an important health problem, being one of the most common fatal cancers worldwide [37]. The search for an efficient therapy led to the proposal of a new approach which consists in the direct intra-arterial administration of 3-BrPA to the liver. The treatment with 3-BrPA eradicates HCC without affecting healthy surrounding tissues of the host [17, 18]. The beneficial properties of this agent rely on its capacity to inhibit cellular energy machinery systems, i.e., glycolysis and oxidative phosphorylation [15]. However, the understanding of the specific metabolic steps and mechanisms of 3-BrPA action in human HCC cell lines, particularly its effects on mitochondria bioenergetics, are very limited. In the present study, we could establish the time course of 3-BrPA effects on HepG2 cells viability, which indicated that depending on the concentration, period of incubation and the substrates oxidized by the cells, 3-BrPA affects different metabolic pathways.

Cancer cells are believed to present an accelerated glycolysis, even in the presence of sufficient amounts of oxygen [1-3]. HepG2 cells follow this pattern, because only 3-fold stimulation on lactate production was observed when oxidative phosphorylation was inhibited through antimycin A addition (Figure 2A, open circles), while in non-transformed cell lines, the stimulatory effect on lactate production by antimycin A may be as high as 10-fold [34, 35]. In the presence of 3-BrPA, the amount of lactate produced is significantly decreased, indicating an inhibitory effect on glycolysis (Figure 2A, closed circles). The 70% inhibition of glycolysis cannot be explained by mt-HK inhibition (Figures 2A, 3A and 3B). Other candidates target enzymes for 3-BrPA action could be glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and 3-phosphoglycerate kinase, which, in a previous study, were immediately inhibited by 3-BrPA in a competitive manner [38]. On the other hand, since no stimulation of glycolysis is observed following the addition of antimycin A, which indicates that the rate of lactate production is on its maximum flux, 3-BrPA is also affecting mitochondrial function. Indeed, the effect of 3-BrPA on mitochondrial function is more clearly observed when lactate production was measured in GFM-cells (Figure 2B). In this situation, the carbon sources for lactate synthesis are glycogen and mainly glutamine oxidation, as already demonstrated [39, 40]. Since replacement of glucose by glutamine induces a maximum stimulation of oxidative phosphorylation, the observed decrease in lactate formation due to 3-BrPA treatment indicates a decrease in glutaminolysis and, ultimately, a decreased mitochondrial oxidative capacity. In addition, one can hypothesize that inhibition of glutamate dehydrogenase [41], succinate dehydrogenase [8, 11] and malic enzyme [9, 13], all of them involved on lactate production from glutamine by 3-BrPA, could also be contributing to the inhibitory effects shown in Figure 2B.

Indeed, the results presented on Figures 3C to 7 show, in more detail, the effects of 3-BrPA on mitochondrial respiratory parameters. Pre-incubation with 3-BrPA causes a significant decrease in the rate of oxygen consumption either in intact (Figure 4) or permeabilized (Figures 5 and 6) HepG2 cells, indicating that it may be reacting irreversibly to SH groups of ETS in cell cultured conditions, in accordance to previous *in vitro* assays shown for both SDH and pyruvate dehydrogenase (PDH) [8, 11, 14].

Curiously, the degree of inhibition of respiration by 3-BrPA depends on the carbon source supplied to cells (Figures 4-6). Glucose and glutamine are rapidly consumed during proliferation of tumors. The utilization of these substrates are engaged to maintain a high $[ATP]/[ADP]$ and $[NAD(P)H]/[NAD(P)^+]$ ratios. In our experiments in GFM-cells, a condition in which we observed significant alterations in mitochondria bioenergetics, an increase in expression of oxidative phosphorylation proteins is not expected to occur because 30 to 60 minutes is a short period for mitochondrial oxidative adaptation [42]. Therefore, the inhibition of ETS by 3-BrPA at the levels of complex-I linked substrates (pyruvate/malate) (Figures 5 and 6) may be the result of a decreased ratio of $[NADH]/[NAD^+]$ and $[NADPH]/[NADP^+]$ due to the lack of sufficient amounts of glucose. This could facilitate the alkylation of critical SH groups at the level of PDH and/or complex I, because GM favors the formation of enzymes free of substrates and thus more reactive to 3-BrPA [14]. In fact, the inclusion of reducing agents or the addition of substrates to mitochondrial dehydrogenase preparations protects these enzymes from inactivation by 3-BrPA [10, 11, 14]. This seems not be the case when glucose is present (GM-cells), due to, in part, the operation of glycolysis and pentose phosphate pathway, maintaining an adequate redox state. Thus, with glucose and glutamine, the inhibition of complex-I linked substrates (pyruvate/malate) was not apparent (Figure 6B). Despite the distinct effects on complex-I respiratory activity, it is important to emphasize that, in both conditions, complex II-driven respiration, i.e. SDH activity, was significantly reduced (Figure 6A and B), in agreement with the direct effects of 3-BrPA on SDH activity shown in Figure 7.

An interesting finding was that the proton leak was increased in the GM-cells (Figures 4 and 6). This proton leak may reflect the permeability transition pore formed in mitochondrial membrane, as observed in apoptosis or necrosis [43-46]. One possible explanation is that the inhibition of glycolysis in a different step than mt-HK reaction would increase G6P levels, leading to mt-HK dissociation from mitochondrial membrane favoring the binding of pro-apoptotic proteins to VDAC. It was recently demonstrated that 3-BrPA promotes the dissociation of mt-HK from VDAC derived from HCC Huh-BAT and MH134 cells [22]. Therefore, we may hypothesize that in GFM-cells, since 3-BrPA does not induce an increase in the respiration associated with proton leak, G6P levels are maintained at a low level and mt-HK dissociation does not occur (Figures 4 to 6). Additionally, we can not exclude the possibility that a reaction of 3-BrPA with crucial cysteines (e.g. Cys 56) located at the ANT may lead to the formation of permeability transition pore [47, 48].

Analyzing 3-BrPA effects on other HK isoforms, our results showed that GK, the major isoform on normal liver, was much more sensitive to 3-BrPA inhibition (Figure 3A) when compared to the mitochondrial isoforms. GK is characterized by a high susceptibility to sulfhydryl group oxidation [49] and a strong sensitivity toward sulfhydryl group reactive reagents [50-54]. Sulfhydryl group of the cysteine residues have been shown to modulate enzyme activity [55]. Alignments of HK sequences indicate that GK is much more closely related to the mt-HK II than to the yeast HK [56-58]. Thus, it would be expected that mt-HK II would react their SH groups with 3-BrPA causing its inhibition similarly to that observed with GK. However, the selective inhibition of GK cannot solely be attributed to the larger number of cysteine residues. This fact becomes evident from the spatial location of cysteine residues in the catalytically active C-terminal portion of low- K_M HK types I and II [59-61], which exhibits a density comparable to that of the GK [62]. In contrast to GK, low- K_M HKs show a nearly hundred-fold lower sensitivity toward inhibition of enzyme activity by SH group reagents such as alloxan [50, 53, 63]. The data in Figure 3A show a lower

inhibition of HepG2 mt-HK II when compared to mice liver GK by 3-BrPA treatment. Thus it may be concluded that 3-BrPA acts like a SH group reagent following a very similar pattern to those SH group reagents describe previously for GK and low- K_M HKs [55]. Previous data have shown that 3-BrPA inhibits almost completely mt-HK II from HCC [15]. The apparent contrasting results showed in Figure 3 and those described previously [15] may be explained, in part, by the protocol used to assay mt-HK activities in the present study, which started the reactions by the addition of enzyme in a medium containing ATP, glucose and 3-BrPA. In the previous study, 5 mM 3-BrPA was added to the mt-HK preparation before the addition of glucose [15]. In fact, it had been shown that cysteines residues of the catalytic site of GK and mt-HK II are much less sensitive to SH reagents while in contact with its substrates [55].

In conclusion, it seems that 3-BrPA may acts on several cellular enzymes and, based on the threshold inhibition curve (Figure 7B) we propose that SDH is an important target since glutamine and glucose metabolism is crucial to tumor energy metabolism. Therefore, the effects of 3-BrPA on mitochondria may be responsible for the decrease in viability and death of HCC cells. We believe that this information will help to design new analogues or compounds that will be more specific to cancer cells and thus minimizing the harmful side effects and the burden of HCC.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Dr. Erich Gnaiger for your kind technical advices regarding to the use of the high resolution respirometry in O2K Oroboros. This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

REFERENCES

- 1 Warburg, O. (1956) On respiratory impairment in cancer cells. *Science* **124**, 269-270.
- 2 Matoba, S., Kang, J.G., Patino, W.D., Wragg, A., Boehm, M., Gavrilova, O., Hurley, P.J., Bunz, F., Hwang, P.M. (2006) p53 regulates mitochondrial respiration. *Science*. **312**, 1650-1653.
- 3 Ma, W., Sung, H.J., Park, J.Y., Matoba, S., Hwang, P.M. (2007) A pivotal role for p53: balancing aerobic respiration and glycolysis. *J. Bioenerg. Biomembr.* **39**, 243-246.
- 4 Costantini, P., Jacotot, E., Decaudin, D., Kroemer, G. (2000). Mitochondrion as a novel target of anticancer chemotherapy. *J. Natl. Cancer Inst.* **92**:1042-1053.
- 5 Pedersen, P.L., Mathupala, S., Rempel, A., Geschwind, J.F., Ko, Y.H., Y.K. (2002) Mitochondrial bound type II hexokinase: a key player in the growth and survival of many cancers and an ideal prospect for therapeutic interventions. *Biochim. Biophys. Acta.* **1555**, 14–20.
- 6 Moreno-Sánchez, R., Rodríguez-Enríquez, S., Marín-Hernández, A., Saavedra, E. (2007) Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J.* **274**, 1393-1418.
- 7 Pedersen, P.L. (2007). The cancer cell's "power plants" as promising therapeutic targets: An overview. *J. Bioenerg. Biomembr.* **39**, 1-12.
- 8 Sanborn, B.M, Felberg, N.T, Hollocher, T.C. (1971) The inactivation of succinate dehydrogenase by bromopyruvate. *Biochim. Biophys. Acta.* **227**, 219-231.

- 9 Chang, G.G, Hsu, R.Y. (1973) The substrate analog bromopyruvate as a substrate, an inhibitor and an alkylating agent of malic enzyme of pigeon liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **55**, 580-587.
- 10 Chang, G.G., Hsu, R.Y. (1977) Mechanism of pigeon liver malic enzyme: kinetics, specificity, and half-site stoichiometry of the alkylation of a cysteinyl residue by the substrate-inhibitor bromopyruvate. *Biochemistry.* **16**, 311-320.
- 11 Kenney, W.C. (1975) The reaction of N-ethylmaleimide at the active site of succinate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **250**, 3089-3094.
- 12 Tunncliffe, G., Ngo, T.T. (1978) Mechanism of inactivation of brain glutamic decarboxylase by 3-bromopyruvate. *Int. J. Biochem.* **9**, 249-252.
- 13 Satterlee, J., Hsu, R.Y. (1991) Duck liver malic enzyme: sequence of a tryptic peptide containing the cysteine residue labeled by the substrate analog bromopyruvate. *Biochim. Biophys. Acta.* **1079**, 247-252.
- 14 Korotchikina, L.G., Showkat, A.M., Patel, M.S. (1999) Involvement of alpha-cysteine-62 and beta-tryptophan-135 in human pyruvate dehydrogenase catalysis. *Arch. Biochem. Biophys.* **369**, 277-287.
- 15 Ko, Y.H., Pedersen, P.L., Geschwind, J.F. (2001) Glucose catabolism in the rabbit VX2 tumor model for liver cancer: characterization and targeting hexokinase. *Cancer Letters* **173**, 83-91.
- 16 Gwak, G., Yoon, J., Kim, K., Lee, H., Chung, J., Gores, G. (2005). Hypoxia stimulates proliferation of human hepatoma cells through the induction of hexokinase II expression. *Journal of Hepatology.* **42**, 358-364.
- 17 Geschwind, J.F., Ko, Y.K., Torbenson, M.S., Magee, C., Pedersen, P.L. (2002) Novel therapy for liver cancer: direct intra-arterial injection of a potent inhibitor of ATP production. *Cancer Res.* **62**, 3909-3913.
- 18 Ko, Y.H., Smith, B.L., Wang, Y., Pomper, M.G., Rini, D.A., Torbenson, M.S., Hullihen, J., Pedersen, P.L. (2004) Advanced cancers: eradication in all cases using 3-bromopyruvate therapy to deplete ATP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **324**, 269-275.
- 19 Xu, R. Pelicano, Y.Z., Carew, J.S, Feng, L., Bhalla, K.N, Keating, M.J, Huang, P. (2005) Inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy to overcome compound resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia. *Cancer Res.* **65**, 613-621.
- 20 Mathupala, S.P., Ko, Y.H., Pedersen, P.L. (2006) Hexokinase II: cancer's double-edged sword acting as both facilitator and gatekeeper of malignancy when bound to mitochondria. *Oncogene.* **25**, 4777-4786.
- 21 Pedersen, P.L. (2007) Warburg, me and hexokinase 2: multiple discoveries of key molecular events underlying one of cancer's' most common phenotypes, the Warburg Effect", i.e, elevated glycolysis in the presence of oxygen. *J. Bioenerg. Biomembr.* **39**, 211-222.
- 22 Kim W., Yoon J.H., Jeong J.M., Cheon, G.J., Lee T.S., Yang, J.I., Park, S.C., Lee, H.S. (2007) Apoptosis-inducing antitumor efficacy of hexokinase II inhibitor in hepatocellular carcinoma. *Mol. Cancer Ther.* **6**, 2554-2562.
- 23 Ferrari, M., Fornasiero, M.C., Isetta, A.M. (1990) MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. *J. Immunol. Methods.* **131**, 165-172.
- 24 Van De Loosdrecht, A.A. (1994) A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leukemia. *J. Immunol. Methods.* **174**, 311-320.

- 25 Hamilton, S.D., Pardue H.L. (1984) Quantitation of lactate by a kinetic method with an extend range of linearity and low dependence on experimental variables. *Clin. Chem.* **30**, 226-229.
- 26 Maciel, E.N., Kowaltowski, A.J., Schwalm, F.D., Rodrigues, J.M., Souza, D.O., Vercesi, A.E., Wajner, M., Castilho, R.F. (2004) Mitochondrial permeability transition in neuronal damage promoted by Ca^{2+} and respiratory chain complex II inhibition. *J Neurochem.* **90**, 1025-1035.
- 27 Graham, J.M. and Rickwood, D. (Eds) (1997) Subcellular fractionation. A practical approach. Oxford University Press, Oxford.
- 28 Sola-Penna, M., dos Santos, A.C., Alves, G.G., El-Bacha, T., Faber-Barata, J., Pereira, M.F., Serejo, F.C., Da Poian, A.T., Sorenson, M. (2002) A radioassay for phosphofructokinase-1 activity in cell extracts and purified enzyme. *J. Biochem. Biophys. Methods.* **50**, 129-140.
- 29 Sakurai, K., Cederbaum, A.I. (1998) Oxidative stress and cytotoxicity induced by ferric-nitrolotriacetate in HepG2 cells that express cytochrome P450 2E1. *Mol. Pharmacol.* **54**, 1024-1035.
- 30 El-Bacha T., Midlej, V., Pereira da Silva, A.P., Silva da Costa, L., Benchimol, M., Galina, A., Da Poian A.T. (2007). Mitochondrial and bioenergetic dysfunction in human hepatic cells infected with dengue 2 virus. *Biochim. Biophys. Acta.* **1772**, 1158-1166.
- 31 Robinson, K.M., Lemire, B.D. (1995). Flavinylation of succinate: ubiquinone oxidoreductase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol.* **256**, 34-51.
- 32 Paul, M.K., Patkari, M., Mukhopadhyay, A.K. (2007). Existence of a distinct concentration window governing daunorubicin-induced mammalian liver mitotoxicity—implication for determining therapeutic window. *Biochem. Pharmacol.* **74**, 821-830.
- 33 Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- 34 D'Aurelio, M., Merlo-Pich M., Catani L., Sgarbi, G.L., Bovina, C., Formiggini, G., Parenti Castelli, G., Baum, H., Tura, S., Lenaz, G. (2001) Decreased Pasteur effect in platelets of aged individuals. *Mech Ageing Dev.* **122**, 823-833.
- 35 Merlo-Pich, M., Deleonardi G., Biondi, A., Lenaz, G. (2004). Methods to detect mitochondrial function. *Exper. Gerontol*, **39**, 277-281.
- 36 Rossignol, R., Malgat, M., Mazat, J.P., Letellier, T. (1999). Threshold effect and tissue specificity. Implication for mitochondrial cytopathies. *J. Biol. Chem.* **274**, 33426-33432.
- 37 Lopez, A.D., Mathers, C.D., Ezzati, M., Jamison, D.T, Murray, C.J. (2006). Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: Systematic analysis of population health data. *Lancet.* **367**, 1747-1757.
- 38 Jones, A.R., Gillan, L., Milmlow, D. (1995) The anti-glycolytic activity of 3-bromopyruvate on mature boar spermatozoa in vitro. *Contraception.* **52**, 317-320.
- 39 Reitzer, L.J., Wice, B.M., Kennell, D. (1979) Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. *J. Biol. Chem.* **254**, 2669-2676.
- 40 DeBerardinis, R.J., Mancuso, A., Daikhin, E., Nissim, I., Yudkoff, M., Wehrli, S., Thompson, C.B. (2007). Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**, 19345-19350.
- 41 Baker, J.P., Rabin, B.R. (1969) Effects of bromopyruvate on the control and catalytic properties of glutamate dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* **11**, 154-159.

- 42 Rossignol, R., Gilkerson, R., Aggeler, R., Yamagata, K., Remington, S.J., Capaldi, R.A. (2004) Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. *Cancer Res.* **64**, 985-993.
- 43 Lemasters, J.J. (1999) V. Necrapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. *Am. J. Physiol.* **276**, 1-6.
- 44 Armstrong, J.S. (2006) Mitochondria: a target for cancer therapy. *Br. J. Pharmacol.* **147**, 239-248.
- 45- Armstrong, J.S. (2006) The role of the mitochondrial permeability transition in cell death. *Mitochondrion.* **6**, 225-234.
- 46 Tsujimoto, Y., Shimizu, S. (2007) Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death. *Apoptosis.* **12**, 835-840.
- 47 Costantini, P., Belzacq, A.S., Vieira, H.L., Larochette, N., de Pablo, M.A., Zamzami, N., Susin, S.A., Brenner, C., Kroemer, G. (2000) Oxidation of a critical thiol residue of the adenine nucleotide translocator enforces Bcl-2-independent permeability transition pore opening and apoptosis. *Oncogene.* **19**, 307-314.
- 48 Halestrap, A.P., Brennerb, C. (2003) The adenine nucleotide translocase: a central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death. *Curr. Med. Chem.* **10**, 1507-1525.
- 49 Tippet, P.S., Neet, K.E. (1983) Interconversions between different sulfhydryl-related kinetic states in glucokinase. *Arch. Biochem. Biophys.* **222**, 285-298.
- 50 Lenzen, S., Tiedge, M., Panten, U. (1987) Glucokinase in pancreatic B-cells and its inhibition by alloxan. *Acta Endocrinol.* **115**, 21-29.
- 51 Lenzen, S., Brand, F.H., Panten, U. (1988) Structural requirements of alloxan and ninhydrin for glucokinase inhibition and of glucose for protection against inhibition. *Br. J. Pharmacol.* **95**, 851-859.
- 52 Lenzen, S., Freytag, S., Panten, U. (1988) Inhibition of glucokinase by alloxan through interaction with SH groups in the sugar-binding site of the enzyme. *Mol. Pharmacol.* **34**, 395-400.
- 53 Lenzen, S., Freytag, S., Panten, U., Flatt, P.R., Bailey, C.J. (1990) Alloxan and ninhydrin inhibition of hexokinase from pancreatic islets and tumoural insulin-secreting cells. *Pharmacol. Toxicol.* **66**, 157-162.
- 54 Lenzen, S., Munday, R. (1991) Thiol-group reactivity, hydrophilicity and stability of alloxan, its reduction products and its N-methyl derivatives and a comparison with ninhydrin. *Biochem. Pharmacol.* **12**, 1385-1391.
- 55 Tiedge, M., Richter, T., Lenzen, S. (2000) Importance of cysteine residues for the stability and catalytic activity of human pancreatic beta cell glucokinase. *Arch. Biochem. Biophys.* **375**, 251-60.
- 56 Tsai, H.J., Wilson, J.E. (1995) Functional organization of mammalian hexokinases: characterization of chimeric hexokinases constructed from the N- and C-terminal domains of the rat type I and type II isozymes. *Arch. Biochem. Biophys.* **316**, 206-214.
- 57 Wilson, J.E. (1995) Hexokinases. *Physiol. Biochem. Pharmacol.* **126**, 65-198.
- 58 Wilson, J.E. (1997) An introduction to the isoenzymes of mammalian hexokinase types I-III. *Biochem. Soc. Trans.* **25**, 103-107.
- 59 Aleshin, A.E., Zeng, C., Fromm, H.J., Honzatko, R.B. (1996) Crystallization and preliminary X-ray analysis of human brain hexokinase. *FEBS Lett.* **391**, 9-10.
- 60 Aleshin, A.E., Zeng, C., Bartunik, H.D., Fromm, H.J., Honzatko, R.B. (1998) Regulation of hexokinase I: crystal structure of recombinant human brain hexokinase complexed with glucose and phosphate. *J. Mol. Biol.* **282**, 345-357.

- 61 Mulichak, A.M., Wilson, J.E., Padmanabhan, K., Garavito, R.M. (1998) The structure of mammalian hexokinase-1. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 555-560.
- 62 Bernstein, F.C., Koetzle, T.F., Williams, G.J., Meyer, E.F. Jr, Brice, M.D., Rodgers, J.R., Kennard, O., Shimanouchi, T., Tasumi, M. (1977) The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. *J. Mol. Biol.* **112**, 535-542.
- 63 Munday, R., Ludwig, K., Lenzen, S. (1993) The relationship between the physicochemical properties and the biological effects of alloxan and several N-alkyl substituted alloxan derivatives. *J. Endocrinol.* **139**, 153-63.

FIGURE LEGENDS

Figure 1 Time-course of 3-BrPA effects on HepG2 cells viability

Cells in culture were incubated with different concentrations of 3-BrPA (50 μ M to 5000 μ M) for (●) 30, (○) 60, (■) 90 and (Δ) 180 min. Following incubation procedure, viability was accessed by MTT assay (A) or trypan blue exclusion assay (B) as described in Materials and methods. Values represents mean $\pm$ SEM; n = 5.

Figure 2 Lactate production by HepG2 cells in the presence of 3-BrPA

(A) HepG2 cells in culture were incubated in the absence (open symbols) or in the presence of 150 μ M 3-BrPA (closed symbols) in glucose medium (GM-cells) (circles) or in glucose-free medium (GFM-cells) (triangles) for up to 60 minutes as described in Material and methods. At 30 minutes of incubation (arrows) 2 μ g/ml antimycin A (Ant A) was added to the culture. Medium samples were removed at the times indicated and subjected for lactate determination. (B) Data obtained in the absence of glucose presented in (A), showing a magnification of antimycin A effect on lactate production. Values represents mean $\pm$ SEM; n = 4.

Figure 3 Effects of 3-BrPA on mt-HK II activity and mitochondrial oxygen consumption of HepG2 permeabilized cells

(A) Activities of mt-HK type I from mouse brain (▲), type II from HepG2 cells (○) and GK from mouse liver (●) were measured in the presence of different concentrations of 3-BrPA (0.01 to 5 mM) as described in Material and methods. (B) Time-course of mt-HK II activity in the absence (○), 150 μ M (▲) or 5 mM (●) of 3-BrPA. (C) Representative record of mitochondrial oxygen consumption of HepG2 permeabilized cells under different regimes. Cells were added to a standard respiration buffer and permeabilized by the addition of 0.005% (w/v) digitonin as described in Material and methods. When indicated by arrows the following substrates/modulators were added: 10 mM Succinate, 200 μ M ADP, 3-BrPA to obtain the final concentration as indicated and 1 μ M FCCP. (D) Rates of oxygen consumption in the presence of different concentrations of 3-BrPA. Values represent mean $\pm$ SEM; n = 4.

Figure 4 Effect of pre-incubation with 3-BrPA on oxygen consumption of intact HepG2 cells

Cells in culture were pre-incubated with 150 μ M of 3-BrPA for 30 minutes in absence (GFM-cells) (A) or presence (GM-cells) (B) of glucose as described in Materials and methods. Oxygen consumption was measured on same culture medium used on incubation step without FBS. Bars represents the rates of oxygen consumption under different regimes (Basal respiration, BASAL; FCCP induced maximum respiration, 1 μ M FCCP; and oligomycin-independent respiration, 1 μ g/mL OLIGO). Grey bars, control cells. Black bars, cells pre-incubated with 3-BrPA. Values represents mean $\pm$ SEM; n = 5. ** or * means significantly different from control cells (p <0.01 or p <0.05 respectively).

Figure 5 Representatives records of oxygen concentration (A and C) or oxygen flow (B and D) of permeabilized HepG2 cells pre-incubated with 3-BrPA

Cells in culture were pre-incubated with 150 μ M of 3-BrPA for 30 minutes in absence (GFM-cells) (A, B) or presence (GM-cells) (C, D) of glucose as described in Materials and methods. Oxygen consumption was measured using high-resolution respirometry

on standard respiration buffer after addition of cells and 0.005% (w/v) digitonin. When indicated by arrows the following substances were added: 10 mM pyruvate + malate, 50 μ M ADP, 1 μ M rotenone, 10 mM succinate, 1 μ g/ml oligomycin and FCCP as indicated.

Figure 6 Rates of oxygen consumption of permeabilized HepG2 cells pre-incubated with 3-BrPA

Cells in culture were pre-incubated with 150 μ M of 3-BrPA for 30 minutes in the absence (GFM-cells) (A) or presence (GM-cells) (B) of glucose as described in Materials and methods. Oxygen consumption was measured using high-resolution respirometry on standard respiration buffer after addition of cells and 0.005% (w/v) digitonin. The following substrates and/or modulators concentrations were added: 10 mM pyruvate + malate (Pyr/Mal), 50 μ M ADP, 1 μ M rotenone, 10 mM succinate (Succ), 1 μ g/ml oligomycin (Oligo) and 1 μ M FCCP. St4(CI) and St4(CII) means state 4 obtained when complex I (Pyr/Mal) or complex II (Succ) were stimulated, respectively. Grey bars, control cells. Black bars, cells pre-incubated with 3-BrPA. Values represents mean $\pm$ SEM; n = 5. * means significantly different from control cells ($p < 0.05$).

Figure 7 Titration and threshold curves of SDH activity in HepG2 mitochondria

(A) 3-BrPA titration curve: SDH activity was measured by a spectrophotometric method using DCPIP as an artificial electron acceptor as described in Material and methods. The reaction was started with the addition of HepG2 mitochondrial fraction (0.01mg/ml) in the absence or 2.5 to 300 μ M of 3-BrPA. Values are expressed as percentage of control activity. Control activity: 9.1 ± 1.1 nmol DCPIP $\times$ min⁻¹ $\times$ mg ptn⁻¹. (B) Threshold curves, percentage of respiratory rate as a function of percentage of SDH inhibition by 3-BrPA. Each point comes from the experimental titration curves and represents the percentage of the respiratory rate as a function of the percentage of the SDH activity for the same 3-BrPA concentration.

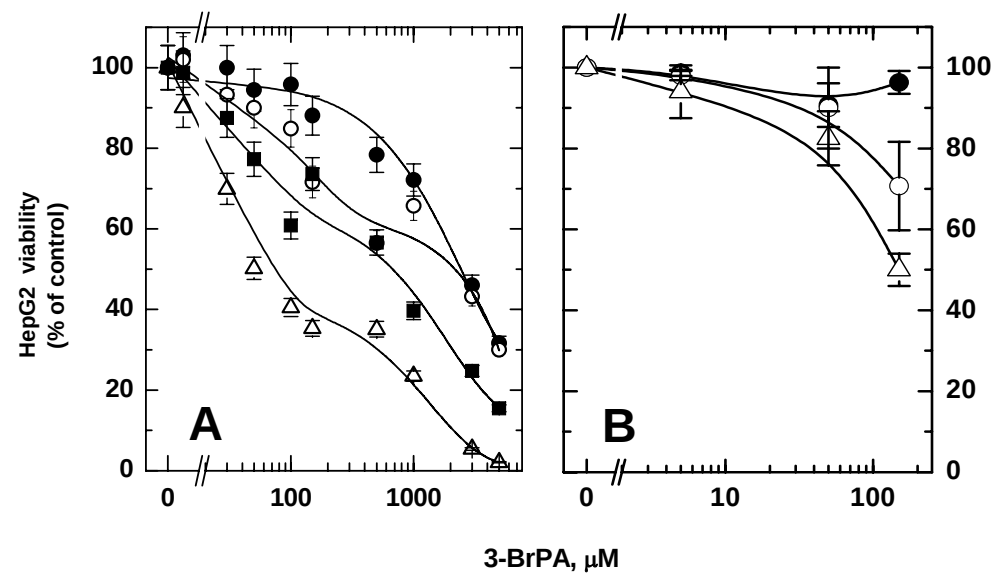


Figure 1

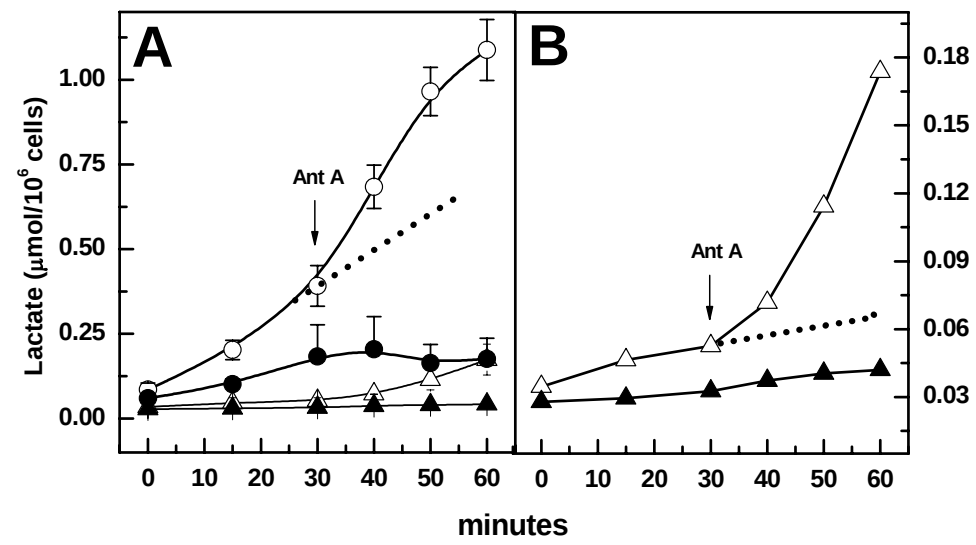


Figure 2

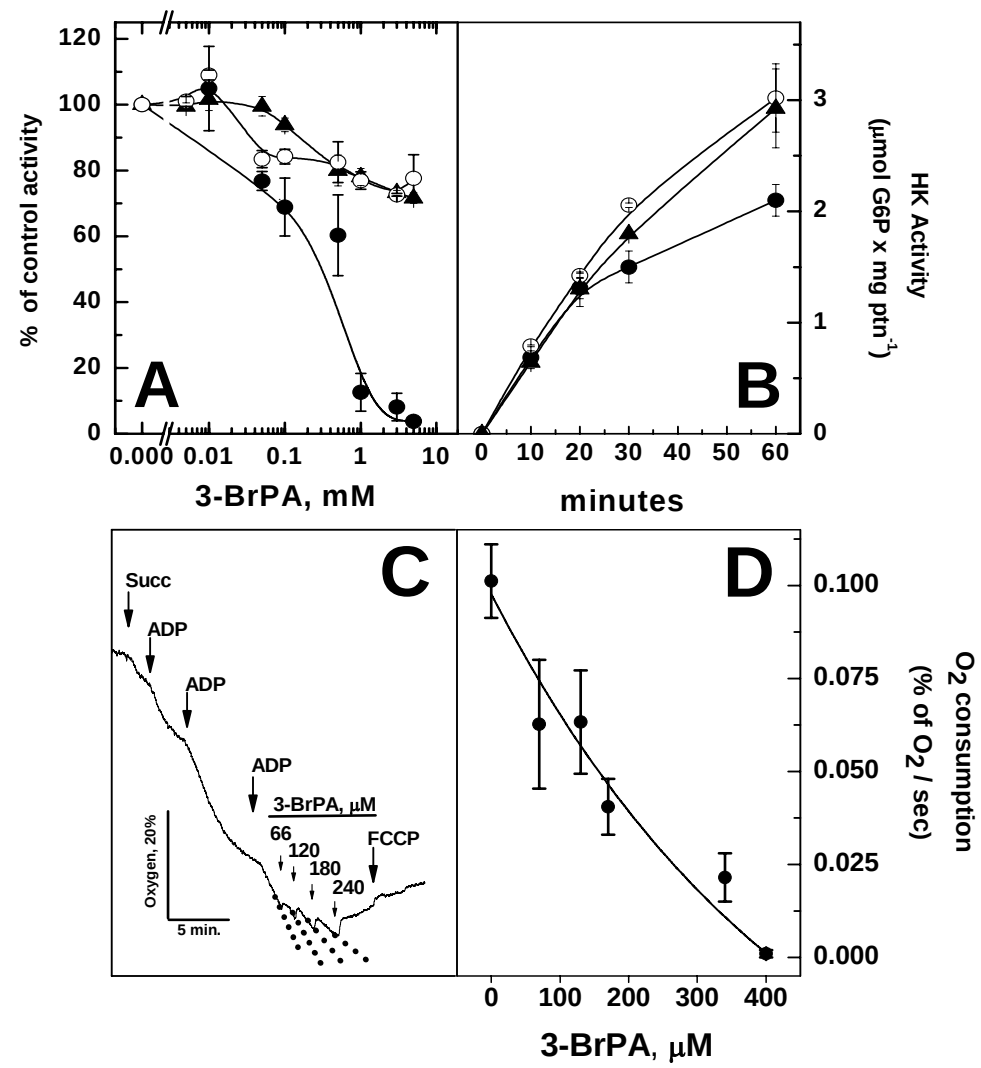


Figure 3

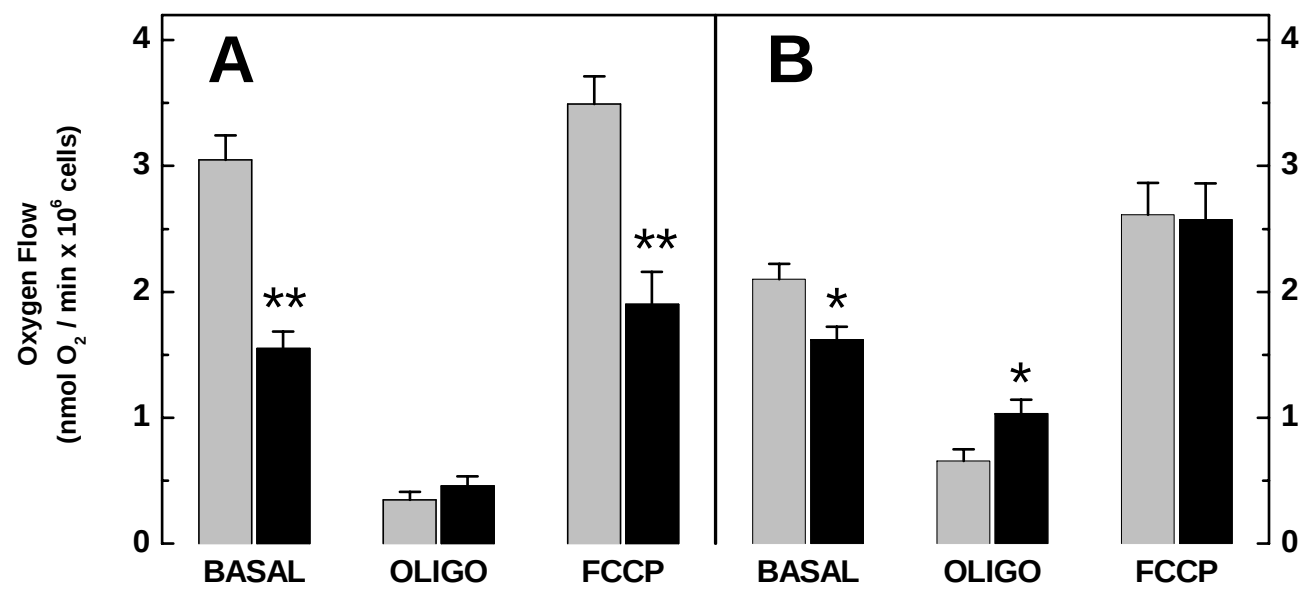


Figure 4

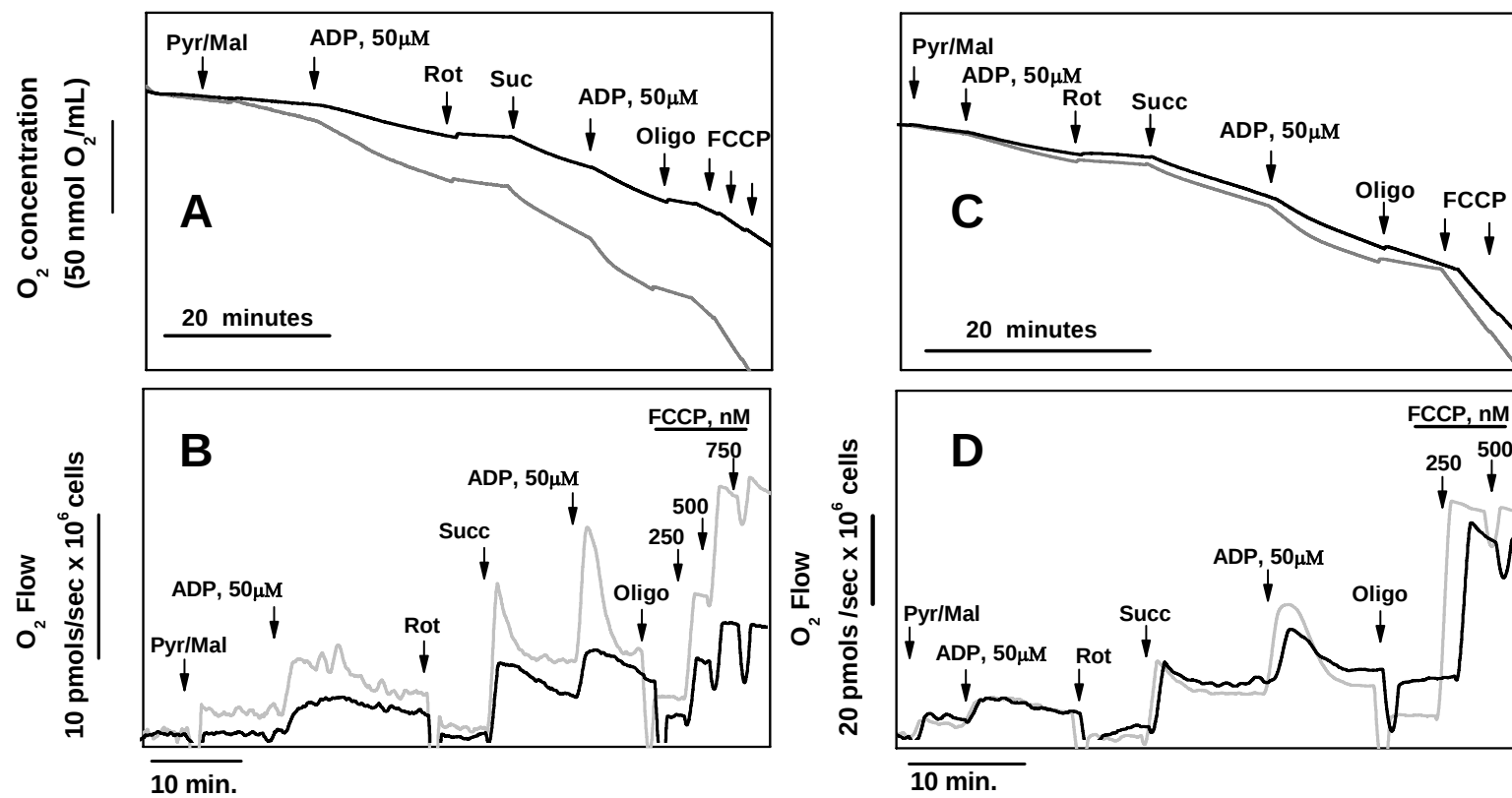


Figure 5

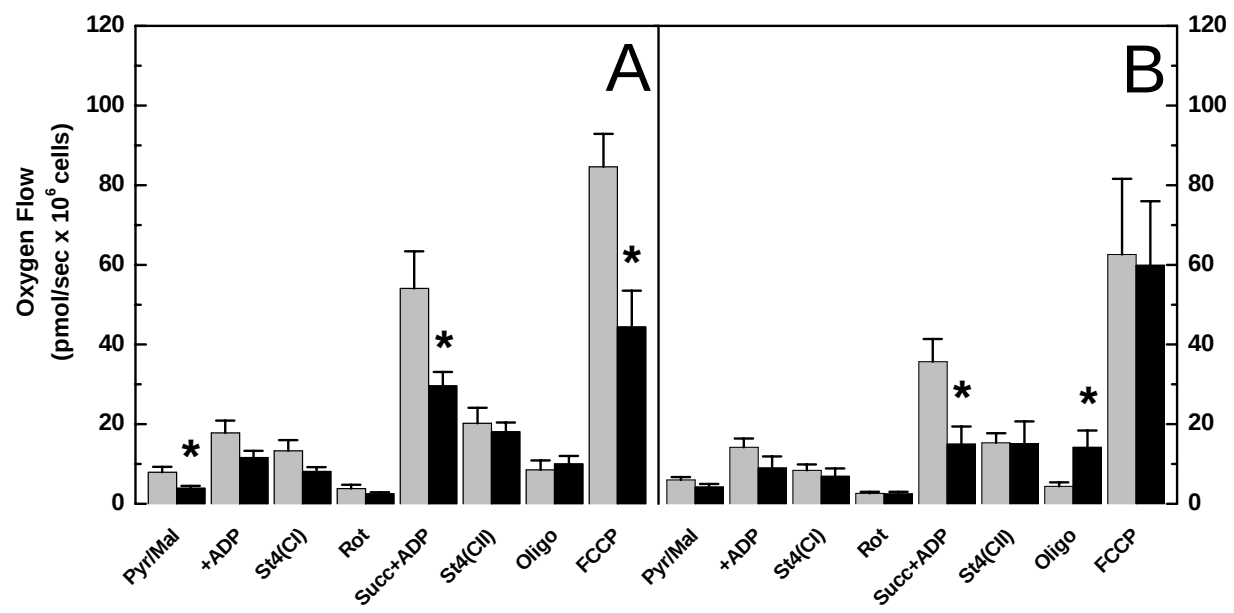


Figure 6

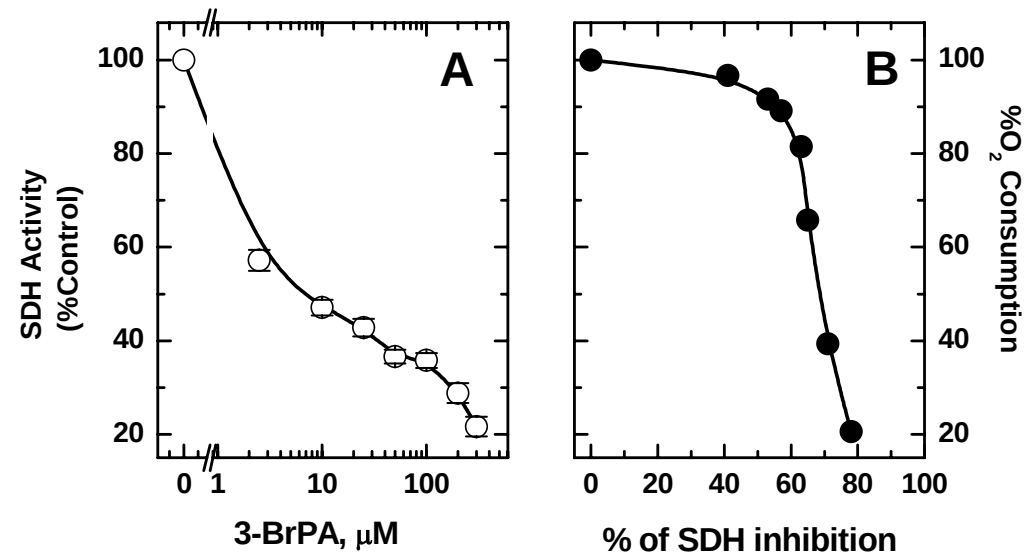


Figure 7

ANEXO 2

Mitochondrial and bioenergetic dysfunction in human hepatic cells infected with dengue 2 virus

Tatiana El-Bacha^{a,*}, Victor Midlej^b, Ana Paula Pereira da Silva^{a,c}, Leandro Silva da Costa^a,
Marlene Benchimol^b, Antonio Galina^c, Andrea T. Da Poian^a

^a Laboratório de Bioquímica de Vírus, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ-Brasil

^b Laboratório de Ultra-estrutura Celular, Universidade Santa Úrsula, RJ-Brasil

^c Laboratório de Bioenergética e Fisiologia Mitocondrial, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ-Brasil

Received 14 January 2007; received in revised form 26 August 2007; accepted 27 August 2007

Available online 15 September 2007

Abstract

Dengue virus infection affects millions of people all over the world. Although the clinical manifestations of dengue virus-induced diseases are known, the physiopathological mechanisms involved in deteriorating cellular function are not yet understood. In this study we evaluated for the first time the associations between dengue virus-induced cell death and mitochondrial function in HepG2, a human hepatoma cell line. Dengue virus infection promoted changes in mitochondrial bioenergetics, such as an increase in cellular respiration and a decrease in $\Delta\Psi_m$. These alterations culminated in a 20% decrease in ATP content and a 15% decrease in the energy charge of virus-infected cells. Additionally, virus-infected cells showed several ultrastructural alterations, including mitochondria swelling and other morphological changes typical of the apoptotic process. The alterations in mitochondrial physiology and energy homeostasis preceded cell death. These results indicate that HepG2 cells infected with dengue virus are under metabolic stress and that mitochondrial dysfunction and alterations in cellular ATP balance may be related to the pathogenesis of dengue virus infection.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Dengue virus infection; Mitochondrial dysfunction; Metabolism; Energy charge; Apoptosis; HepG2 cell

1. Introduction

Dengue virus (DV) infection affects 50–100 million people and it is considered the major human arbovirolosis [1–3]. Dengue Hemorrhagic Fever (DHF) and Dengue Shock Syndrome (DSS), the more severe manifestations of DV infection, hospitalize and kill several hundred thousand people annually and represent a serious public health, economic and social problem, especially in tropical areas of the globe [1,2,4]. Although the clinical manifestations of DHF/DSS have already been described, the pathophysiology of this disease is still not completely understood, and the molecular mechanisms involved in organ and cellular dysfunction are not yet clear [2–4].

Several lines of evidence support the idea that liver dysfunction is a characteristic of severe dengue infection. Analyses of liver autopsies from individuals with DHF revealed extensive areas of tissue damage, with foci of necrosis, steatosis and apoptosis, characterized by the presence of apoptotic bodies [5,6]. Viral antigens were detected near the lesioned areas, suggesting an association between virus replication and hepatic damage [6]. Additionally, it has been reported that cytokines production is implicated in liver dysfunction [2,7].

Tissue injury is responsible for many of the clinical manifestations observed in DHF/DSS [5,6], although metabolic disturbances may also be involved [8,9]. In accordance with these hypotheses, it has been shown that DV infection induces apoptosis in different cell types in culture [10]. Some studies have demonstrated the involvement of anti- and pro-apoptotic proteins of the Bcl-2 family [9–11] and the participation of reactive oxygen species [12], suggesting that altered permeability of mitochondrial membranes is involved in the process of cell death following DV infection.

* Corresponding author. Laboratório de Bioquímica de Vírus, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro Av. Bauhinia no. 400-CCS Bloco H 2º andar, sala 22. Ilha do Governador, 21941-590, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Fax: +55 21 22708647.

E-mail address: tatiana_elbacha@yahoo.com.br (T. El-Bacha).

For a series of viruses, including flaviviruses, the association between virus-induced cell death and the integrity of mitochondrial membranes has been extensively studied [13–16]. Viral proteins that interact with mitochondria are able to modulate the permeability of mitochondrial membranes and the liberation of components from the inter-membrane space to cytoplasm and regulate the process of apoptosis [13–15]. In the case of pro-apoptotic viruses, the hallmark of cell damage is an abrupt decrease in mitochondrial membrane electrochemical potential ($\Delta\Psi_m$) [16].

Although it is well known that altered permeability states can compromise mitochondrial physiology, ATP synthesis and consequently cell function, the study of mitochondrial bioenergetic dysfunction during virus infection has not been characterized in detail. In the case of DV, the possibility that mitochondrial bioenergetics and cellular energy state are associated with the deterioration of cell function during the course of infection has never been addressed.

In the present work it is demonstrated for the first time that DV infection of a human hepatoma cell line (HepG2) leads to alterations in the bioenergetic function of mitochondria, indicated by a decrease in $\Delta\Psi_m$, altered respiratory properties and mitochondrial morphology. These events compromise cellular energy homeostasis and may be related to the pathophysiology of DV infection.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture and virus propagation

HepG2 cells were acquired from American Type Cell Collection (USA). HepG2 is a differentiated human hepatocellular carcinoma cell line, which preserves many of the morphological and functional characteristics of hepatocytes [17–19], thus representing an interesting model for the study of liver bioenergetics during DV infection.

Cells were cultured on appropriate medium (Minimum Essential Medium with 5 mM glucose) supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen Corporation, USA), 100 U/mL penicillin, 100 g/mL streptomycin, 0.22% so-

dium bicarbonate and 0.2% HEPES, pH 7.4 in a CO₂ humid incubation chamber at 37 °C. For fluorescence analyses, cells were grown on glass coverslips on a 24 well plate. For all other assays, cells were grown on plastic Petri dishes. In each assay, cells were seeded at a density of 10⁵ cell per mL. After 2 days, cells were either mock-infected or infected with DV serotype 2 Asiatic strain 16681 (m.o.i. of 1 plaque forming units per cell). Assays were performed 48 h after infection, since peak of DV replication in HepG2 cells occurs during this period (data not shown). For preparations of virus stocks, DV serotype 2 Asiatic strain was propagated in C6/36 *A. albopictus* cells.

2.2. Oxygen consumption

Oxygen consumption was measured in an oximeter (Yellow Springs Instruments Co., USA or Hansatech, UK) using a Clark type electrode, in a 1.0 mL water jacket maintained under constant stirring, at 37 °C. Intact and permeabilized HepG2 cells were used for analyses of respiratory properties of mitochondria.

For measurements of oxygen consumption of intact cells, approximately 5 × 10⁶ cells were suspended in culture medium (MEM) without fetal bovine serum, as described elsewhere [20]. After recording basal respiration, 3 µg/mL oligomycin was added to record oligomycin-independent oxygen consumption. Oxygen consumption in the presence of oligomycin represents the sum of proton leak through the inner mitochondrial membrane plus any non-mitochondrial oxygen consumption. The block of respiration observed after the addition of antimycin A reveals that the non-mitochondrial oxygen consumption in HepG2 cells is negligible (Fig. 1a). Maximum respiration was achieved by adding FCCP 200 nM. Optimum FCCP concentration was determined after FCCP titration (40–500 nM, data not shown).

For respiratory complexes activities, respiratory control ratio (RCR) and ADP/O ratio calculations, permeabilized HepG2 cells were used. In this case, cells were suspended in respiration medium containing 0.25 M mannitol, 0.1% bovine serum albumin, 10 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 10 mM KH₂PO₄, pH 7.2, as described elsewhere [21]. Immediately after the addition of cells (approximately 5 × 10⁶ cells), digitonin (0.005%, w/v) was added, followed by respiratory modulators and substrates. Complex I maximum activity was determined after the addition of 5 mM pyruvate, 5 mM malate and 5 mM glutamate and 1 mM ADP. For RCR analyses, 1 µM rotenone and 12 mM succinate were added. After recording state 4 respiration, 0.1 mM ADP was added to induce state 3 respiration. Due to the presence of endogenous substrates on cell preparation, RCR, in each case, was calculated after the second addition of ADP. Following the first addition of ADP, endogenous adenylates are converted to ATP, an activator of succinate dehydrogenase [22,23] and respiratory control was clearly measured following the second addition of ADP. ADP/O ratios were calculated after each addition of ADP.

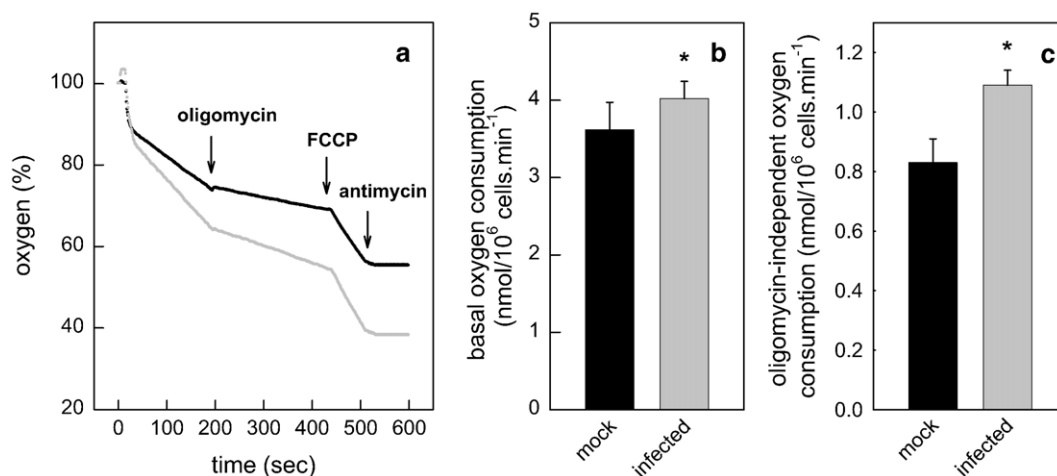


Fig. 1. Dengue virus infection increases oxygen consumption and alters respiratory properties of intact HepG2 cells. Cells were either mock-infected (black trace and bar) or DV-infected (gray trace and bar) and oxygen consumption was measured on culture medium without fetal bovine serum. (a) Typical record of oxygen consumption in intact cells. (b) Basal respiration. (c) Oligomycin-independent respiration. Values correspond to the average of 5 independent experiments. *Significantly different from mock-infected cells (Paired *t*-test; *P* < 0.05).

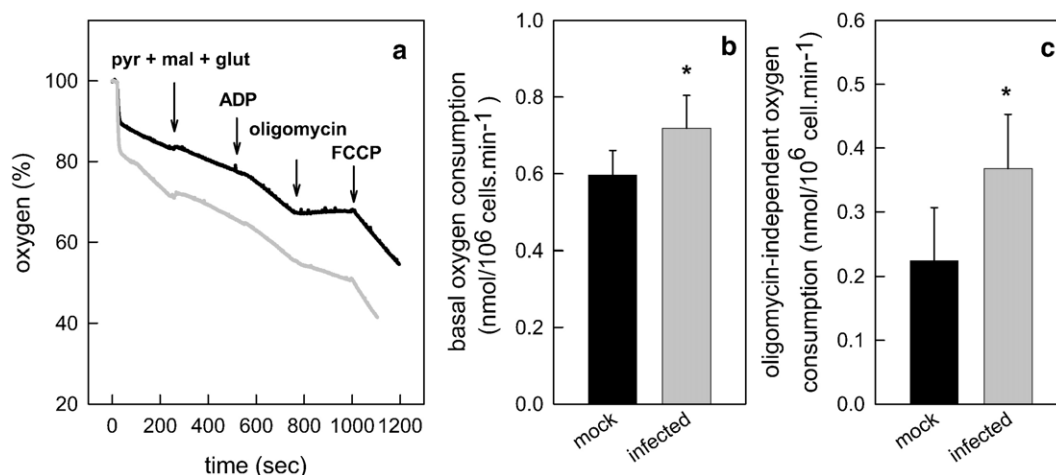


Fig. 2. Dengue virus infection increases oxygen consumption and alters respiratory properties of permeabilized HepG2 cells. Cells were either mock-infected (black trace and bar) or DV-infected (gray trace and bar) and oxygen consumption was measured on respiration medium. (a) Typical record of oxygen consumption in permeabilized cells following the addition of 5 mM pyruvate + 5 mM malate + 5 mM glutamate, 1 mM ADP, 1 μg/mL oligomycin and 200 nM FCCP. (b) Basal respiration. (c) Oligomycin-independent respiration. Values correspond to the average of 6 independent experiments. *Significantly different from mock-infected cells (Paired *t*-test; $P < 0.05$).

2.3. Mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$)

JC-1 dye (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide; Molecular Probes) was used to measure changes in $\Delta\Psi_m$ following DV infection. JC-1 has the property to selectively enter into mitochondria and according to the magnitude of $\Delta\Psi_m$, its oligomeric state changes reversibly and so does its fluorescence properties. The ratio red:green fluorescence intensity of JC-1 gives an index of the $\Delta\Psi_m$, where the higher the ratio, the higher the $\Delta\Psi_m$ [24]. Cells were incubated with 5 μg/mL JC-1 at 37 °C for 1 h. Microscopic analyses of fluorescent images were performed using an epifluorescence microscope (Olympus BX40, Tokyo, Japan) equipped with appropriate filters and using 40× oil-immersion objectives (Ex 485 nm; Em JC-1 Red 546, Em JC-1 Green 532 nm).

2.4. HPLC of cellular nucleotides

HepG2 nucleotides were analyzed by reverse-phase ion-pair high-performance liquid chromatography (HPLC) in a LC-10AS chromatograph with a high-pressure phase mixer and a UV-visible detector (SPD-10A; Shimadzu,

Japan) operated at 254 nm as described in [25]. Briefly, cells were disrupted with liquid N₂ and cellular proteins were precipitated with cold trichloroacetic acid (6%, w/v). Before injection, samples were neutralized with 2.5 M K₂CO₃. Samples and standards were eluted from the column (Hypersil ODS, Supelco Co.) with a linear solvent gradient between phase A (10 mM tetrabutylammonium, 10 mM KH₂PO₄, 0.25% methanol) and phase B (5.6 mM tetrabutylammonium, 50 mM KH₂PO₄, 30% methanol). Identities of AMP, ADP, and ATP peaks were confirmed by spiking of samples with nucleotides standards. Nucleotides were quantified by external calibration of peak areas of standards.

Energy charge (EC) was calculated according to the following equation, as described in reference [26]:

$$EC = [(ATP) + 0.5 \times (ADP)] / [(AMP) + (ADP) + (ATP)] \quad (1)$$

2.5. Transmission electron microscopy

HepG2 cells were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2. Cells were post-fixed on 1% OsO₄ in cacodylate buffer plus 5 mM CaCl₂ and 0.8% potassium ferricyanide, dehydrated in acetone series and

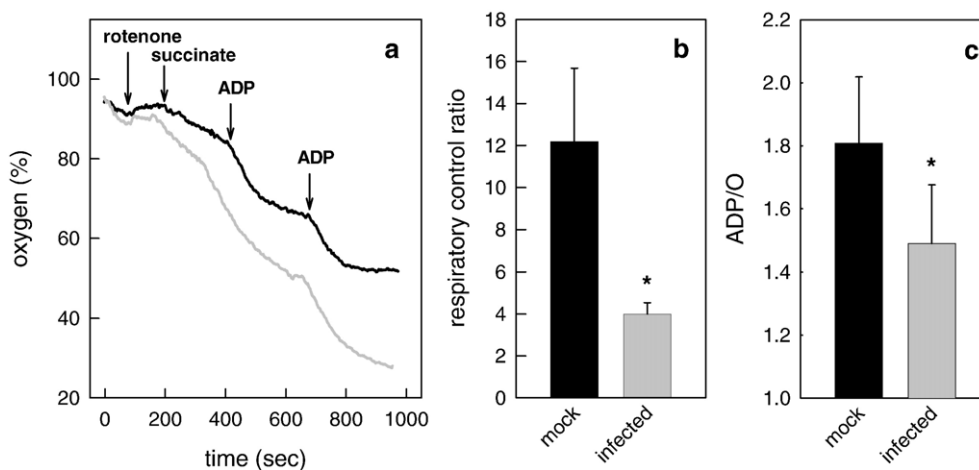


Fig. 3. Dengue virus infection increases oxygen consumption and decreases RCR and ADP/O ratio of permeabilized HepG2 cells. Cells were either mock-infected (black trace and bar) or DV-infected (gray trace and bar) and oxygen consumption was measured on respiration medium. (a) Typical record of oxygen consumption in permeabilized cells following the addition of 12 mM succinate and 0.1 mM ADP. (b) Respiratory control ratio (state 3/state 4 oxygen consumption rate). (c) ADP/O ratio. Values correspond to the average of 5 independent experiments. *Significantly different from mock-infected cells (*t*-test; $P < 0.05$).

infiltrated in Epon. Polymerization was carried out for 72 h. Thin sections were collected on copper grids, stained with uranyl acetate and lead citrate, and examined in a JEOL 1210 transmission electron microscope.

2.6. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Statgraphics version 4.0 (Statistical Graphics Corporation/Plus Ware). Results are presented as means ($\pm$ SE). Paired and unpaired Student's *t*-tests were used for comparison of mock-infected (control) and DV-infected cells. Two-tailed *P* values <0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. DV infection induces alterations in mitochondrial respiratory properties in HepG2 cells

The effects of DV infection on the respiratory properties of mitochondria were investigated in intact and permeabilized HepG2 cells. In order to study the effects of DV infection on cellular respiration under physiological conditions, intact HepG2 cells were used. Fig. 1a shows a typical record of oxygen consumption in intact HepG2 cells where it can be seen that both basal and oligomycin-independent respiration are increased in DV-infected cells. Basal respiration significantly increased from $3.62 \text{ nmol O}_2/10^6 \text{ cell} \times \text{min}^{-1}$ in mock-infected cells to $4.02 \text{ nmol O}_2/10^6 \text{ cell} \times \text{min}^{-1}$ in DV-infected cells (Fig. 1b; $P < 0.05$). Additionally, oligomycin-independent respiration increased from $0.83 \text{ nmol O}_2/10^6 \text{ cell} \times \text{min}^{-1}$ to $1.09 \text{ nmol O}_2/10^6 \text{ cell} \times \text{min}^{-1}$ in infected HepG2 cells (Fig. 1c; $P < 0.05$). FCCP addition to either mock-infected and infected cells stimulated maximum respiration in a similar way (Fig. 1a), suggesting that DV infection did not cause any alteration in the electron chain capacity of HepG2 cells.

Figs. 2a and 3a show typical records of oxygen consumption in mock-infected and DV-infected permeabilized cells using, respectively, NADH-linked or succinate as respiratory sub-

strates. In agreement with the results obtained from intact cell, both basal and oligomycin-independent respiration were also increased in permeabilized cells (Fig. 2a). Basal respiration increased from $0.60 \text{ nmol O}_2/10^6 \text{ cell} \times \text{min}^{-1}$ in mock-infected cells to $0.72 \text{ nmol O}_2/10^6 \text{ cell} \times \text{min}^{-1}$ in DV-infected cells (Fig. 2b; $P < 0.05$), representing a 20% increase. There was no difference between Complex I respiration from mock-infected and infected HepG2 cells where oxygen consumption was, respectively, 1.54 and $1.61 \text{ nmol O}_2/10^6 \text{ cell} \times \text{min}^{-1}$ (Fig. 2a). Uncoupled or oligomycin-independent respiration raised from $0.22 \text{ nmol O}_2/10^6 \text{ cell} \times \text{min}^{-1}$ to $0.37 \text{ nmol O}_2/10^6 \text{ cell} \times \text{min}^{-1}$ in infected HepG2 (Fig. 2c; $P < 0.05$), indicating that even in permeabilized HepG2 cells, DV infection induces changes in the respiratory properties of mitochondria by altering mitochondrial membrane permeability. In agreement with the results from intact cells, following FCCP addition maximum respiration did not differ between mock-infected and infected cells (Fig. 2a).

Since complex I-driven respiration was better accessed under maximum conditions (using 1 mM ADP), ADP/O ratio was determined feeding Complex II. Fig. 3a shows that after the addition of succinate, a substrate of Complex II, the rate of oxygen consumption, in both cases, rose significantly. It is well established that when cells are maintained in an appropriated medium containing reducing substrates that can donate hydrogen atoms (electrons and protons) to the respiratory electron chain, mitochondria start to respire at a slow rate due to the build up of a maximum proton gradient (state 2 or state 4 respiration) [27]. Once ADP and Pi are added, respiration is increasingly stimulated due to ADP conversion to ATP by F_0F_1 -ATP-synthase using the proton gradient established across the inner membrane by the electron transport chain (state 3 respiration) and $\Delta \Psi_m$ is partially reduced. When limiting amounts of ADP are added to mitochondria, state 3 respiration persists until all ADP is converted to ATP and, at this point, the proton gradient is increased again and oxygen consumption is reduced

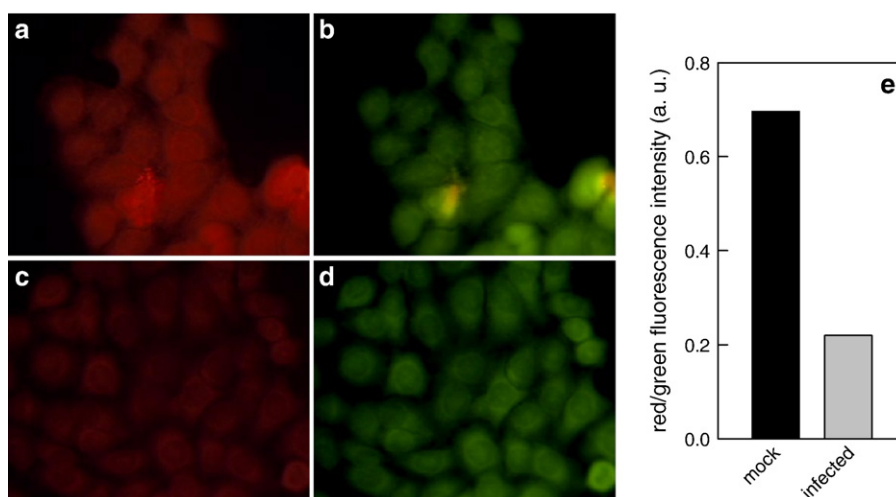


Fig. 4. Dengue virus infection promotes a decrease in mitochondrial membrane potential of HepG2 cells. Cells were incubated with $5 \mu\text{g/mL}$ of the JC-1 dye for 1 h at 37°C . JC-1 fluorescence in mock-infected (a, b) and in DV-infected cells (c, d) was captured using appropriate filters for red (a, c) and green (b, d) emission. (e) Red: green fluorescence intensity in mock-infected (black bar) and DV-infected cells (gray bar).

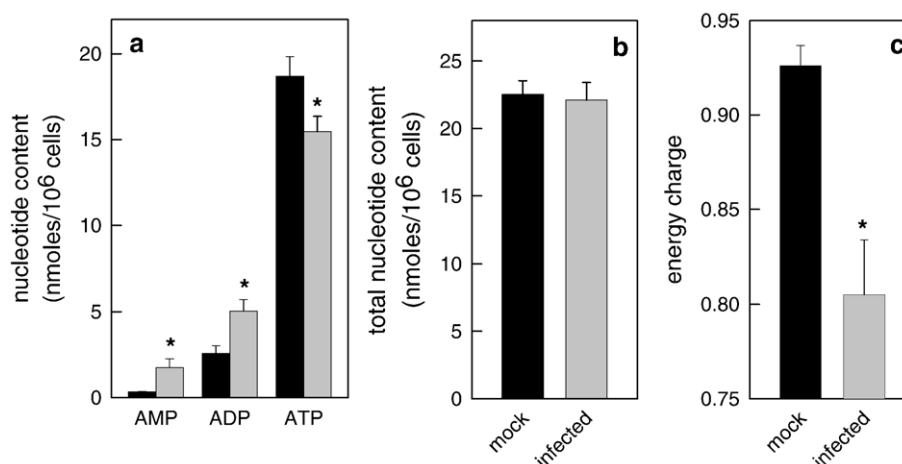


Fig. 5. Dengue virus infection affects nucleotide content and energy charge of HepG2 cells. AMP, ADP and ATP contents were measured by reverse-phase ion-pair HPLC in mock-infected (black) or DV-infected (gray) HepG2 cells. (a) AMP, ADP and ATP contents. (b) Nucleotide pool (AMP+ADP+ATP). (c) Energy charge (EC), calculated from the equation $EC = [(ATP) + 0.5 \times (ADP)] / [(AMP) + (ADP) + (ATP)]$. Values correspond to the average of 6 independent experiments. *Significantly different from mock-infected cells (t -test; $P < 0.05$).

[27]. Accordingly, Fig. 3a also shows that the rate of oxygen consumption in state 4 respiration was significantly higher in DV-infected cells. The calculated state 4 respiration rates were, respectively, 0.27 and 0.64 nmol O₂/10⁶ cell $\times$ min⁻¹ for mock-infected and DV-infected HepG2 cells ($P < 0.05$). The rates of state 3 respiration did not differ significantly between the two samples being 2.01 for mock-infected and 2.31 nmol O₂/10⁶ cell $\times$ min⁻¹ for DV-infected cells. These results are in agreement with the calculated rates of oxygen consumption using NADH-linked substrates (Fig. 2).

The RCR, which is indicative of the state of mitochondrial permeability, is shown in Fig. 3b. The average RCR was 12.20 in mock-infected cells and 3.98 in virus-infected cells, suggesting that, even in permeabilized HepG2 cells, mitochondria had lost some of their natural intactness after DV infection. Fig. 3c shows that the stoichiometry of the oxidative phosphorylation, ADP consumed per mol of oxygen atoms reduced to water (ADP/O ratio), was significantly decreased from 1.81 to 1.49 in DV-infected cells, indicating a decreased efficiency in ATP synthesis following infection.

The results with permeabilized HepG2 cells are in agreement with those obtained with intact cells. The increase in oligomycin-independent respiration (Figs. 1c and 2c) and in state 4 respiration (Fig. 3a) along with the decrease in ADP/O ratio (Fig. 3c) reinforce the idea that DV-infection affects mitochondrial membrane permeability and thus the efficiency of ATP synthesis in HepG2 cells.

3.2. DV infection induces a decrease in $\Delta\Psi_m$ in HepG2 cells

In order to better investigate the altered respiratory properties of HepG2 cells following DV infection, $\Delta\Psi_m$ was evaluated. Fig. 4 shows fluorescence analyses of cells loaded with JC-1 dye. The red:green fluorescence intensity was 3-fold lower in virus-infected cells, suggesting that DV infection promoted a decrease in $\Delta\Psi_m$ (Fig. 4e). In addition, both red and green

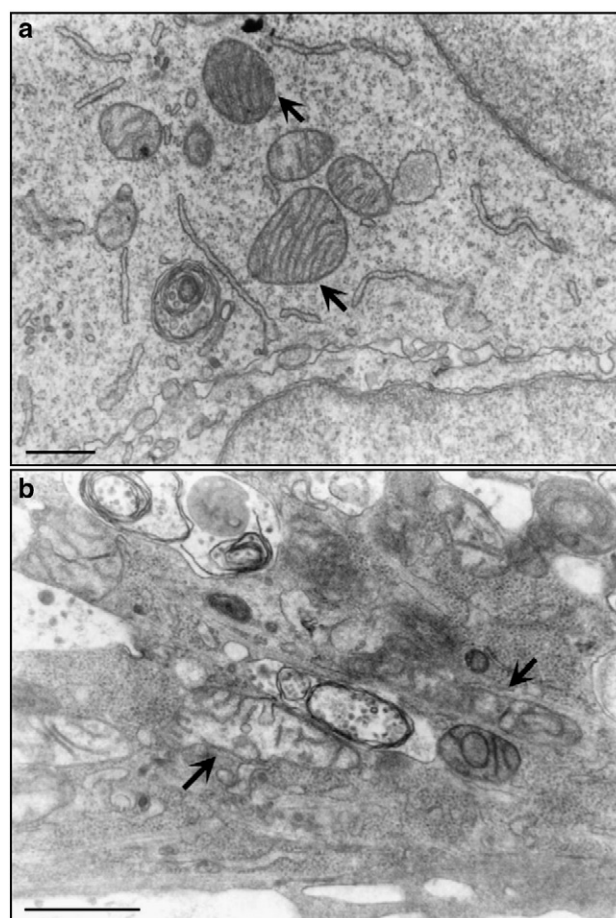


Fig. 6. Dengue virus infection promotes morphological alterations of mitochondria in HepG2 cells. (a) Transmission electron microscopy of a mock-infected cell showing mitochondria with characteristic electron-dense matrix (arrows); (b) transmission electron microscopy of a DV-infected cell presenting swollen mitochondria with loss of electron density in the matrix (arrows). Bar = 500 nm.

fluorescence intensities were decreased in virus-infected cells (Fig. 4c and d), indicating a decreased incorporation of JC-1 into mitochondria and possibly an altered permeability state of mitochondrial membranes.

3.3. DV infection affects ATP content and energy charge in HepG2 cells

Nucleotide content was analyzed to investigate whether the uncoupling of mitochondria and the decrease in $\Delta\Psi_m$ in DV-infected cells were interfering with ATP balance. The average amounts of AMP, ADP and ATP in mock-infected and virus-infected samples were, respectively, 0.3 and 1.7 nmol/ 10^6 cells; 2.6 and 5.0 nmol/ 10^6 cells; 18.7 and 15.5 nmol/ 10^6 cells (Fig. 5a). These differences corresponded to a 5-fold and a 2-fold increase in AMP and ADP levels, respectively, and a 20% decrease in ATP levels in virus-infected cells. All differences shown are significant ($P < 0.05$).

The cellular adenylate pool composed of ATP, ADP and AMP includes the majority of the available chemical energy in cellular metabolism [26]. From the results shown in Fig. 4a, the total nucleotide pool was 22.5 nmol nucleotide/ 10^6 cells for mock-infected cells and 22.1 nmol nucleotide/ 10^6 cells for virus-infected cells (Fig. 5b). These results show that infection did not alter the total amount of nucleotides, but instead their distribution. This altered distribution resulted in a decrease in

the energy charge (EC), which reflects the cellular state of free energy availability. An EC value of 1 indicates that all the available energy is present as ATP and an EC value of zero means that only AMP is present [26]. The calculated EC values were 0.93 and 0.81, respectively, for mock-infected and virus-infected cells (Fig. 5c), indicating that infection promoted a significant decrease ($P < 0.005$) in this index.

3.4. DV infection induces ultrastructural alterations in HepG2 cells

Transmission electron microscopy analyses were performed to associate the alterations in mitochondrial bioenergetics with possible morphological changes. As shown in Fig. 6, mock-infected cells exhibit mitochondria with characteristic electron-dense matrix (Fig. 6a; arrows), contrasting to swollen mitochondria with a loss of electron density in the matrix of DV-infected cells (Fig. 6b; arrows). In a total of 164 mitochondria counted in mock-infected cells, 95% presented normal ultrastructure. In DV-infected cells, 144 mitochondria were counted and 75% showed some degree of morphological alterations. In addition to the morphological changes in mitochondria, other ultrastructural alterations following DV infection can be pointed out in Fig. 7, including the formation of membrane blebs (Fig. 7c and d; arrow heads) and the localization of mitochondria around the nucleus (Fig. 7c; arrows). Mock-infected cell, on

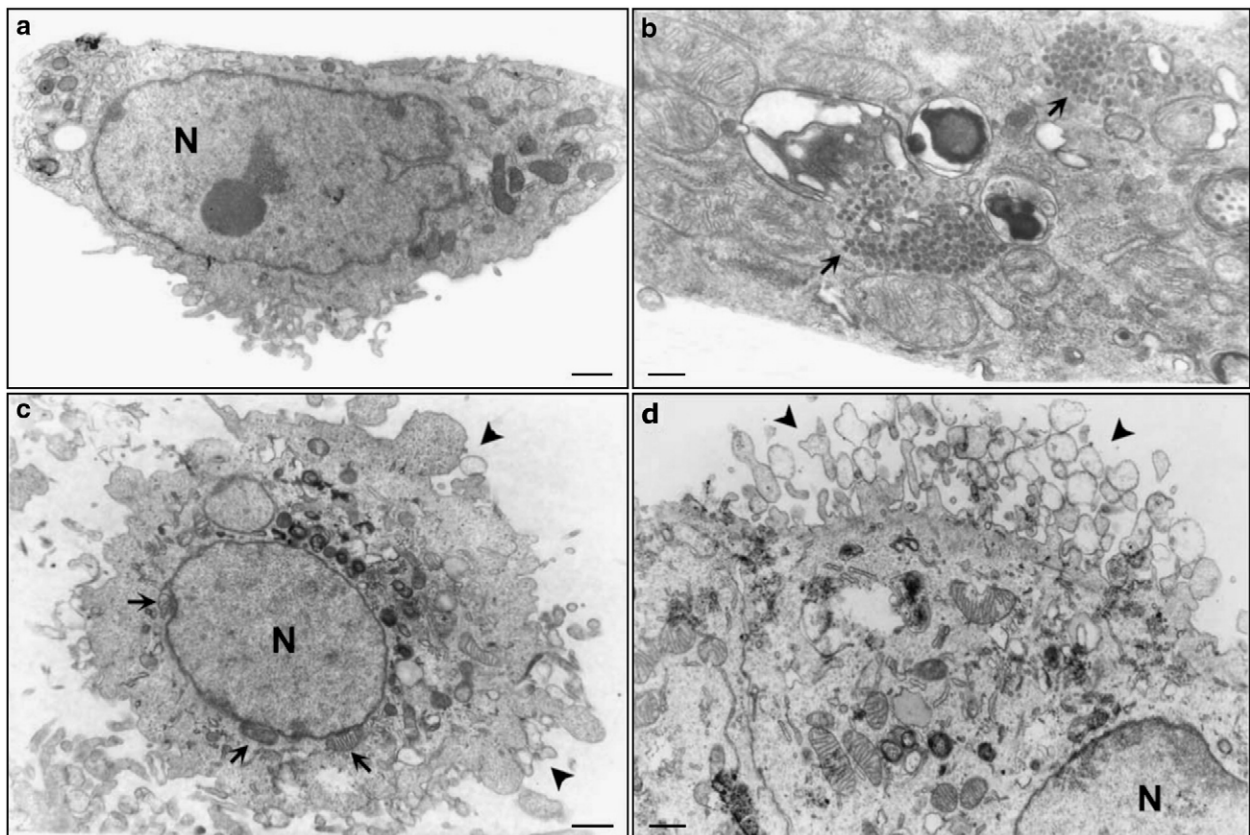


Fig. 7. Dengue virus infection induces ultrastructural alterations in HepG2 cells. (a) Mock-infected cell, presenting an intact cellular membrane; (b) electron dense particles of DV-infected cell (arrows); (c, d) DV-infected cell showing membrane blebs (arrow-heads) and mitochondria around the nucleus (arrows), N: nucleus. Bar= 500 nm.

the other hand, exhibit an intact cellular membrane (Fig. 7a). Electron dense particles seen in Fig. 7b are compatible with DV particles [30].

4. Discussion

Virus infections elicit a number of cellular responses in the host that may create a hostile environment to the virus and therefore to control replication and minimize the deleterious effects of infection. Viruses, on the other hand, have developed strategies to curtail the cellular responses and ensure the success of infection. Among different hosts and viruses many of these responses involve alterations in energy metabolism, in particular an increased utilization of glucose molecules, alterations in the production of ATP and the modulation of mitochondrial functions [13,31–33]. This last response is evident concerning the process of apoptosis, which most frequently includes alterations in mitochondrial integrity [13,14,32]. The present work shows that cells infected with DV present mitochondrial dysfunction characterized by functional and ultrastructural alterations.

The respiratory properties of HepG2 cells were clearly altered by DV infection, which promoted an increase in cellular oxygen consumption along with a decrease in RCR and ADP/O (Figs. 1a, b, 2a, b and 3). A decrease in the RCR suggests that significant morphologic alterations of mitochondria may be undertaken in HepG2 cells after DV infection, which can be confirmed from the TEM analyses (Fig. 6). In addition, the decrease in ADP/O ratio (Fig. 3c) and the increase in both oligomycin-independent respiration (Figs. 1c and 2c) and state 4 respiration (Fig. 3a) indicate that DV infection causes an uncoupling of the electron transfer chain from the phosphorylation of ADP, which results in a decreased efficiency for synthesis of ATP [34]. Both the decrease in RCR and in the ADP/O in virus-infected cells are due to the marked increase in the rate of state 4 respiration, since state 3 respiration was not significantly changed neither in Complex I nor Complex II-linked substrates (Figs. 2a and 3a). Additionally, the increase in oligomycin-independent respiration also indicates an increase in proton leak, a feature of uncoupled oxidative phosphorylation in DV-infected cells (Figs. 1a, c and 2a and c).

Mitochondrial uncoupling reflects a flux of protons from the inter-membrane space to the mitochondrial matrix through channels other than the F_0F_1 ATP synthase and, therefore, not coupled to ATP synthesis. When mitochondrial uncoupling is physiological, there is an increase in electron transport and in oxygen consumption due to a small decrease in the $\Delta\psi_m$ in order to maintain the electrochemical proton gradient and the synthesis of cellular ATP [34]. However, when mitochondrial uncoupling is important, one may expect a substantial decrease in $\Delta\psi_m$, as observed in Fig. 4, with several consequences for cellular energy homeostasis, as occurred with HepG2 cells infected with DV. The decrease in $\Delta\psi_m$ in intact cells infected with DV may be explained, in part, by an increase in proton leak, in accordance with the increase in oligomycin-independent respiration (Fig. 1c).

The effects of DV infection on the respiratory properties and mitochondrial membrane depolarization, which decreased the

efficiency of ATP synthesis, also promoted a significant decrease in the steady-state ATP concentration of HepG2 cells (Fig. 5a). This decrease in the content of cellular ATP may indicate that energy demand is increased due to the synthesis of viral proteins. By this way, it can be speculated that DV infection also affects cellular regulatory mechanisms that compensate for mitochondrial inefficiency, such as an increased production of glycolytic ATP, as observed in various situations, like alphavirus infection [33].

As shown in Fig. 5a, although the total nucleotide pool was not altered (Fig. 5b), infection induced a significant change in the relative amounts of ATP, ADP and AMP. This led to a decrease in EC in virus-infected cells (Fig. 5c). EC in hepatocytes is usually around 0.9 [35], a value similar to that observed for mock-infected cells in the present work. In liver cells, when ATP synthesis is impaired, the EC may reach extremely low levels such as 0.7 [36]. Thus, the EC of 0.8 observed in virus-infected cells indicates a metabolic stress. It has been shown that myocarditis induced by CocksackieB3 virus promoted a decrease in cellular EC, and it was suggested that this alteration in energy balance is involved in the pathogenesis of the Cocksackie virus infection [37]. Although the role of energy homeostasis in DV infection has never been addressed, it can be suggested that the deregulation of processes involved in ATP balance may be associated with the pathogenesis of DV infection.

The altered bioenergetic status caused by DV infection may be regarded as an initial sign of a more serious condition. Although cell viability was not altered in DV-infected cells in all m.o.i. used (data not shown), the small but significant decrease in cellular ATP and EC might be signalling an apoptotic stimulus, since it has been demonstrated that a transient decrease in the content of cellular ATP preceded the initiation of the apoptotic cascade in another cell type [38]. In agreement with these observations are the ultrastructural alterations in mitochondria in DV-infected cells (Fig. 6b), showing a loss of electron density in the matrix and mitochondrial swelling. This feature is characteristic of the permeability transition state, and, therefore, may indicate an increase in outer mitochondrial membrane permeability [16,39]. This association between mitochondrial structure and metabolic function has already been studied [40], however not in cells infected with DV. Although nuclear alterations typical of the apoptotic process have already been described in HepG2 cells infected with DV [8,41], this is the first report of mitochondrial morphologic alterations. Additionally, other apoptotic features can be observed in DV-infected cells, such as the localization of mitochondria around the nucleus and membrane blebs (Fig. 7c and d), as previously shown for other cell types infected with DV [8,10,42]. Accordingly, Hoechst fluorescence indicated an increase in the percentage of apoptotic cells from 5–10% in mock-infected cells to 15–20% in DV infected cells (data not shown).

The mechanisms through which DV infection most contribute to the observed functional and morphological alterations remain open. Cellular proteins that interact directly with mitochondria, such as pro- or anti-apoptotic Bcl-2 family proteins, might be involved [8,10,13,43]. Additionally, reactive oxygen and nitrogen species may contribute to mitochondrial dysfunction, since DV

infection increases oxidative stress both *in vivo* and *in vitro* [12,44,45].

Specific viral proteins, which interact with mitochondria, have the potential to affect mitochondrial membrane permeability and thus the process of apoptosis, as shown for other viruses [13–15]. Our observations that ADP/O ratio is decreased and oligomycin-independent respiration is increased after infection favor the hypothesis that viral proteins or viral sub-products could be interacting with mitochondrial membranes of HepG2 cells, altering their permeability, increasing proton leak and thus causing the described alterations in mitochondrial physiology. Indeed, further studies are needed to clarify the causal link between mitochondrial physiology and the apoptotic events in DV infection. It is important to mention that the fact that either basal and oligomycin-independent respiration are stimulated by DV infection rules out, at least at this stage of DV infection, an important impairment of respiratory electron chain complexes activities, as reported in some mitochondrial dysfunction as observed in sepsis in both human [28] and animal [29] studies.

In the present work we described for the first time functional and structural alterations in mitochondria, related to bioenergetics and energy homeostasis of cultured human hepatic cells infected with DV. These results contribute to the understanding of the events occurring in host cells during the course of DV infection and possibly to the processes leading to cell death. It seems that derangements in energy metabolism are associated with apoptosis, and that this mechanism of cell death is intimately associated with the pathogenesis of DHF/DSS [10]. Our results indicate that derangements in energy metabolism are signs of DV infection, which seem to precede cell death, since cell viability, in the time course observed, was not altered. In conclusion, the identification of early signs of metabolic deterioration could be a valuable tool to develop strategies to minimize cell damage and ultimately interfere with the replication cycle of DV.

Acknowledgments

We thank Dr. Alexandre Torres, Dr. Maria Augusta Arruda and Dr. Martha Sorenson for the valuable discussions to this manuscript. We also would like to thank the referees for the valuable contribution to this work. This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

References

- [1] D.J. Gubler, The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems, *Arch. Med. Res.* 33 (2002) 330–342.
- [2] D.J. Gubler, Dengue and dengue hemorrhagic fever, *Clin. Microbiol. Rev.* 11 (1998) 480–496.
- [3] J.S. Mackenzie, D.J. Gubler, L.R. Petersen, Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses, *Nat. Med.* 10 (2004) S98–S109.
- [4] M.G. Gúzman, G. Kouri, Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges, *J. Clin. Virol.* 27 (2003) 1–13.
- [5] A. Couvelard, P. Marianneau, C. Bedel, M.T. Drouet, F. Vachon, D. Henin, V. Deubel, Report of a fatal case of dengue infection with hepatitis: demonstration of dengue antigens in hepatocytes and liver apoptosis, *Human Pathol.* 30 (1999) 1106–1110.
- [6] M.R. Huerre, N.T. Lan, P. Marianneau, N.B. Hue, H. Khun, N.T. Hung, N.T. Khen, M.T. Drouet, V.T. Huong, D.Q. Ha, Y. Buisson, V. Deubel, Liver histopathology and biological correlates in five cases of fatal dengue fever in Vietnamese children, *Virchows Arch.* 438 (2001) 107–115.
- [7] U.C. Chaturvedi, R. Agarwal, E.A. Elbishbishi, A.S. Mustafa, Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 28 (2000) 183–188.
- [8] P. Marianneau, M. Flamand, V. Deubel, P. Després, Apoptotic cell death in response to dengue virus infection: the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever revisited, *Clin. Diagn. Virol.* 10 (1998) 113–119.
- [9] A. Catteau, G. Roue, V.J. Yuste, S.A. Susin, P. Despres, Expression of dengue ApoptoM sequence results in disruption of mitochondrial potential and caspase activation, *Biochimie* 85 (2003) 789–793.
- [10] M.P. Courageot, A. Catteau, P. Després, Mechanisms of dengue virus-induced cell death, *Adv. Virus Res.* 60 (2003) 157–186.
- [11] A. Catteau, O. Kalinina, M.C. Wagner, V. Deubel, M.P. Courageot, P. Després, Dengue virus M protein contains a proapoptotic sequence referred to as ApoptoM, *J. Gen. Virol.* 84 (2003) 2781–2793.
- [12] Y.L. Lin, C.C. Liu, J.I. Chuang, H.Y. Lei, T.M. Yeh, Y.S. Lin, Y.H. Huang, H.S. Liu, Involvement of oxidative stress, NF-IL-6, and RANTES expression in dengue-2-virus-infected human liver cells, *Virology* 276 (2000) 114–126.
- [13] H. Everett, G. McFadden, Viruses and apoptosis: meddling with mitochondria, *Virology* 288 (2001) 1–7.
- [14] F. Verrier, B. Mignotte, G. Jan, C. Brenner, Study of PTPC composition during apoptosis for identification of viral protein target, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1010 (2003) 126–142.
- [15] C. Piccoli, R. Scrima, A. D'Aprile, M. Ripoli, L. Lecce, D. Boffoli, N. Capitanio, Mitochondrial dysfunction in hepatitis C virus infection, *Biochim. Biophys. Acta* 1757 (2006) 1429–1437.
- [16] G. Kroemer, J.C. Reed, Mitochondrial control of cell death, *Nat. Med.* 6 (2000) 513–519.
- [17] Q. Chen, Y. Xia, Z. Qiu, Effect of eadysterone on glucose metabolism *in vitro*, *Life Sci.* 78 (2006) 1108–1113.
- [18] B.B. Knowles, C.C. Home, D.P. Aden, Human hepatocellular carcinoma cell line secrete major proteins and hepatitis B surface antigens, *Science* 209 (1980) 497–499.
- [19] A. Kosaki, N.J.G. Webster, Effect of dexamethasone on the alternative splicing of the insulin receptor mRNA and insulin action in HepG2 hepatoma cells, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 21990–21996.
- [20] E. Hutter, K. Renner, G. Pfister, P. Stockl, P. Jansen-Durr, E. Gnaiger, Senescence-associated changes in respiration and oxidative phosphorylation in primary human fibroblasts, *Biochem. J.* 380 (2004) 919–928.
- [21] K. Sakurai, A.I. Cederbaum, Oxidative stress and cytotoxicity induced by ferric-nitrosyltriacetate in HepG2 cells that express cytochrome P450 2E1, *Mol. Pharmacol.* 54 (1998) 1024–1035.
- [22] M. Gutman, E.B. Kearney, T.P. Singer, Control of succinate dehydrogenase in mitochondria, *Biochemistry* 10 (1971) 4763–4770.
- [23] C. Bhuvaneswaran, C.H. Ho, C.L. Wadkins, Inactivation of coupled respiration of mitochondria by inorganic arsenate and partial restoration by ATP, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 49 (1972) 690–697.
- [24] M. Reers, T.W. Smith, L.B. Chen, J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential, *Biochemistry* 30 (1991) 4480–4486.
- [25] D. Huang, Y. Zhang, X. Chen, Analysis of intracellular nucleoside triphosphate levels in normal and tumor cell lines by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B* 784 (2003) 101–109.
- [26] D.E. Atkinson, Cellular energy metabolism and its regulation, Academic Press, New York, 1977.
- [27] B. Chance, G.R. William, The respiratory chain and oxidative phosphorylation, *Adv. Enzymol. Relat. Subj. Biochem.* 17 (1956) 65–134.
- [28] A.D. Svistunenko, N. Davies, D. Brealey, M. Singer, C.E. Cooper, Mitochondrial dysfunction in patients with severe sepsis: an EPR interrogation of individual respiratory chain components, *Biochim. Biophys. Acta* 1757 (2006) 262–272.

- [29] D. Brealey, S. Karyampudi, T.S. Jacques, M. Novelli, R. Stidwill, V. Taylor, R.T. Smolenski, M. Singer, Mitochondrial dysfunction in a long-term rodent model of sepsis and organ failure, *Am. J. Physiol., Regul. Integr. Comp. Physiol.* 286 (2004) R491–R497.
- [30] O. Barth, Replication of dengue viruses in mosquito cell cultures—a model from ultrastructural observations, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 87 (1992) 565–574.
- [31] L.M. Romero, K.M. Raley-Susman, D.M. Redish, S.M. Brooke, H.C. Homer, R.M. Sapolsky, Possible mechanism by which stress accelerates growth of virally derived tumors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89 (1992) 11084–11087.
- [32] H. Everett, G. McFadden, Apoptosis: an innate immune response to virus infection, *Trends Microbiol.* 160 (1999) 160–165.
- [33] T. El-Bacha, M.M. Menezes, M.C. Azevedo e Silva, M. Sola-Penna, A.T. Da Poian, Mayaro virus infection alters glucose metabolism in cultured cells through activation of the enzyme 6-phosphofructo 1-kinase, *Mol. Cell. Biochem.* 266 (2004) 191–198.
- [34] G.C. Brown, P.L. Lakin-Thomas, M.D. Brand, Control of respiration and oxidative phosphorylation in isolated rat liver cells, *Eur. J. Biochem.* 192 (1990) 355–362.
- [35] D.E. Atkinson, G.M. Walton, Adenosine triphosphate conservation in metabolic regulation, *J. Biol. Chem.* 242 (1967) 3239–3241.
- [36] K.O. Raivio, M.P. Kekomaki, P.H. Maenpaa, Depletion of liver adenine nucleotides induced by D-fructose, dose-dependence and specificity of the fructose effect, *Biochem. Pharmacol.* 18 (1969) 2615–2624.
- [37] A. Waldenstrom, J. Fohlman, N.G. Ilback, G. Ronquist, R. Hallgren, B. Gerdin, Coxsackie B3 myocarditis induces a decrease in energy charge and accumulation of hyaluronan in the mouse heart, *Eur. J. Clin. Investig.* 23 (1993) 277–282.
- [38] D.S. Izyumov, A.V. Avetisyan, O. Yu Pletjushkina, D.V. Sakharov, K.W. Wirtz, B.V. Chernyak, V.P. Skulachev, “Wages of Fear”: transient threefold decrease in intracellular ATP level imposes apoptosis, *Biochim. Biophys. Acta* 1658 (2004) 141–147.
- [39] M. Crompton, The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death, *Biochem. J.* 341 (1999) 233–249.
- [40] E. Gottlieb, S.M. Armour, C.B. Thompson, Mitochondrial respiratory control is lost during growth factor deprivation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 12801–12806.
- [41] P. Marianneau, A.M. Steffan, C. Royer, M.T. Drouet, A. Kirn, V. Deubel, Differing infection patterns of dengue and yellow fever viruses in a human hepatoma cell line, *J. Infect. Dis.* 178 (1998) 1270–1278.
- [42] J.A. Mosquera, J.P. Hernandez, N. Valero, L.M. Espina, G.J. Anez, Ultrastructural studies on dengue virus type 2 infection of cultured human monocytes, *J. Virol.* 2 (2005) 26.
- [43] C.J. Lee, C.L. Liao, Y.L. Lin, Flavivirus activates phosphatidylinositol 3-kinase signaling to block caspase-dependent apoptotic cell death at the early stage of virus infection, *J. Virol.* 79 (2005) 8388–8399.
- [44] N. Valero, L.M. Espina, G. Anez, E. Torres, J.A. Mosquera, Short report: increased level of serum nitric oxide in patients with dengue, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66 (2002) 762–764.
- [45] L. Gil, G. Martinez, R. Tapanes, O. Castro, D. Gonzalez, L. Bernardo, S. Vazquez, G. Kouri, M.G. Gúzman, Oxidative stress in adult dengue patients, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 71 (2004) 652–657.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)