2012

Resistência Multifármacos em Carcinoma Hepatocelular

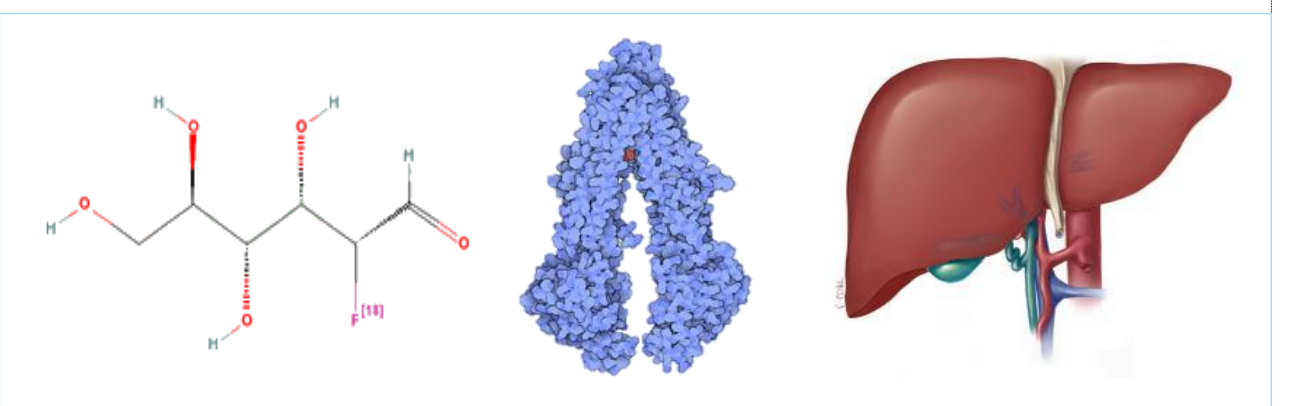
Mónica Mendes

Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Resistência Multifármacos em Carcinoma Hepatocelular

- Correlação com a captação de ^{18}F-FDG -



Mónica Filipa dos Santos Mendes

2012

Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Resistência Multifármacos em Carcinoma Hepatocelular

- Correlação com a captação de ^{18}F-FDG -

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Maria Filomena Rabaça Roque Botelho (Universidade de Coimbra).

Mónica Filipa dos Santos Mendes

2012

"A parte que ignoramos é maior que tudo quanto sabemos"

Platão

Agradecimentos

Embora, pela sua finalidade académica, uma dissertação seja um trabalho individual, muitos foram os que contribuíram para que mais uma etapa da minha vida se concretizasse. Por essa razão desejo expressar os meus sinceros agradecimentos:

À Professora Doutora Maria Filomena Botelho, directora do Serviço de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, pela orientação deste projecto, pelo apoio, disponibilidade, pelas críticas e conselhos na revisão do manuscrito e, em especial, pela partilha de conhecimento, experiência científica e pelos ensinamentos.

À Mestre Ana Margarida Abrantes, que me acolheu e integrou no grupo, que sempre se mostrou interessada e preocupada com o meu trabalho e, sempre esteve disponível para esclarecer todas as minhas dúvidas e problemas.

À Mestre Ana Filipa Brito por ter supervisionado o meu trabalho com mais proximidade do que ninguém. Por estar sempre pronta a ajudar e a esclarecer as minhas dúvidas, por me ter ensinado grande parte do trabalho laboratorial necessário ao desenvolvimento deste projecto, pela paciência e pela confiança que depositou em mim.

Ao Mestre João Casalta, pelas horas de trabalho despendidas na análise estatística dos resultados do meu projecto, sem isso, tudo seria mais difícil. Por estar sempre disponível para partilhar os seus conhecimentos, críticas e sugestões, pela sua simpatia e apoio.

Às Mestres Mafalda Laranjo, Salomé Pires, Catarina Mamede e Rita Gomes e ao Mestre Fernando Mendes que me receberam da melhor maneira e sempre se dispuseram a ajudar no que fosse preciso. Por me apoiarem, incentivarem e terem sempre uma palavra importante no crescimento do meu conhecimento e trabalho.

Ao Fábio Veríssimo, com quem tive a oportunidade e o prazer de trabalhar com alguma proximidade. Pela sua simpatia, boa-disposição, amizade e cooperação que tornaram todos estes dias mais alegres.

À Mestre Cristina Gonçalves e à Professora Doutora Ana Bela Sarmento Ribeiro pelo auxílio prestado na realização e interpretação dos estudos de citometria de fluxo.

À Cláudia Caridade pela simpatia e disponibilidade diária.

Aos meus colegas e amigos Marta Braga, Rita Silva, Miguel Rocha, Pedro Santos e Marcos Gomes que, tal como eu, estão a desenvolver projectos no serviço, e que tornaram os dias mais agradáveis, repletos de boa-disposição e camaradagem.

Às minhas amigas Daniela Sarmento dos Santos, Liliana Pedrosa e Vanessa Silva, que também realizaram os seus projectos no serviço, pela presença constante, por terem sempre uma palavra amiga, um conselho, um abraço, por estarem comigo incondicionalmente. Sem vocês todos estes meses não teriam sido, sem dúvida, os mesmos. Muito obrigada por tudo!

Às minhas amigas Raquel Trindade, Cláudia Gonçalves, Carla Guerra e Cíntia Horta, pela amizade incondicional, por todos os momentos de boa-disposição que tornaram todos estes dias mais felizes e por serem as melhores amigas que alguém pode ter. Obrigada!

Aos meus amigos de sempre, Susana, Ana Rita, Carina, Bruno, André, Beto, Helder, Paulinho, Jorge, Andrea, Fábio, Rita, Sara, Lisandra e Sandrine, que, apesar de muitas vezes distantes e cheios de trabalho, nunca deixaram de estar disponíveis para um cafezito ao fim-de-semana. Obrigada pelo apoio e amizade incondicional, pela força e por acreditarem sempre em mim.

Ao Ricardo, por caminhar sempre a meu lado independentemente de tudo, por todos os momentos em que me fez rir quando estava triste, por acreditar que consigo concretizar sempre os objectivos a que me proponho. Pela paciência, incentivo, carinho e amizade. Sem ti não era a mesma coisa. Obrigada!

A todos os que de algum modo contribuíram para a presente dissertação e que não foram especificamente designados mas, que nem por isso foram esquecidos.

Finalmente quero agradecer à minha Família pelo amor, pela dedicação, pela confiança que depositam nas minhas capacidades e pelo apoio incondicional. Aos meus pais por serem os melhores Pais do Mundo. Aos meus irmãos, Lili e Miguel, por aguentarem o meu humor quando chegava a casa depois de um dia cansativo, e a minha avó. Sem vocês não teria conseguido realizar este projecto.

Por último, agradeço a Deus por me ter dado a vida que tenho hoje e por ter colocado estas pessoas no meu caminho, sou sem dúvida uma privilegiada.

A todos o meu "MUITO OBRIGADO!"

Resumo

O carcinoma hepatocelular (CHC) é o tumor primário de fígado mais comum e o terceiro tipo de cancro mais letal a nível mundial. A ressecção cirúrgica e o transplante hepático são ainda a melhor hipótese de cura, mas uma vez que o número de doentes que pode beneficiar destas terapias é reduzido, têm vindo a ser desenvolvidas terapias alternativas, onde se inclui a quimioterapia. No entanto, tem-se constatado que o CHC é um tumor altamente resistente à quimioterapia, o que se deve, em parte à expressão de proteínas de resistência multifármacos (MDR).

A principal família de proteínas MDR é a família dos transportadores ABC, onde se incluem a Pgp e a MRP1. Existem outras proteínas MDR pertencentes a outras famílias, tais como a LRP, que pertence à família de proteínas *Vault*. O método mais comum para avaliar a função destes transportadores envolve o estudo da captação de substratos radiomarcados, como ^{99m}Tc-MIBI.

Este trabalho teve como objectivo principal avaliar se o ^{18}F-FDG (análogo radiomarcado da glicose) constitui um radiotraçador útil, à semelhança do ^{99m}Tc-MIBI, na avaliação de MDR em três linhas celulares de CHC que diferem na expressão da proteína p53 (HepG2, HuH7 e Hep3B2.1-7), correlacionando estudos de captação e retenção com a expressão de GLUTs e de três proteínas MDR (Pgp, MRP1 e LRP).

Através dos estudos de captação de ^{18}F-FDG foi possível verificar o papel que os GLUT 1 e 3 têm na entrada deste radiofármaco nas células tumorais de CHC, uma vez que as linhas celulares com maior expressão destas proteínas são as que possuem maiores percentagens de captação. E, através dos estudos de retenção verificou-se que a expressão de proteínas MDR, principalmente a proteína Pgp, tem uma relação inversa com a captação e retenção de ^{18}F-FDG nestas células. A retenção de ^{99m}Tc-MIBI está relacionada essencialmente com a expressão da proteína MRP1 e LRP. Este resultado confirma que este radiofármaco é substrato para a MRP1, como já se sabia, e sugere que pode ser substrato para LRP.

Comparando a expressão de GLUTs e proteínas MDR com a expressão de p53 em cada linha celular verificou-se que a p53 tem uma grande influência na expressão destes dois tipos de transportadores.

Através dos estudos de modulação constatou-se, ao incubar as células com verapamil, inibidor da Pgp, um aumento considerável da retenção de ^{18}F-FDG.

Com estes estudos, foi possível verificar que o ^{18}F-FDG é substrato das proteínas MDR, nomeadamente da Pgp, e que constitui uma alternativa promissora no diagnóstico de tumores quimiorressistentes, tal como o CHC.

Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common primary liver tumor and the third most deadly cancer worldwide. Surgical resection and liver transplantation is still the best chance of healing, but since the number of patients who can benefit from such therapy is low, have been developed alternative therapies, which include chemotherapy.

However, HCC is known to be a highly chemoresistant tumor, which is due in part to the multidrug resistance proteins expression (MDR). Some MDR proteins belong to the family of ABC transporters, which are Pgp and MRP1, and other proteins belonging to other families of proteins, like Vault proteins, which include, LRP. The most common method for evaluating the function of these proteins involves the uptake studies of radiolabeled substrates, such as ^{99m}Tc-MIBI.

This paper allowed to evaluate if the ^{18}F-FDG (radiolabeled glucose analog) is as good as a radiotracer like ^{99m}Tc-MIBI to evaluate MDR in three HCC human cell lines that differ in p53 expression (HepG2, HuH7 and Hep3B2.1-7), correlating uptake and retention studies with the expression of GLUTs and three MDR proteins (Pgp, MRP1 and LRP).

Through studies of ^{18}F-FDG was possible to verify the role that GLUT 1 and 3 are at the entrance of this radiopharmaceutical in tumor cells of HCC, because cell lines with increased expression of these proteins are those that have higher uptake percentages. And through the retention studies it was found that expression of MDR proteins, especially Pgp protein, has an inverse relationship with the uptake and retention of ^{18}F-FDG in these cells. The retention of ^{99m}Tc-MIBI is mainly due to the expression of LRP and protein MRP1. This result confirms that this radiotracer is a substrate for MRP1, as already known, and suggests it also may be a substrate for LRP.

Comparing the expression of GLUTs and MDR proteins with the expression of p53 in each cell line was found that p53 has a great influence on the expression of these two types of transporters.

Through studies of modulation was verified, by incubating the cells with verapamil, a Pgp inhibitor, a considerable increase in ^{18}F-FDG retention.

Therefore, it was possible to verify that the ^{18}F-FDG is a substrate of MDR proteins, in particular of Pgp, and is a promising alternative for the diagnosis of chemoresistant tumors, as HCC.

Lista de Abreviaturas

^{18}F-FDG	2-desoxi-2-(^{18}F)fluoro-D-glicose
^{99m}Tc-MIBI	^{99m}Tc-2-metoxibutilo-isonitrilo
ABC	*ATP-binding cassette*
AFB_1	aflatoxina B1
APC	*adenomatous polyposis coli*
ATCC	*American Type Culture Collection*
ATP	adenosina trifosfato
Bax	*Bcl-2–associated X protein*
Bcl-2	*B-cell leukemia/lymphoma 2*
BCLC	*Barcelona-Clinic Liver Cancer*
BCRA2	*breast cancer 2*
BCRP	*breast cancer resistance protein*
CD95	*cluster of differentiation 95*
CHC	carcinoma hepatocelular
c-myc	*myelocytomatosis c*
CO_2	dióxido de carbono
cyclin D1	*G1/S-specific cyclin D1*
DLC-1	*deleted in liver cancer protein*
DMEM	*dulbecco's modified Eagle's medium*
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EGFR	*epidermal growth factor receptor*
ERKs	*extracellular-signal-regulated kinases*
$FADH_2$	Dinucleótido de flavina adenina
FBS	*Fetal Bovine Serum*

FCS	*forward scatter*
GLUT	transportadores de glicose
GSH	glutatião
H_20	água
HEPES	*4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*
HLA	human leukocyte antigen
IC_{50}	*half maximal inhibitory concentration*
IGF-2	*insulin-like growth factor 2*
IMR	imagem por ressonância magnética
JCRB	*Japanese Collection of Research Bioresources*
LRP	*lung resistance protein*
MAPK	*mitogen-activated protein kinases*
Mdm2	*murine double minute 2*
MDR	*multidrug resistance*
Mg^{2+}	ião magnésio
MIF	média de intensidades de fluorescência
MRP1	*multidrug resistance protein 1*
MTT	*3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)2,5-diphenyltetrazolium bromide*
MTX	metotrexato
MVP	*major vault protein*
NADH	dinucleótido de nicotinamida-adenina
NBD	*nucleotide-binding domain*
O_2	oxigénio
PBS	*phosphate buffer saline*
PET	*positron emission tomography*
Pgp	glicoproteína-P

PKC	protein kinase C
PTEN	*phosphatase and tensin homolog*
Raf	*proto-oncogene serine/threonine-protein kinase*
Rb	*retinoblastoma protein*
RNA	ácido ribonucleico
Smad	*mothers against decapentaplegic homolog*
SOC2-1	*supressor os cytokine signaling 1*
SPSS	*statistical package for the social science software*
SSC	*side scatter*
TAC	tomografia computorizada
TMD	*transmembrane domain*
TP53	*tumor protein p53*
VEGF	*vascular endothelial growth factor*
VHB	vírus da hepatite B
VHC	vírus da hepatite C
VIH	vírus da imunodeficiência humana
β-catenin	*cadherin-associated*

Índice de Figuras

Figura 1.1. – Incidência mundial de carcinoma hepatocelular em diferentes áreas geográficas, por cada 100 mil habitantes[4]. ..... - 5 -

Figura 1.2. – Proposta de um algoritmo para o tratamento do CHC adaptado do algoritmo BCLC. PS - *performance status;* OLT - *orthotopic liver transplantation;* PEI - *percutaneous ethanol injection;* RFA - *radiofrequency ablation*[10]. ..... - 10 -

Figura 1.3. – Diferentes mecanismos de resistência multifármacos. (1) Entrada do fármaco; (2) Metabolismo do fármaco; (3) Sequestração do fármaco; (4) Mecanismos activados depois de entrada no núcleo; (5) Apoptose induzida pela entrada do fármaco; (6) Microambiente; (7) Vias de transdução de sinal[14]. ..... - 12 -

Figura 1.4. – Modelo da estrutura da glicoproteína-P[21]. ..... - 15 -

Figura 1.5. – Topologia do modelo para MRP1[24]. ..... - 18 -

Figura 1.6. – Esquema dos diferentes mecanismos de actuação e activação da p53[30]. ..... - 21 -

Figura 1.7. – Metabolismo da glicose em células de mamíferos[35]. ..... - 24 -

Figura 1.8. – Esquema da via metabólica da glicose e do ^{18}F-FDG[38]. ..... - 25 -

Figura 3.1. – Esquema representativo do hemocitómetro utilizado na determinação da viabilidade celular[48]. ..... - 40 -

Figura 4.1. – Análise da expressão membranar e total de GLUT1 por citometria de fluxo. Os resultados são expressos em termos da média de intensidade de fluorescência (MIF) e expressam a média e desvio padrão de três experiências independentes para as três linhas celulares em estudo. Análise estatística: ** $p<0,01$; *** $p<0,001$. ..... - 46 -

Figura 4.2. – Análise da expressão membranar do GLUT3 por citometria de fluxo. Os resultados são expressos em termos da média de intensidade de fluorescência (MIF) e expressam a média e desvio padrão de três experiências independentes para as três linhas celulares em estudo. Análise estatística: ** $p<0,01$; *** $p<0,001$. ..... - 47 -

Figura 4.3. – a) Análise da expressão membranar de Pgp por citometria de fluxo; b) análise da expressão membranar de MRP1 por citometria de fluxo; c) análise da expressão total de LRP por

citometria de fluxo. Os resultados são expressos em termos da média de intensidade de fluorescência (MIF) e expressam a média e desvio padrão de quatro experiências independentes para as três linhas celulares em estudo. Análise estatística: ** p<0,01; *** p<0,001. ..... - 48 -

Figura 4.4. – Percentagem de captação de ^{18}F-FDG pelas três linhas celulares em estudo, ao longo do tempo. Os dados expressam a média e desvio padrão de quatro experiências independentes. . - 49 -

Figura 4.5. – Percentagem de retenção de ^{18}F-FDG pelas três linhas celulares em estudo, ao longo do tempo. Os dados expressam a média e desvio padrão de quatro experiências independentes. . - 50 -

Figura 4.6. – Percentagem de captação de ^{99m}Tc-MIBI pelas três linhas celulares em estudo, ao longo do tempo. Os dados expressam a média e desvio padrão de quatro experiências independentes. ..... - 51 -

Figura 4.7. – Percentagem de retenção de ^{99m}Tc-MIBI pelas três linhas celulares em estudo, ao longo do tempo. Os dados expressam a média e desvio padrão de quatro experiências independentes. ..... - 52 -

Figura 4.8. – Curva de dose-resposta da linha celular HepG2 após incubação com concentrações crescentes de verapamil durante 24, 48, 72 e 96 horas. Os resultados expressam a média e desvio padrão de seis experiências independentes. ..... - 53 -

Figura 4.9. – Curva de dose-resposta da linha celular HuH7 após incubação com concentrações crescentes de verapamil durante 24, 48, 72 e 96 horas. Os resultados expressam a média e desvio padrão de seis experiências independentes. ..... - 54 -

Figura 4.10. – Curva de dose-resposta da linha celular Hep3B2.1-7 após incubação com concentrações crescentes de verapamil durante 24, 48, 72 e 96 horas. Os resultados expressam a média e desvio padrão de seis experiências independentes. ..... - 55 -

Figura 4.11. – Percentagem de retenção de ^{18}F-FDG pela linha celular HuH7, ao longo do tempo, em células controlo e células incubadas com 90 µM de verapamil. Os dados expressam a média e desvio padrão de quatro experiências independentes..... - 57 -

Figura 4.12. – Percentagem de retenção de ^{18}F-FDG pela linha celular HepG2, ao longo do tempo, em células controlo e células incubadas com 180 µM de verapamil. Os dados expressam a média e desvio padrão de 2 experiências independentes..... - 57 -

Índice de Tabelas

Tabela 1.1. – Taxa de incidência de CHC no Mundo[3]. ..... - 4 -

Tabela 4.1. – Valor de IC_{50}, r^2 e intervalo de confiança para a linha celular HepG2, quando incubada com verapamil para os diferentes períodos de incubação. ..... - 53 -

Tabela 4.2. – Valor de IC_{50}, r^2 e intervalo de confiança para a linha celular HuH7 quando incubada com verapamil para os diferentes períodos de incubação. ..... - 54 -

Tabela 4.3. – Valor de IC_{50}, r^2 e intervalo de confiança para a linha celular Hep3B2.1-7 quando incubada com verapamil, para os diferentes períodos de incubação. ..... - 55 -

Índice

I. Introdução ..... - 1 -

1.1. Carcinoma Hepatocelular ..... - 3 -

1.1.1. Epidemiologia ..... - 3 -

1.1.2. Factores de Risco e Patogénese ..... - 6 -

1.1.3. Diagnóstico e Tratamento ..... - 9 -

1.2. Resistência Multifármacos - MDR (do inglês *Multidrug Resistance*) ..... - 11 -

1.2.1. O Papel dos Transportadores ABC ..... - 12 -

1.2.1.1. Glicoproteína-P (Pgp) ..... - 14 -

1.2.1.2. Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1) ..... - 17 -

1.2.2. Lung Resistance Protein (LRP) ..... - 18 -

1.3. Proteína p53 ..... - 19 -

1.4. Glicólise, ^{18}F-FDG e MDR ..... - 22 -

1.4.1. Glicólise e ^{18}F-FDG ..... - 22 -

1.4.2. Quimiorresistência e ^{18}F-FDG ..... - 26 -

II. Objectivos ..... - 27 -

III. Material e Métodos ..... - 31 -

3.1. Culturas Celulares ..... - 33 -

3.2. Citometria de Fluxo ..... - 35 -

3.2.1. Avaliação da Expressão Membranar de Pgp, MRP1, GLUT1 e GLUT3 ..... - 36 -

3.2.2. Avaliação da Expressão Total de LRP, GLUT1 e GLUT3 ..... - 37 -

3.3. Estudos de Captação e Retenção ..... - 37 -

3.3.1. Determinação da Viabilidade Celular ..... - 39 -

3.4. Avaliação da Proliferação Celular por Espectrofotometria ..... - 40 -

3.5. Avaliação da Modulação das Proteínas MDR ..... - 41 -

3.6. Análise Estatística ..... - 41 -

IV. Resultados ..... - 43 -

4.1. Citometria de Fluxo: Avaliação da Expressão de Pgp, MRP1, LRP, GLUT1 e GLUT3..... - 45 -

4.2. Estudos de Captação e Retenção..... - 48 -

4.3. Avaliação do Efeito do Verapamil na Proliferação Celular por Espectrofotometria .... - 52 -

4.4. Estudos de Retenção utilizando um Modulador MDR ..... - 56 -

V. Discussão..... - 59 -

VI. Conclusões e Perspectivas Futuras ..... - 69 -

VII. Bibliografia ..... - 73 -

I. Introdução

1.1. Carcinoma Hepatocelular

1.1.1. Epidemiologia

O Carcinoma Hepatocelular (CHC), com origem nos hepatócitos, é o tumor primário do fígado mais frequente, sendo umas das maiores causas de mortalidade em todo o mundo, representando um desafio de importância global. É o quinto tipo de cancro mais comum, em termos de incidência, nos homens (523 mil novos casos por ano, 7,9%) e o sétimo mais comum nas mulheres (226 mil novos casos por ano, 6,5%), e o terceiro mais letal com 695 mil mortes por ano, no mundo. O número de casos diagnosticados e de morte é muito próximo, essencialmente porque este carcinoma, quando é detectado, encontra-se na maioria das vezes num estado bastante avançado, o que origina uma taxa mortalidade muito elevada[1,2].

A incidência varia com a idade e com a distribuição geográfica, sendo os países em desenvolvimento os mais afectados, nomeadamente, nas regiões do Este Asiático (7,2 casos de CHC em 100 mil homens por ano, e 3,6 casos em 100 mil mulheres por ano), Sudeste Asiático (excepto o Japão) (21,4 casos de CHC em 100 mil homens por ano, e 9,0 casos em 100 mil mulheres por ano) e África sub-Saariana (13,9 casos de CHC em 100 mil homens por ano, e 5,1 casos em 100 mil mulheres por ano). Em contraste, a incidência é muito mais baixa nos países da América do Norte (6,8 casos de CHC em 100 mil homens por ano, e 2,2 casos em 100 mil mulheres por ano), na Europa (excepto sudoeste europeu), América Central e do Sul, Austrália e Nova Zelândia, como está apresentado na Tabela 1.1[3]. No entanto, é importante dar ênfase ao facto de que nos últimos anos a incidência do CHC tem vindo a aumentar quer na Europa quer nos Estados Unidos da América. A Figura 1.1. representa a distribuição geográfica de CHC no mundo, por cada 100 mil habitantes[4].

A principal causa de origem para este cancro é a infecção pelos vírus da hepatite C (VHC) e da hepatite B (VHB). No caso dos EUA e Europa, o aumento da incidência deve-se principalmente à infecção pelo VHC. Este vírus representa também uma das principais causas de

origem de cirrose, doença que normalmente está associada ao aparecimento de CHC nestes países[5]. Em relação aos países em desenvolvimento a principal causa de aparecimento do CHC é a infecção pelo vírus da hepatite B e também ingestão de aflatoxinas B[1].

Tabela 1.1. – Taxa de incidência de CHC no Mundo[3].

Countries	Men	Women
Low resource		
Mongolia	116.6	74.8
Middle Africa	18.9	9.6
Eastern Africa	7.2	3.6
South-Eastern Asia	21.4	9.0
Melanesia	12.9	5.0
Western Africa	16.6	8.0
Polynesia	10.8	3.4
Intermediate resource		
China	37.4	13.7
Caribbean	6.3	4.4
South Africa	13.9	5.1
Central America	7.3	7.0
Western Asia	4.4	2.3
Northern Africa	7.5	2.5
South America	5.3	3.9
South Central Asia	3.4	1.6
High resource		
Korea	38.4	10.6
Southern Europe	9.8	3.2
Western Europe	7.2	2.1
Eastern Europe	4.6	1.9
Northern America	6.8	2.2
Australia/New Zealand	5.0	2.0
Northern Europe	3.8	1.6

*All values expressed per 100,000 of the population in 2008 (data from GLOBOCAN 2008[3]). Abbreviation: HCC, hepatocellular carcinoma.

A idade com que os indivíduos desenvolvem CHC está intensamente relacionada com a idade em que foram infectados pelos vírus VHC e VHB, e com a taxa de replicação viral activa. No Oeste Africano, a infecção acontece entre o primeiro e quinto ano de idade, e a replicação viral decai rapidamente após a adolescência. Nesta região a incidência de CHC estabiliza por volta dos 45 anos de idade, no entanto é preciso ter em conta que muitas vezes os indivíduos infectados com VHB morrem sem terem desenvolvido CHC. No Este Asiático, a infecção por VHB é adquirida antes do primeiro ano de idade, na maioria dos casos, e a replicação do vírus continua até uma idade avançada, fazendo com que a incidência de CHC aumente com a idade sem nunca atingir um *plateau*. Como consequência da infecção viral numa idade tão precoce, principalmente nos

países Africanos, o cancro desenvolve-se na faixa etária da adolescência e vida adulta. Nos países em que a infecção por VHB não é endémica, a infecção pelo mesmo e pelo VHC é adquirida na idade adulta. Nestes países o CHC raramente surge antes dos 50 anos de idade, e a taxa de maior de incidência é nas pessoas com mais de 75 anos[3].

O risco de CHC é 2 a 7 vezes maior nos homens do que nas mulheres, embora varie segundo a geografia. A explicação para esta diferença deve-se, em primeiro lugar, ao facto dos homens estarem expostos normalmente a ambientes mais carcinogénicos para o fígado (tais como álcool e tabaco) e a infecções pelos vírus das hepatites. Em segundo lugar, os efeitos dos estrogénios podem suprimir a inflamação mediada pela interleucina-6 na mulher, reduzindo a probabilidade de doença hepática. Em terceiro lugar, os efeitos da testosterona podem aumentar o sinal dos receptores de androgénios no homem, promovendo a proliferação das células do CHC[3].

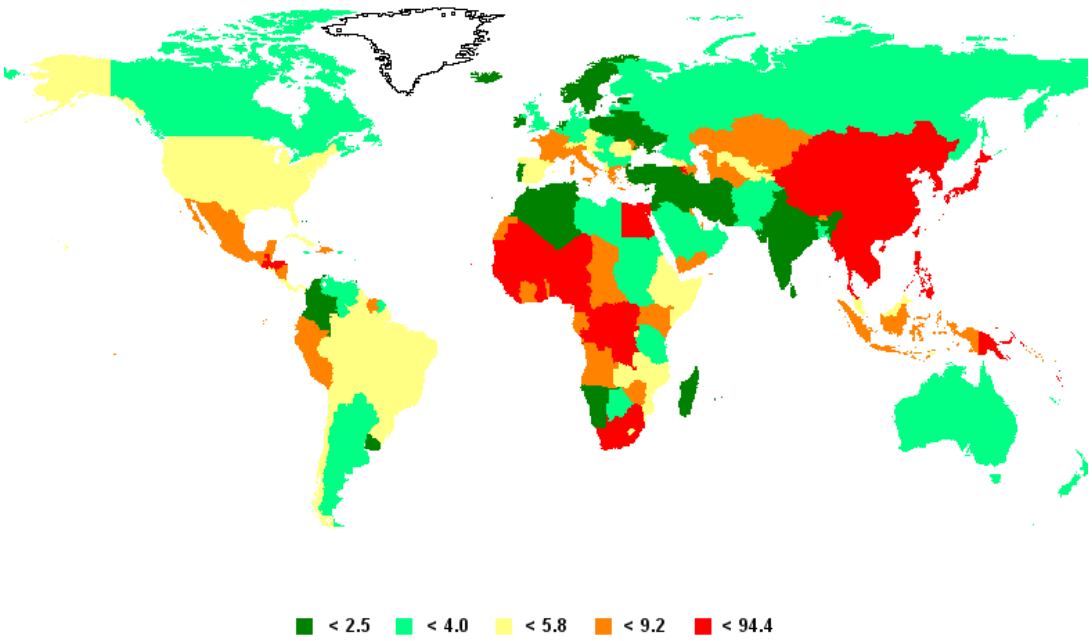


Figura 1.1. – Incidência mundial de carcinoma hepatocelular em diferentes áreas geográficas, por cada 100 mil habitantes[4].

1.1.2. Factores de Risco e Patogénese

O desenvolvimento de um cancro é um processo que envolve diferentes etapas, nas quais o controlo do crescimento celular é progressivamente perturbado. Mutações genéticas, alterações na transcrição e tradução de genes e, alterações nos produtos das proteínas são biomarcadores específicos para identificação da doença[6]. Todos os factores etiológicos associados com o CHC são causa de uma doença hepática crónica. A cirrose é um factor de risco para o desenvolvimento tumoral, visto que 80% dos doentes com CHC desenvolvem esta doença antes de desenvolver o tumor[7]. Em termos populacionais, as principais causas de CHC são os vírus das hepatites B e C (VHB e VHC) e o alcoolismo/tabagismo, como já foi referido anteriormente. Na região Africana e Asiática existem, ainda, casos de CHC que surgem devido à ingestão de alimentos que contêm micotoxinas, mais precisamente a aflatoxina B1, que consiste numa substância carcinogénica produzida pelo fungo da espécie *Aspergillus* que coloniza alimentos como milho, trigo, amendoim e leguminosas[7]. A aflatoxina B1 (AFB_1) actua em sinergia com o VHB na patogénese do CHC. Causa mutações no DNA (ácido desoxirribonucleico), particularmente no gene TP53, mais precisamente no codão 249, atenuando a função supressora tumoral. Esforços na eliminação da exposição dos alimentos a esta toxina têm vindo a ser desenvolvidos nas regiões africanas e asiáticas[3,6].

Finalmente, algumas doenças metabólicas e genéticas, também podem constituir causa para origem do CHC, tais como, hemocromatose (doença causada pela sobrecarga de ferro), doença de Wilson (doença causada pela sobrecarga de cobre), porfiria (doença causada por diminuição de uma das enzimas da biossíntese do heme) e deficiência na α_1-antitripsina[8].

A hepatite B crónica é a etiologia mais frequente que se encontra na origem do CHC em países com escassos recursos médicos. De facto, mais de metade da população que sofre de CHC está infectada com VHB, pois, portadores deste vírus têm 100 vezes mais probabilidade de desenvolver CHC que os não infectados[9]. É um vírus solitário da família dos hepadnavírus, que ataca o DNA das células e, que ao integrar o genoma, pode activar proto-oncogenes celulares ou

suprimir genes reguladores, levando os hepatócitos à transformação maligna[6]. O risco de aparecimento de CHC em portadores de hepatite B difere, também, na etnicidade. Indivíduos caucasianos portadores de hepatite B desenvolvem CHC numa idade mais avançada depois de um período de cirrose hepática progressiva, enquanto indivíduos africanos e asiáticos tendem a desenvolver CHC na idade adulta exibindo muito menos casos de cirrose. Variações genéticas também podem estar na base das diferenças entre as etnias. Esta disparidade pode ser explicada, alternativamente, pela diferença de idades que as populações apresentam aquando da infecção com VHB. Na Ásia a transmissão do vírus dá-se na forma de uma transmissão vertical, enquanto na África temos uma transmissão horizontal numa idade mais precoce. Contrastando com estes dois casos, temos os países ocidentais em que o VHB é transmitido na adolescência e idade adulta devido, principalmente, a comportamentos de alto risco, tais como, troca de seringas, sexo sem prevenção ou causas iatrogénicas, incluindo transfusões de sangue, práticas de saúde não seguras, procedimentos invasivos, hemodiálise ou transplantes de órgãos[3].

A hepatite C é a principal causa de doenças hepáticas crónicas e CHC nos países ocidentais, tais como os EUA. Ao contrário do VHB, o VHC é um vírus de RNA (ácido ribonucleico) que não integra o genoma do hospedeiro, mas actua, como hospedeiro nas interacções entre as proteínas, sendo este o principal papel na hepatocarcinogénese[6]. O mecanismo que determina a progressão desta doença no organismo humano é ainda pouco conhecido[1]. São apenas sabidas as causas da sua transmissão pelos povos ocidentais, que são essencialmente a exposição directa a sangue, consumo de drogas por via intravenosa e contacto sexual sem protecção. A transmissão iatrogénica deve-se a agulhas, seringas ou outros instrumentos médicos contaminados. Num estudo realizado em Espanha e publicado em 2002, o VHC era transmitido maioritariamente em ambiente hospitalar (67%), sendo 45% por cirurgia, 33% na enfermaria e 22% através de procedimentos invasivos, seguido de consumo de drogas por via intravenosa (8%), acidentes com agulhas e seringas (5%) e contacto sexual (6%). Existem ainda outros riscos de contaminação, não tão comuns, mas ainda assim importantes, tais como, consumo de drogas por via intranasal,

tatuagens, *piercings*, consumo excessivo de álcool, diabetes *mellitus*, infecção com VHB latente, idade avançada, altos níveis de fosfatase alcalina, tabaco, entre outros[3].

As pessoas que estejam co-infectadas com VIH e VHB/VHC podem também desenvolver muito rapidamente e de forma progressiva doenças hepáticas, e quando atingem o estágio de doença cirrótica, têm uma alta probabilidade de desenvolver CHC[9].

A nível genético as células tumorais do CHC são caracterizadas por uma considerável alteração em diversos cromossomas. Mutações foram encontradas em inúmeros genes, o que se repercute nas proteínas correspondentes, incluindo p73 (*tumor protein p73*), p53 (*tumor protein p53*), Rb (*retinoblastoma protein*), APC (*adenomatous polyposis coli*), DLC-1 (*deleted in liver cancer*), p16 (*cyclin-dependent kinase inhibitor*), PTEN (*phosphatase and tensin homolog*), IGF-2 (*insulin-like growth factor 2*), BRCA2 (*breast cancer 2*), SOCS-1 (*supressor os cytokine signaling 1*), Smad2 (*mothers against decapentaplegic homolog 2*) e Smad4 (*mothers against decapentaplegic homolog 4*), β-*catenin* (*catenin cadherin-associated*), c-myc (*myelocytomatosis c*) e *cyclin D1* (*G1/S-specific cyclin D1*)[7]. Uma enorme quantidade de mecanismos moleculares e vias de sinalização que regulam a proliferação e sobrevivência celular, factores de crescimento e seus receptores, factores angiogénicos e receptores de oncogenes, está envolvida no desenvolvimento do CHC. Entre elas temos a sobreexpressão do receptor do factor de crescimento epidérmico (EGFR) que pode estimular o receptor da tirosina cinase para permanecer activo e assim, estimular a transdução a partir da membrana celular para o núcleo. Para além desta sobreexpressão, existem outros mensageiros secundários que trabalham para a transmissão de moléculas desde a superfície celular até ao núcleo. Um deles é a via das MAP cinases (MAPK), através da proteína Ras, que é activada quando um factor de crescimento se liga a receptores na membrana. Depois de sofrer uma autofosforilação a proteína Ras transmite o sinal através da activação de outros componentes da via de sinalização MAPK, como por exemplo, as cinases Raf, MEK e ERK[1]. A angiogénese é outro mecanismo bastante activo no processo de proliferação tumoral, incluindo no CHC. Os tumores precisam de fontes independentes de sangue, oxigénio,

glicose e nutrientes, para que ocorra o seu crescimento descontrolado. Imagens radiográficas mostraram que o CHC é um tumor bastante vascularizado, sendo que o VEGF (factor de crescimento endotelial vascular) está particularmente activo neste tipo de cancro. Sabe-se ainda, que a angiogénese tumoral aumenta o número de receptores requeridos para a cascata de sinalização da via das MAPK, contribuindo para a regulação da proliferação, diferenciação e sobrevivência das células tumorais. Todos estes factores contribuem para um melhor conhecimento sobre o CHC, permitido um melhor diagnóstico e tratamento[1,7].

1.1.3. Diagnóstico e Tratamento

No passado, a maioria dos casos de CHC era diagnosticada já num estádio bastante avançado, o que não oferecia grandes opções terapêuticas. No entanto, durante as duas últimas décadas surgiram grandes avanços na medicina que permitem, hoje, uma correcta detecção e caracterização do CHC mais precocemente.

Como primeira técnica para o diagnóstico de CHC recorre-se a uma combinação de imagem médica (ecografia abdominal) com uma avaliação da presença no plasma da α-fetoproteína (AFP), um marcador tumoral. A presença de AFP sérica é o principal indício de CHC, no entanto apresenta uma sensibilidade baixa, o que faz com que após a sua identificação se recorra a novos exames. Após a ecografia revelar uma lesão ou nódulo anormal no doente, novas técnicas são realizadas, nomeadamente a TAC (tomografia computorizada) e IRM (imagem por ressonância magnética), e, eventualmente, caso seja necessário, uma biópsia. O conhecimento preciso do estádio da doença ajuda a decidir qual o tratamento mais adequado. Existem muitas classificações e diferentes planos de tratamento para o CHC, incluindo o algoritmo BCLC (*Barcelona-Clinic Liver Cancer*)[3]. Segundo o BCLC o CHC apresenta cinco estádios de desenvolvimento, que estão resumidos na Figura 1.2.[10].

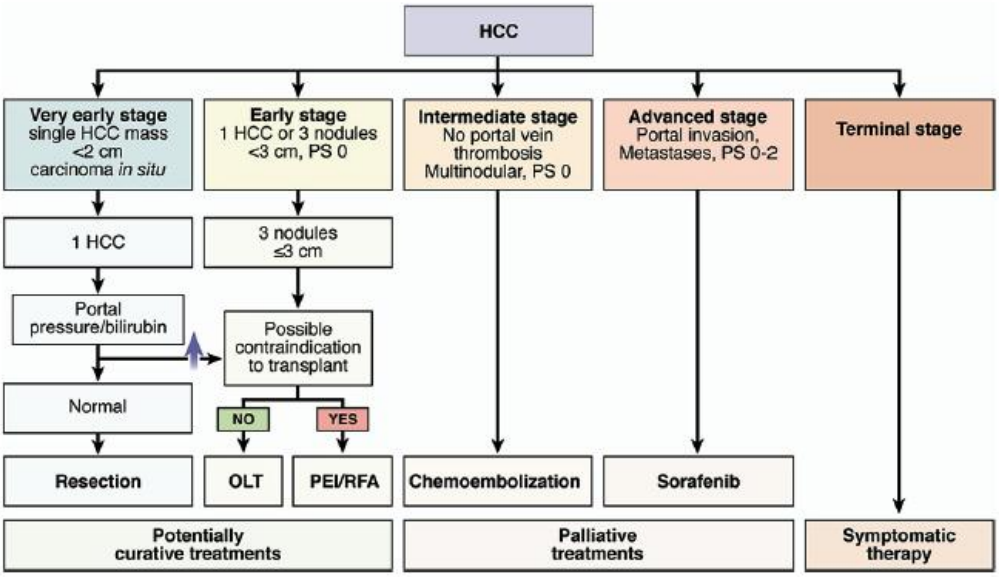


Figura 1.2. – Proposta de um algoritmo para o tratamento do CHC adaptado do algoritmo BCLC. PS - *performance status;* OLT - *orthotopic liver transplantation;* PEI - *percutaneous ethanol injection;* RFA - *radiofrequency ablation*[10].

De acordo com o sistema BCLC numa fase inicial da doença os tratamentos mais adequados são os chamados tratamentos potencialmente curativos, onde se incluem a ressecção cirúrgica, o transplante de fígado e a ablação percutânea. Este último procedimento inclui tratamentos com injecções directas de químicos (etanol, acido acético, solução salina em ebulição) no nódulo tumoral, ou então, destruição física (usualmente através da temperatura) recorrendo a ablação térmica por radiofrequência, microondas, laser e crioablação, por forma a induzir necrose nas células tumorais. Este tipo de tratamento apresenta-se como alternativa para os doentes não aptos para cirurgia ou transplante. Num estádio intermédio da doença, recorre-se a tratamentos paliativos, tais como a quimioembolização e a radioembolização transarterial. A base da embolização é induzir necrose e isquemia tumoral via oclusão arterial aguda. Normalmente usa-se a embolização combinada com agentes quimioterapêuticos via artéria hepática. É recomendado para doentes com CHC não ressecável e sem invasão vascular ou metástases. Para cancros numa fase bastante avançada recorre-se a tratamentos paliativos

através de agentes de quimioterapia, tais como *Sorafenib,* doxorrobucina, cisplatina, 5-fluouroacilo, entre outros[3,6,10,11].

1.2. Resistência Multifármacos - MDR (do inglês *Multidrug Resistance*)

Grande parte dos doentes que padecem de cancro (cerca de 50% dos casos), para além da ressecção cirúrgica local, são tratados com recurso à radioterapia e à quimioterapia. Mas por que razão algumas dessas pessoas ficam curadas com os tratamentos e outras não? Alterações no fármaco e na interacção com a membrana, modificações do metabolismo do fármaco, sequestração intracelular, mecanismos de reparo de DNA, evasão de mecanismos de apoptose induzidos pelo fármaco, expressão de proteínas da superfamília ABC, expressão de proteínas *Vault*, mudanças no microambiente tumoral e expressão de células estaminais parecem contribuir para a complexa questão da resistência aos químicos[12].

A quimioterapia é uma forma efectiva de tratar um tumor, no entanto a habilidade das células cancerígenas de se tornarem resistentes a diferentes fármacos (processo que se denomina de resistência multifármacos (MDR – do inglês *multidrug resistance*) apresenta-se como o maior entrave ao sucesso dos tratamentos. Três décadas de investigação têm identificado várias vias pelas quais as células cancerígenas se tornam resistentes à quimioterapia, abrindo um caminho para um melhor conhecimento e para uma melhor forma de tratamento[13].

Existem duas classes gerais de resistência a fármacos anticancerígenos: aqueles que comprometem a entrada dos fármacos nas células tumorais e aqueles que surgem nas células tumorais devido a alterações genéticas e epigénicas, afectando a sensibilidade ao fármaco. Nesta última classe incluem-se aqueles que prejudicam a actuação do fármaco aumentando a sua saída das células[13]. Um dos mecanismos mais estudados e que se sabe possuir uma forte contribuição para este fenómeno é a sobreexpressão de bombas de efluxo dependentes de ATP, tais como as proteínas transportadoras pertencentes à superfamília ABC (*ATP-binding cassette*)[12]. A Figura 1.3.

ilustra os diferentes mecanismos de resistência multifármacos, onde se incluem as proteínas da superfamília ABC.

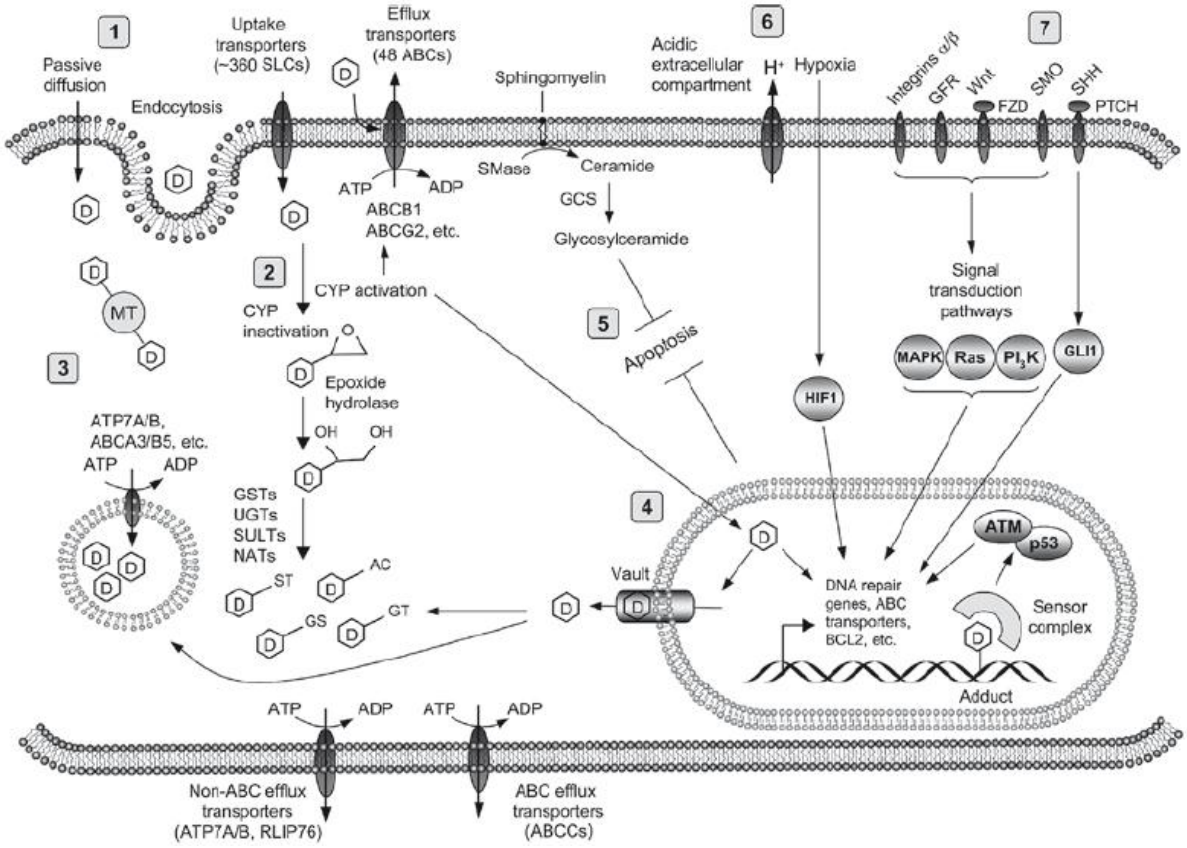


Figura 1.3. – Diferentes mecanismos de resistência multifármacos. (1) Entrada do fármaco; (2) Metabolismo do fármaco; (3) Sequestração do fármaco; (4) Mecanismos activados depois de entrada no núcleo; (5) Apoptose induzida pela entrada do fármaco; (6) Microambiente; (7) Vias de transdução de sinal[14].

1.2.1. O Papel dos Transportadores ABC

A superfamília de transportadores ABC é a maior superfamília de proteínas transportadoras conhecida até hoje. O seu nome foi introduzido em 1992 por Chris Higgins. A grande maioria dos seus membros é responsável pelo transporte activo de uma variedade de compostos através das membranas biológicas, incluindo fosfolípidos, iões, péptidos, esteróides, polissacarídeos, aminoácidos, aniões orgânicos, ácidos biliares, fármacos e outros xenobióticos. Até à data, foram já identificados 48 genes ABC humanos que estão organizados em sete subfamílias (desde ABCA até ABCG), e que são expressas tanto em tecido normal como em tecido tumoral[15,16]. Todos os transportadores ABC são compostos por dois domínios de ligação

nucleotídica (*nucleotide-binding domain* (NBDs)) e dois domínios transmembranares (*transmembrane domain* (TMDs)). É nos NBDs que se dá a ligação e hidrólise de ATP, que fornece a energia necessária para o movimento através das membranas. Estes domínios são também a característica que permite identificar todas a proteínas ABC, isto porque existem duas sequências localizadas em cada NBD, designadas por *Walker A* e *Walker B*, que se conservam em todas as proteínas da superfamília ABC. O resíduo de lisina na sequência *Walker A* está envolvido na ligação de β-fosfato do ATP enquanto o resíduo do ácido aspártico na sequência *Walker B* interage com o ião Mg^{2+}. Para além disto, existe ainda uma terceira sequência de aminoácidos, única neste tipo de transportadores, localizada entre as sequências *Walker A* e *Walker B*, conhecida como a sequência C (ALSGGQ). A função exacta desta sequência é ainda pouco conhecida, embora se saiba que está directamente implicada no reconhecimento, ligação e hidrólise de ATP[15–17]. Os transportadores ABC possuem um largo papel nos mecanismos de defesa celulares. Regulam a permeabilidade local sendo expressos na barreira hematoencefálica, líquido cefaloraquídeo, barreira hematotesticular e placenta. No fígado, no tracto gastrointestinal e nos rins, as proteínas ABC extrusam toxinas, contribuindo para a protecção do organismo. Têm ainda um papel activo no sistema imunitário, através do transporte de péptidos para dentro do retículo endoplasmático, sendo identificados como antigénios da classe I das moléculas HLA[14].

O primeiro transportador ABC descoberto foi o ABCB1 em 1976. Este transportador é hoje designado por glicoproteína-P (Pgp) e foi descoberto em células de ovários de hamster que foram cultivadas para resistência de colchicina[14]. Trinta anos mais tarde, quinze outros transportadores ABC foram associados a resistência a fármacos. O segundo transportador ABC isolado foi a proteína MRP1, codificada pelo gene ABCC1, que facilitou a descoberta de outras quatro, tais como, a MRP2, MRP3, MRP4 e MRP5, codificados pelos genes ABCC2, ABCC3, ABCC4 e ABCC5, respectivamente. Hoje em dia, conhecem-se muitos outros transportadores que actuam activamente na resistência a fármacos em diversos tumores, entre eles temos a BCRP (*breast cancer resistance protein*) codificado pelo gene ABCG2, que foi isolado originalmente a partir de

tecido tumoral mamário no qual se co-administrou doxorrubicina e verapamil (um inibidor da Pgp)[14,16].

1.2.1.1. Glicoproteína-P (Pgp)

A glicoproteína-P (Pgp) é um transportador transmembranar da superfamília ABC codificado pelo gene ABCB1/MDR1, pertencente, por isso, à subfamília ABCB e descoberto pela primeira vez em 1976. A Pgp existe sobre um número diferente de isoformas que têm mais de 70% de sequência homóloga. Nos humanos, a Pgp é codificada por dois genes MDR, o MDR1 e o MDR3, que estão localizados ao longo do braço do cromossoma 7. De todas as isoformas conhecidas sabe-se que a resistência multifármacos está associada com a MDR1[18].

É um polipéptido fosforilado e glicosilado de peso molecular 170 kDa consistindo em sequências de 1280 aminoácidos, organizadas em duas séries repetidas de 610 aminoácidos ligadas por uma região de aproximadamente 60 aminoácidos[18]. Cada série possui seis domínios hidrofóbicos e um domínio hidrofílico de ligação nucleotídica. Estes seis segmentos hidrofóbicos são os responsáveis por formar o caminho através do qual as soluções atravessam a membrana (formam um canal de cerca de 5 nm de diâmetro) e, deste modo, têm um papel activo na especificidade do substrato. Cada domínio hidrofóbico é seguido de um domínio hidrofílico que contém um local de ligação ao nucleótido situado na face citoplasmática da membrana e, que é o responsável pela ligação e hidrólise do ATP necessário ao processo de transporte[19–21]. Sabe-se ainda que a Pgp tem a forma aproximada de um cilindro de 10 nm de diâmetro, com metade da molécula situada na bicamada lipídica das membranas celulares e a restante metade em cima e em baixo da membrana, tal como ilustra a Figura 1.4.[19].

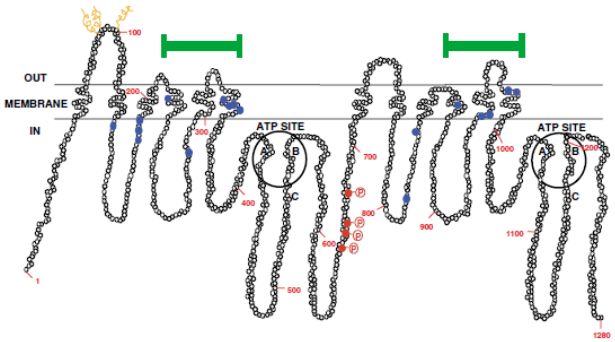


Figura 1.4. – Modelo da estrutura da glicoproteína-P[21].

A Pgp é naturalmente expressa em tecidos humanos normais, tais como, na superfície apical de células epiteliais do rim, no fígado, no tracto gastrointestinal, nas células endoteliais do cérebro e nos testículos, nas glândulas supra-renais, nas células estaminais da medula espinal e nos linfócitos do sangue periférico. A função fisiológica da Pgp é deduzida a partir da distribuição nos tecidos, indicando um papel na eliminação renal e hepática de toxinas e metabolitos das toxinas, na protecção da barreira hematoencefálica e barreira hematotesticular e no transporte de algumas citoquinas[20]. Um papel no transporte de esteróides em úteros de mulheres grávidas é ainda sugerido. Recentemente tem-se mostrado que possui um papel no transporte de cortisol, aldosterona e dexametasona. Está localizada na superfície do lúmen da mucosa intestinal contribuindo para a eliminação de certos fármacos via intestinal e, deste modo, consegue limitar a sua biodisponibilidade após administração oral[20].

Em muitos cancros a sobreexpressão de Pgp (ou a sobreexpressão do gene MDR1) é frequentemente encontrada no diagnóstico da malignidade. Usualmente está associada com o tipo de células do qual o tumor surge, ou seja, este aparecimento está intrinsecamente relacionado com as células que deram origem ao tumor. Os carcinomas do cólon, do rim, os hepatomas, os tumores das supra-renais, entre outros, demonstraram alta expressão do gene MDR1. Tais tumores estão intimamente associados a quimiorresistência, como é o caso do CHC. A investigação do padrão de diferenciação das células de certos tumores mostra que alguns casos de sobreexpressão de MDR podem estar correlacionados com a proliferação de células de um

certo tipo de diferenciação (em que a sobreexpressão de Pgp é bastante evidente), embora esses tipos de tumores sejam normalmente originários de células com uma baixa expressão desta proteína. Por outras palavras, o que acontece, nestes casos, é que as células adquirem resistência, pois adquirem uma grande expressão de Pgp, o que faz com que, em muitos casos, a Pgp seja um marcador para um certo tipo de diferenciação celular[22]. O aumento do número de casos de sobreexpressão de Pgp após tratamento do cancro é frequentemente usado em favor do papel que a MDR tem para o insucesso dos tratamentos. Resultados a partir de outros estudos com cancros do pulmão, mama, ovários e sarcomas mostraram a importância da consequência da resistência por parte da Pgp. A título de exemplo, Pgp positiva foi revelada em 30-50% dos casos de leucemia mielóide aguda e foi quase sempre encontrada sobreexpressa após os tratamentos de quimioterapia. O mieloma múltiplo é também um bom exemplo da influência da Pgp na quimiorresistência: durante o diagnóstico cerca de 6% dos casos apresentavam sobreexpressão desta proteína, enquanto, após o tratamento (especialmente com vincristina, doxorrubicina e dexametasona) 85% dos doentes apresentou resistência ao tratamento e as células tumorais sobreexpressavam Pgp[22].

A Pgp possui um vasto número de substratos que são importantes agentes anticancerígenos, entre eles temos a classe das antraciclinas (doxorrubicina, daunorrubicina e epirrubicina), a classe dos alcalóides da vinca (vinblastina, vincristina), a classe dos taxanos (paclitaxel, docetaxel), a classe dos epipodofilotoxinas (etopósido, tenipósido), o topotecano, actinomicinas (actinomicina D), agentes alquilantes (mitomicina C), péptidos (valinomicina, gramicidina) e agentes antigotosos (colchicina)[23]. É fosforilada pela proteína cinase C (PKC) e, deste modo, bloqueadores desta cinase fazem aumentar a acumulação de fármaco na célula pois reduzem a fosforilação do transportador. Estas observações sugerem que a fosforilação da Pgp estimula o transporte de substâncias. No entanto, sabe-se que os inibidores da PKC interagem directamente com a Pgp e inibem o transporte da droga através de um mecanismo independente da fosforilação da Pgp[19].

O significado clínico da Pgp chamou a atenção de muitos investigadores e companhias farmacêuticas para encontrar formas de inibição deste transportador e consequente reversão da quimiorresistência. Diversos tipos de compostos foram encontrados e formulados para reverter a acção da Pgp na quimiorresistência. Entre esses compostos encontramos bloqueadores de canais de cálcio (verapamil, nifedipina), fármacos hipotensivos (reserpina), antibióticos (cefalosporinas, gramicidina, puromicina), imunossupressores (ciclosporina A e seus derivados) e muitos outros compostos lipofílicos. Alguns destes compostos, como por exemplo o verapamil, inibem a Pgp de forma competitiva, isto é, lutam em simultâneo com os substratos pela ligação e transporte. Apesar de tudo isto, estas substâncias não têm tido muito sucesso clínico, provavelmente devido ao facto de que a resistência multifármacos no organismo não se deve somente à Pgp, mas também a outros transportadores[22].

1.2.1.2. Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1)

A família das proteínas MRP surgiu no ano de 1992 quando Susan Cole e Roger Deeley descobriram o gene da proteína associada à resistência multifármacos, hoje conhecida como MRP1[24]. Esta proteína é codificada pelo gene ABCC1/MRP1, ou seja, pertence à subfamília dos transportadores ABC. O seu peso molecular é de 190 kDa e é constituída por 1531 aminoácidos com N-ligações de glicosilação, como está representado na Figura 1.5. Localiza-se predominantemente nas membranas basolaterais das células epiteliais da maioria dos tecidos, sendo que também se detecta nas membranas de compartimentos intracelulares, em algumas células. Enquanto a Pgp transporta moléculas neutras ou carregadas positivamente, a sobreexpressão de MRP1 está associada com um aumento do transporte activo (dependente de ATP) de moléculas conjugadas com glutatião (GSH), que são moléculas carregadas negativamente. Temos portanto, que as proteínas MRP1 estão aptas a transportar um vasto leque de substratos, tais como os conjugados com GSH, glucuronato e sulfato para fora das células[19,22,25]. Existe ainda uma outra classe de moléculas transportadas pela MRP1, a classe do metotraxato. O MTX, um

monoglutamato, é substrato para a MRP1 contribuindo também para o fenótipo de resistência conferido pela MRP1[26].

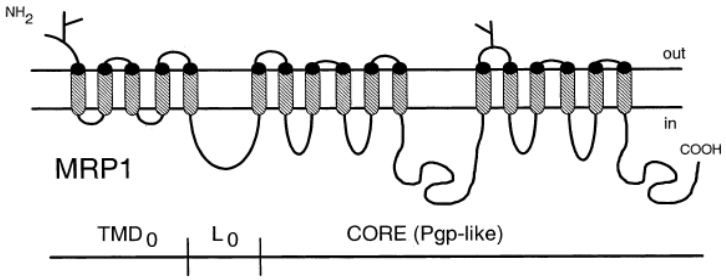


Figura 1.5. – Topologia do modelo para MRP1[24].

As classes de fármacos anticancerígenos que constituem substrato para a MRP1 incluem as antraciclinas tais como a doxorrubicina e a daunorrubicina, os alcalóides da vinca e o etoposido. Bombeando estes fármacos para fora das células tumorais, a MRP1 reduz a sua concentração intracelular induzindo resistência ao tratamento. Deste modo, a MRP1 confere MDR de forma semelhante à Pgp, apresentando uma cinética de transporte similar. Experiências recentes provam que a resistência celular a certos fármacos mediados por MRP1 requer GSH intracelular, sugerindo esta molécula como um activador ou substrato de co-transporte. À semelhança da Pgp e outros transportadores ABC, a hidrólise de ATP fornece a energia necessária ao transporte através da MRP1[24,27].

1.2.2. Lung Resistance Protein (LRP)

Nos subcapítulos anteriores foi referido o papel essencial das proteínas transportadoras da superfamília ABC na resistência multifármacos. No entanto, apesar destes serem os transportadores mais estudados e dos quais se tem o maior conhecimento, existe uma outra classe de proteínas, as proteínas *Vault*, que têm também um papel activo na resistência a fármacos anticancerígenos. As *Vaults* são complexos ribonucleoproteicos compostos por diferentes proteínas e que têm sido identificados em inúmeros tecidos no organismo. A maioria

das proteínas *Vault* está presente no citoplasma das células (proteínas intracelulares), mas uma pequena porção encontra-se na membrana e no complexo do poro nuclear[12,28].

Em 1993 foi descoberta a proteína LRP, que é designada como a proteína *major* da família das proteínas *Vault* (conhecida também por MVP (*major vault protein*)), numa linha celular de cancro do pulmão, que não expressava Pgp. Tem um peso molecular de 110 kDa, e ao contrário da Pgp e da MRP1 foi encontrada no citoplasma e não na membrana celular. O gene humano da LRP está localizado no curto braço do cromossoma 16. Esta proteína é fundamentalmente expressa pelas células epiteliais e pelas células de tecidos exposto a substâncias tóxicas. O transporte por este tipo de proteínas ainda não está bem estabelecido, mas sugere-se que tenham uma participação no transporte de substratos do núcleo para o citoplasma, estando normalmente associada a vesículas e a lisossomas. Tal facto permite perceber a sua função no transporte e sequestração de fármacos para dentro de vesículas. Após isto, é provável que os fármacos sejam expelidos das células por exocitose[14,22].

Ainda pouco se sabe acerca do papel desta proteína na MDR porque a LRP é frequentemente expressa concomitantemente com outras proteínas MDR, tal como a MRP1 e a BCRP, e também porque tem uma estrutura bastante complexa[28].

Entre os principais substratos para a LRP/MVP encontram-se a doxorrubicina, a mitoxantrona, o etoposido, a vincristina, a citarabina, o metotrexato e a cisplatina. Como se pode ver, alguns substratos são coincidentes com as outras proteínas MDR já aqui referidas, no entanto outros afastam-se do fenótipo clássico de MDR[29].

1.3. Proteína p53

A proteína p53 é uma fosfoproteína citoplasmática constituída por 393 aminoácidos e com 53 kDa de peso molecular. É codificada por um gene localizado no curto braço do cromossoma 17, na posição 17p13.1. O gene da p53 possui 11 exões, dos quais o primeiro é não

codificado[30]. Sobre diferentes condições celulares tal como danos no DNA, dá-se a activação da transcrição da p53. Esta proteína tem inúmeras funções biológicas envolvendo o ciclo celular, a replicação e a reparação de danos no DNA, a proliferação, a apoptose, a inibição da angiogénese e a resposta ao stresse celular. Devido a muitas destas funções, esta proteína é muitas vezes denominada a guardiã do genoma humano, sendo que em condições extremas pode assumir um papel pejorativo para o organismo[31].

Uma das principais funções da p53 é actuar na regulação do ciclo celular, mais precisamente induzindo a paragem do ciclo na fase G1. Esta paragem reversível é benéfica para a integração das células, pois permite a possibilidade de reparação do DNA (ou eventualmente, a indução de apoptose) quando este sofreu, por exemplo, acção mutagénica química, contribuindo, deste modo, para a estabilidade do genoma. A p53 actua de forma directa ou, de forma indirecta, agindo como um activador transcricional de diversos genes que vão desempenhar diferentes funções na célula. Ela liga-se a uma sequência específica do DNA levando à activação destes outros genes, tal como o gene da proteína p21 que vai inibir o crescimento de uma variedade de células, tais como células tumorais. Isto ocorre provavelmente devido ao facto da p21 inibir a actuação das cinases dependentes de ciclinas, que são requeridas para completar o ciclo celular. Para além do gene da proteína p21, outros genes são alvo da p53, tais como a ciclina G e o 14-3-3 σ[31].

Na inibição da p53 tem papel o produto do gene Mdm2, que ao interagir com a p53 inibe a sua função como activador transcricional, pois a Mdm2 promove a rápida degradação da forma fosforilada da p53. Por outro lado, a p53 activa também a expressão do gene Mdm2 no seu percurso de feedback auto-regulatório. A Mdm2 está amplificada em 30/40% de sarcoma humanos, o que indica que a inibição da p53 pela sobreexpressão da Mdm2 tem um papel crucial no desenvolvimento de inúmeros sarcomas[31].

A p53 tem um papel essencial na activação das vias de sinalização que levam à apoptose celular. Um largo número de genes alvo da p53 está envolvido nestas vias. Entre eles temos o

factor de promoção de apoptose *bax* que, sob condições normais e, em conjunto com a *Bcl-2,* forma heterodímeros mexendo com a homeostasia do organismo. A p53 induz a expressão da *bax* (proteína pró-apoptótica) e altera o balanço entre as proteínas pró e anti-apoptóticas activando a via intrínseca de apoptose. Temos ainda uma outra via de apoptose dependente da p53: a via de activação do ligando CD95 que, normalmente é expresso na superfície das células tumorais[30]. A Figura 1.6. apresenta um esquema das diferentes vias que envolvem a proteína p53.

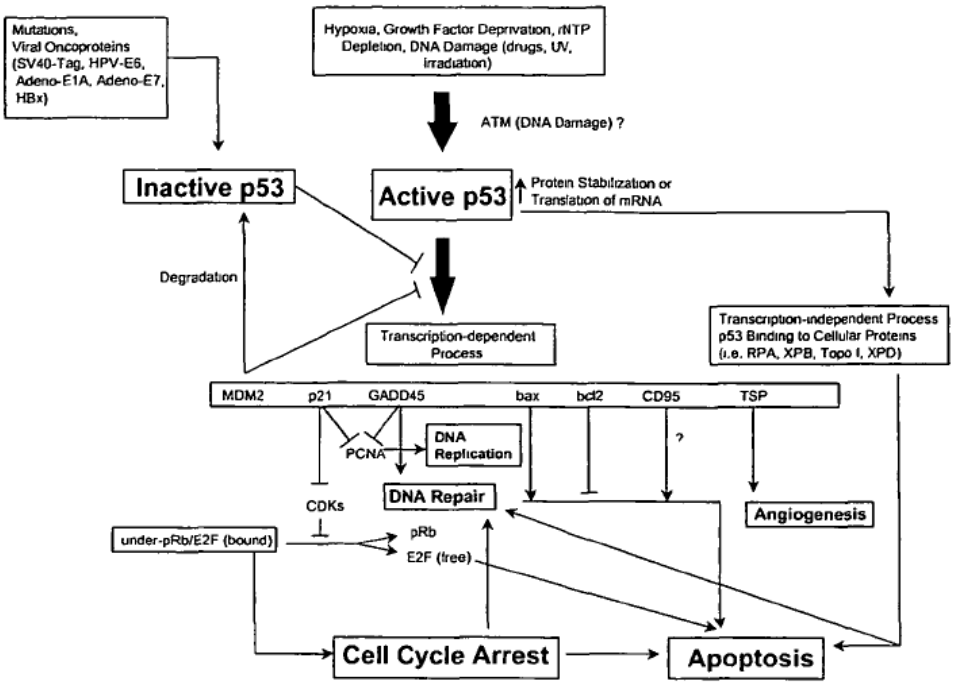


Figura 1.6. – Esquema dos diferentes mecanismos de actuação e activação da p53[30].

O gene TP53 (denominado gene supressor tumoral) está mutado em grande parte dos cancros humanos; cerca de 50% dos cancros humanos possuem mutações na p53. Na última década, os diferentes contributos da p53 nos cancros têm sido intensivamente investigados[32]. Como já foi referido, em capítulos anteriores, a resistência multifármacos é um problema no tratamento do CHC, e é mediada por diversos mecanismos nos quais a expressão da p53 está incluída. Sabe-se que as células que apresentam formas mutadas da p53 têm uma vida mais longa que as que apresentam formas normais, e que a actuação de agentes inibidores desta proteína influencia os efeitos anti-tumorais das drogas anticancerígenas[33]. No seguimento disto, sabe-se

ainda que a resistência à quimioterapia devido à sobreexpressão de Pgp é também consequência de mutações na p53, pois a p53 tem um papel na manutenção dos níveis da Pgp, resultando num efluxo de compostos citotóxicos para o exterior das células, o que, no caso da quimioterapia, não é nada vantajoso[30].

1.4. Glicólise, ^{18}F-FDG e MDR

A alteração mais conhecida do metabolismo das células cancerígenas é o aumento da glicólise. Este processo metabólico é, nos dias de hoje, quantitativamente avaliado através de uma técnica de imagiologia médica não-invasiva, a tomografia por emissão de positrões (PET – do inglês *Positron Emission Tomography*), recorrendo ao análogo radiomarcado da glicose, a ^{18}F-FDG (2-desoxi-2-(^{18}F)fluoro-D-glicose).

1.4.1. Glicólise e ^{18}F-FDG

A palavra glicólise vem do grego *glykys*, que significa doce, e *lysis* que significa divisão. A glicólise é, portanto, a transformação e divisão da glicose. A glicose é a molécula energética por excelência para a maioria dos organismos, ocupando uma posição central no metabolismo. A glicólise constitui uma sequência de reacções enzimáticas que ocorrem no citoplasma das células, através das quais a molécula de glicose, com seis carbonos, é transformada e clivada, originando duas moléculas de piruvato, com três carbonos, e duas moléculas de ATP. Na glicólise encontram-se envolvidas directamente cerca de uma dezena de enzimas, catalisando reacções de fosforilação e desfosforilação, isomerização, clivagem aldólica, oxidação-redução e desidratação. Em algumas destas reacções a energia de *Gibbs* libertada é armazenada quimicamente na molécula de ATP. O piruvato produzido na via glicolítica pode ser catabolizado aerobiamente no sistema ou complexo piruvato desidrogenase e no ciclo do ácido cítrico, produzindo moléculas transportadoras de electrões, o NADH + H^+ e o $FADH_2$, as quais permitem a produção de grandes quantidades de ATP

ao nível da cadeia de transporte de electrões e fosforilação oxidativa. Desta forma a glicose é oxidada produzindo-se CO_2 e H_2O. A glicólise também pode dar-se num ambiente anaeróbio (ausência de oxigénio) onde o piruvato pode ser convertido em outras moléculas mais reduzidas como o lactato e o etanol[34].

A glicose entra nas células através dos denominados transportadores de glicose (GLUTs), sendo posteriormente fosforilada num processo catalisado pela hexoquinase II, resultando na molécula de glicose-6-fosfato que tem um papel activo em diferentes vias metabólicas. Esta molécula tem a capacidade de inibir a hexoquinase II de uma forma alostérica, daí que a captação de glicose pelas células seja dependente da taxa de glicose-6-fosfato metabolizada. A enzima glicose-6-fosfato isomerase converte a glicose-6-fosfato em frutose-6-fosfato, enquanto a enzima fosfofrutocinase-1 catalisa a transformação da frutose-6-fosfato em 1,6-frutose bisfosfato. Esta última é considerada a primeira enzima chave na regulação da glicólise, pois é a responsável pelo passo que compromete a entrada da glicose na via glicolítica. Depois desta etapa seguem-se mais sete outras etapas até à formação do piruvato[34].

Nas células tumorais o processo metabólico da glicólise encontra-se alterado, uma vez que estas possuem um aumento extraordinário de consumo de glicose comparando com as células normais. O aumento da captação de glicose nos tumores está normalmente associado com um aumento dos transportadores e pelo aumento de certas enzimas intracelulares, tais como a hexoquinase II, a fosfofrutocinase e certas isomerases, que promovem a glicólise. A Figura 1.7. representa um esquema do processo do metabolismo de glicose nas células[35].

Quando se fala de metabolismo das células cancerígenas não se pode deixar de falar de Otto Warburg, pioneiro no estudo da respiração celular. Na década de 1920, Warburg descobriu que, mesmo na presença de oxigénio suficiente, as células tumorais preferem metabolizar a glicose pela glicólise (formando-se lactato) em detrimento da fosforilação oxidativa, apesar da glicólise ser uma via muito menos eficiente em termos de produção de ATP (produzindo-se duas moléculas de ATP, enquanto com a fosforilação oxidativa se produzem 36 moléculas). Esta

mudança exige, portanto, que as células tumorais necessitem de captar uma quantidade anormalmente elevada de glicose, de forma a satisfazer o aumento de energia e de biossíntese. Este fenómeno é conhecido por Efeito de Warburg e tem sido demonstrado, desde então, em diferentes tipos de tumores. O aumento na captação de glicose tem sido explorado clinicamente através de técnicas de imagiologia específicas. Embora a glicólise aeróbia seja aceite como uma marca metabólica para o cancro, a sua relação com a progressão tumoral ainda é incerta[36].

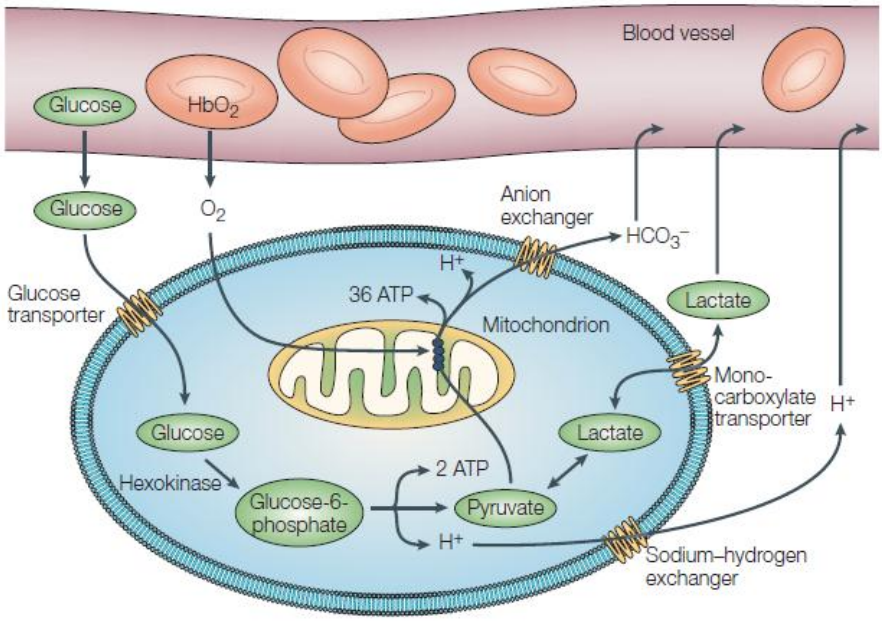


Figura 1.7. – Metabolismo da glicose em células de mamíferos[35].

A técnica de imagiologia PET usando ^{18}F-FDG é de longe a mais usada para estudar o metabolismo da glicose das células cancerígenas *in vivo*. O ^{18}F-FDG é um análogo radiomarcado da glicose, em que o isótopo radiactivo emissor de positrões ^{18}F substitui o grupo hidroxilo na posição C2 na molécula de glicose. Tal como a glicose, o ^{18}F-FDG é transportado através da membrana celular pelos transportadores da glicose, principalmente através do GLUT1 e do GLUT3. Ao contrário da glicose, o ^{18}F-FDG não é substrato para estes transportadores existentes nos túbulos renais, pelo que, não é aí reabsorvida depois da filtração glomerular, sendo excretada pela urina. Isto contribui para uma libertação rápida através da corrente sanguínea, facto muito importante para obter imagens dos tecidos metabolicamente activos[37].

Em termos intracelulares, o ^{18}F-FDG é fosforilado pela hexoquinase II a ^{18}F-FDG-6 fosfato, num processo semelhante ao que acontece com a glicose. No entanto, ao contrário da glicose, o ^{18}F-FDG-6 fosfato não é metabolizado na via glicolítica, o que se deve ao átomo de flúor que se encontra na posição C2, que evita a sua degradação. Além disso, as células tumorais geralmente demonstram uma actividade muito baixa de enzima glicose-6-fosfatase, que catalisa a desfosforilação da glicose-6-fosfato e do ^{18}F-FDG-6 fosfato. Como a membrana celular é impermeável ao ^{18}F-FDG fosforilado, o ^{18}F-FDG-6 fosfato acumula-se no interior das células metabolicamente activas[37]. A Figura 1.8. representa um esquema resumido do processo metabólico sofrido pela glicose e pelo ^{18}F-FDG.

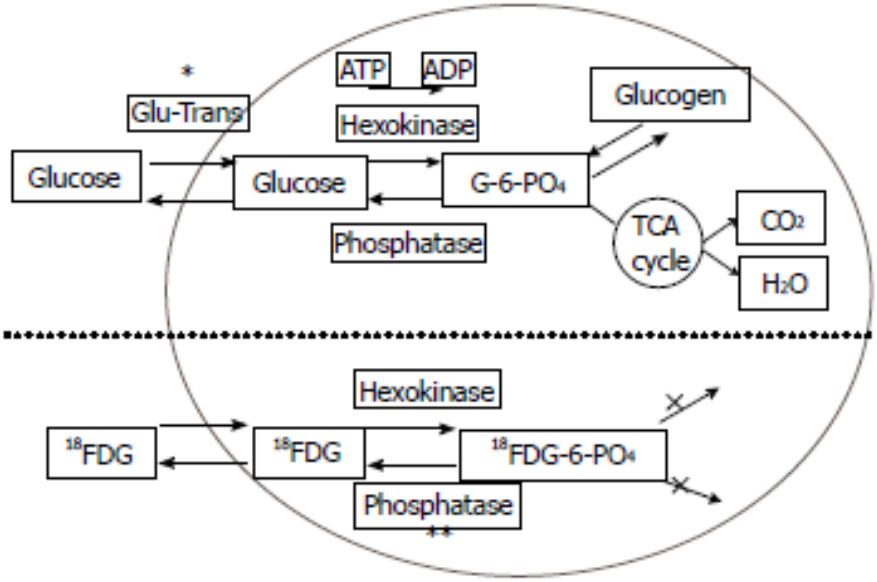


Figura 1.8. – Esquema da via metabólica da glicose e do ^{18}F-FDG[38].

1.4.2. Quimiorresistência e ^{18}F-FDG

No subcapítulo 1.2. foram abordados os mecanismos que levam determinados tumores, entre os quais o CHC, a serem quimiorresistentes. Esses mecanismos estão relacionados, por exemplo, com a sobreexpressão de proteínas transportadoras (bombas de efluxo) que extrusam os fármacos anticancerígenos das células. Neste subcapítulo vamos abordar estudos recentes que indicam que essas bombas de efluxo estão intimamente ligadas com a quantidade de ^{18}F-FDG acumulado dentro das células.

Estudos realizados em CHC mostraram que este tipo de tumor possui uma taxa elevada de MDR, e que isso está associado com uma sobreexpressão da Pgp. Esses estudos revelaram ainda que a captação de ^{18}F-FDG pelas células está inversamente correlacionada com os níveis de Pgp, na medida em que, quando existem tumores com elevada expressão de Pgp verifica-se uma redução da concentração de ^{18}F-FDG, comparado com tumores que não sobreexpressam Pgp. Tais factos revelam que a Pgp actua como uma bomba de efluxo para o ^{18}F-FDG, ou seja, o ^{18}F-FDG é substrato para a Pgp, diminuindo a sua presença em células de CHC[39,40].

A relação da expressão das proteínas MDR com a captação de ^{18}F-FDG e com a expressão da proteína p53 foi verificada em outros estudos realizados. A partir desses estudos, prova-se que a perda de p53 está relacionada com um aumento das taxas de utilização da glicose pelas células. Correlações directas entre a expressão de p53 mutado e incorporação de ^{18}F-FDG foram observadas em estudos de cancro colo-rectal e mama, pulmão, colo do útero e sarcomas. Em alguns casos de CHC observou-se que elevadas taxas de captação de ^{18}F-FDG estão associadas a mutações ou deleções da p53. Estão também descritas correlações entre a expressão da enzima hexoquinase II e a expressão de p53[35,41,42].

II. Objectivos

A resistência multifármacos (MDR) representa um enorme entrave ao sucesso dos tratamentos de quimioterapia. O CHC tem-se demonstrado um tumor altamente quimiorresistente, o que se deve em grande parte a este facto. Como tal, encontrar explicações e possíveis soluções para este problema constitui uma abordagem de extrema importância para a investigação na área da oncologia, e em especial do CHC.

Este trabalho teve como objectivo principal verificar a utilidade do radiofármaco ^{18}F-FDG no estudo da resistência multifármacos em CHC. Para tal, pretende-se correlacionar a expressão de três proteínas associadas à MDR com o perfil de captação e retenção deste radiofármaco em três linhas celulares humanas de CHC, que diferem na expressão da proteína p53.

Um outro objectivo consiste na realização de estudos de captação e retenção com o radiofármaco ^{99m}Tc-MIBI, visto que este radiotraçador é substrato para a Pgp, de modo a comparar estes estudos com a expressão dos transportadores. Para além disso pretende-se avaliar se o ^{18}F-FDG constitui um radiotraçador tão bom quanto o ^{99m}Tc-MIBI para avaliar o aparecimento de MDR nestas linhas celulares.

Atingindo todos estes objectivos iniciais, pretende-se estudar a acção da modulação das proteínas associadas à MDR nas linhas celulares em estudo, avaliando-se o efeito do verapamil, inibidor da Pgp, na proliferação celular das células de CHC, e na retenção de ^{18}F-FDG.

III. Material e Métodos

Como já foi referido, o carcinoma hepatocelular é um cancro altamente quimiorresistente. Tal facto deve-se, em parte, a uma elevada sobreexpressão das proteínas transportadoras associadas a MDR que actuam como bombas de efluxo expelindo os agentes quimioterapêuticos do interior das células. O método mais comum para avaliar a função destas proteínas dentro das células envolve o estudo da captação e da retenção de substratos radiomarcados, tais como o ^{99m}Tc-MIBI[43].

Posto isto, propôs-se a realização de estudos *in vitro* para avaliar a captação e a retenção destes dois radiofármacos, a expressão de três proteínas associadas a MDR (Pgp, MRP1 e LRP), a expressão dos transportadores de glicose 1 e 3 (GLUT1 e GLUT3) e avaliar a proliferação celular das células quando sujeitas a um inibidor de uma destas proteínas, a Pgp, em três linhas celulares humanas de CHC que diferem entre si na expressão da proteína p53.

É importante referir que todo o material de manipulação de culturas celulares foi devida e previamente esterilizado. Da mesma forma, todos os procedimentos foram efectuados nas condições de esterilização e assepsia necessárias.

3.1. Culturas Celulares

A cultura de células é um processo complexo de cultivo e crescimento de células, retiradas de um tecido original, de uma cultura primária ou de uma linha celular, fora do seu ambiente natural. Para a sua manutenção é necessário assegurar condições rigorosas e controladas de assepsia, bem como condições ambientais propícias, tais como pH, temperatura e concentrações de CO_2 e O_2, meios de cultura apropriados e substratos adequados.

Ao longo deste trabalho experimental utilizaram-se três linhas celulares humanas de CHC designadas HepG2, Hep3B2.1-7 e HuH7. As linhas celulares HepG2 e Hep3B2.1-7 foram obtidas na *American Type Culture Collection* (ATCC) e a HuH7 na *Japanese Collection of Research Bioresources* (JCRB). A linha celular HepG2 (*Homo sapiens*) é uma linha de células epiteliais

isoladas do fígado humano de um doente do sexo masculino de 15 anos de idade, de etnia caucasiana que expressa normalmente o gene supressor tumoral TP53[44].

A linha celular Hep3B2.1-7 (*Homo sapiens*) é uma linha de células epiteliais isoladas do fígado humano de um doente do sexo masculino de 8 anos de idade. Esta linha celular contém o genoma do vírus da hepatite B integrado e expressa o gene supressor tumoral TP53[45].

A linha celular HuH7 (*Homo sapiens*) é uma linha de células epiteliais isoladas do fígado humano de um doente do sexo masculino de 57 anos de idade. Este tipo de células expressa uma forma mutada do gene supressor tumoral TP53[46].

Após a recepção, as linhas celulares foram descongeladas e propagadas em cultura aderente de acordo com as recomendações do fornecedor. Assim, para todos os estudos, as linhas celulares foram mantidas em incubadora *Binder* a 37˚C numa atmosfera humidificada com 95% de O_2 e 5% de CO_2. Utilizou-se o meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, Sigma D-5648) suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS, do inglês *Fetal Bovine Serum*) (Gibco 2010-09), 100 µM de piruvato de sódio (Gibco – 11360), e 1% de antibiótico (100 U/ml de penicilina e 10 µg/ml estreptomicina; GIBCO 15140-122).

Para a realização dos estudos *in vitro* foi necessário destacar as células dos frascos e preparar suspensões celulares. Para isso, as culturas celulares foram incubadas com 2 ml de uma solução tripsina-EDTA a 0,25% (Gibco 25200) durante cinco minutos a 37˚C**,** para que ocorra a separação celular. De seguida, para inactivar a tripsina, adicionaram-se 5 ml de meio de cultura e procedeu-se à contagem de uma alíquota da suspensão celular corada com azul de tripano (Sigma T0776; diluição 1:20 em água ultra-pura), em câmara de *neubauer*, num microscópio com ampliação de 100 vezes. Após a contagem, centrifugou-se a suspensão celular a 200 G durante cinco minutos (centrífuga Heraeus Multifuge 1L-R; raio do rotor 18,7 cm) e ressuspenderam-se os *pellets* num volume conhecido de meio de cultura, de modo a obter a concentração pretendida para os estudos que se desejava realizar.

3.2. Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica utilizada para contar, examinar e classificar células ou outras partículas biológicas microscópicas em suspensão. Este método permite analisar simultaneamente, e num curto período de tempo, múltiplas características físicas e químicas de células suspensas em meio líquido através de um aparelho de detecção óptico-electrónico. Neste aparelho, um feixe de luz de um único comprimento de onda é direccionado para um meio líquido em fluxo. Vários detectores são apontados ao local onde o fluxo passa através do feixe de luz: um na linha do feixe de luz (forward scatter, FCS) e vários perpendiculares a este (side scatter, SSC), além de um ou mais detectores fluorescentes. Cada partícula suspensa, que passa através do feixe, dispersa a luz de uma forma específica e os corantes químicos fluorescentes encontrados na partícula ou a ela ligados podem ser excitados emitindo luz de menor frequência (ou maior comprimento de onda) do que o da fonte de luz[47]. Esta combinação de luz dispersa e fluorescente é melhorada pelos detectores e, por análise das flutuações de brilho de cada detector (uma para cada pico de emissão fluorescente), é possível explorar vários tipos de informação sobre a estrutura física e química de cada partícula individual. A FSC correlaciona-se com o volume celular e a SSC depende da complexidade interna da partícula (por exemplo a forma do núcleo, a quantidade e tipo dos grânulos citoplasmáticos e a rugosidade da membrana).

Neste trabalho esta técnica foi utilizada para: a) determinação da expressão membranar de Pgp; b) determinação da expressão membranar de MRP1; c) determinação da expressão citoplasmática de LRP; d) determinação da expressão membranar e citoplasmática de GLUT1; e) determinação da expressão membranar e citoplasmática de GLUT3. A preparação das células para a determinação da expressão das proteínas Pgp, MRP1, LRP, GLUT1 e GLUT3 inclui a desagregação das células dos frascos com uma solução de Tripsina-EDTA a 0,25% e, posteriormente, repouso numa incubadora a 37˚C, 5% de CO_2 e 95% de O_2 de modo a recuperarem do stresse induzido pela acção da tripsina. De seguida colocaram-se 10^6 de células em cada um dos tubos de citometria.

Para as diferentes marcações, o número de eventos analisados, que neste caso corresponde ao número de células, foi de 10^4. Para a análise e quantificação da informação, utilizou-se *software* específico (CellQuest™) (Becton Dickinson) que está instalado em computador dedicado (Paint-a-Gate 3.02, Machintosh Software) (Becton Dickinson).

3.2.1. Avaliação da Expressão Membranar de Pgp, MRP1, GLUT1 e GLUT3

Para avaliar a expressão membranar das proteínas Pgp, MRP1, GLUT1 e GLUT3 aproximadamente 10^6 células HepG2, HuH7 e Hep3B2.1-7 foram lavadas por centrifugação com tampão fosfato salino (PBS) durante 5 minutos a 200 G. Posteriormente decantou-se o sobrenadante e as células foram marcadas com 10 µl de anticorpo anti-Pgp (isotiocianato de fluoresceína (FITC) *mouse anti-human* glicoproteína-P, BD Pharmingen) ou anti-MRP1 (FITC *mouse anti-human* MRP1, BD Pharmingen) ou anticorpo monoclonal anti-hGLUT-1-PE (R&D Systems; MAB1349) ou com anticorpo monoclonal anti-hGLUT-3 (R&D Systems; MAB1415) durante 15 minutos à temperatura ambiente e na ausência de luz. Após incubação, as células marcadas foram lavadas com 2 ml de PBS por centrifugação a 1300 G durante 5 minutos e ressuspensas em 400 µl do mesmo tampão. No caso do GLUT3 foi necessário utilizar anticorpos secundários. Assim, adicionalmente, após a segunda centrifugação, o *pellet* foi marcado com 2 µl de anticorpo secundário conjugado com o fluorocromo PE (ficoeritrina) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.; sc-3738) durante 20 minutos à temperatura ambiente e na ausência de luz. Após incubação, as células foram lavadas com 2 ml de PBS por centrifugação a 1300 G durante 5 minutos e ressuspensas em 400 µl do mesmo tampão. Estas células foram guardadas a 4˚C até aquisição no citómetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA), equipado com um laser de árgon de 15 nW e, os resultados obtidos foram expressos em termos da média de intensidades de fluorescência (MIF).

3.2.2. Avaliação da Expressão Total de LRP, GLUT1 e GLUT3

Para avaliar a expressão total da proteína LRP aproximadamente 10^6 células HepG2, HuH7 e Hep3B2.1-7 foram lavadas com PBS durante 5 minutos a 200 G. Posteriormente decantou-se o sobrenadante após centrifugação e adicionaram-se 100 µl de solução A (*Intracell Kit*, Immunostep). Seguidamente homogeneizou-se e incubou-se durante 15 minutos à temperatura ambiente e na ausência de luz. Após incubação, as células marcadas foram lavadas com 2 ml de PBS por centrifugação a 1300 G durante 5 minutos. De seguida decantou-se o sobrenadante, adicionaram-se 100 µl da solução B (*Intracell Kit*, Immunostep) e 10 µl de anticorpo anti-LRP (*mouse anti-human* LRP, Santa Cruz biotechnology, Inc) ou anticorpo monoclonal anti-hGLUT-1-PE (R&D Systems; MAB1349) ou com anticorpo monoclonal anti-hGLUT-3 (R&D Systems; MAB1415), e incubou-se, novamente, durante 15 minutos no escuro, à temperatura ambiente. Após isto, adicionaram-se 2 ml de PBS, centrifugou-se a 1300 G durante 5 minutos e decantou-se o sobrenadante. No caso de ser necessária a incubação com anticorpo secundário como no caso do GLUT3 e LRP, após a terceira centrifugação, foi necessário marcar o *pellet* com 2 µl de anticorpo secundário (Santa Cruz Biotechnology, Inc.; sc-3738) ou (*goat anti-mouse* lgG-PE, Santa Cruz biotechnology) e incubar-se 20 minutos no escuro e à temperatura ambiente. Após este tempo, adicionaram-se 2 ml de PBS e centrifugou-se durante 5 minutos a 200 G, decantou-se o sobrenadante e a adicionaram-se mais 400 µl de PBS. Estas células foram guardadas a 4˚C até aquisição no citómetro de fluxo e os resultados obtidos foram expressos em termos da média de intensidades de fluorescência (MIF).

3.3. Estudos de Captação e Retenção

As proteínas transportadoras responsáveis pela resistência aos agentes quimioterapêuticos actuam como bombas de efluxo expelindo os mesmos das células. O método mais comum para quantificar a função deste tipo de proteínas envolve o uso de substratos

radiomarcados como o ^{99m}Tc-MIBI medindo a sua taxa de captação e retenção. Neste trabalho, para além do ^{99m}Tc-MIBI, utilizou-se também, o ^{18}F-FDG, uma vez que, como foi referido anteriormente, este tem vindo a ser apontado como um possível substrato para este tipo de proteínas[43].

Para os estudos de captação e retenção, preparou-se uma suspensão celular com $2x10^6$/ml células. As células foram colocadas a repousar em frascos de 25 cm^2, à temperatura de 37˚C, durante 60 minutos em incubadora calibrada para 95% O_2 e 5% CO_2, no sentido de recuperar do stresse causado pela acção enzimática da tripsina. Posteriormente adicionou-se à suspensão celular o radiofármaco em estudo (^{18}F-FDG ou ^{99m}Tc-MIBI) numa actividade de 25 µCi/ml. No caso dos estudos de influxo, aos 5, 30, 60, 90 e 120 minutos após a adição do radiofármaco, foram retiradas alíquotas de 200 µl da suspensão celular para tubos de *eppendorf* que continham PBS gelado, de modo a reduzir o metabolismo celular. De seguida, as amostras foram centrifugadas numa centrífuga a 5600 G (Costar, EUA) durante 60 segundos, para completa separação entre o *pellet* e o sobrenadante, tendo este sido colhido para um tubo previamente identificado. Seguiu-se uma lavagem do *pellet* com 500 µl de PBS gelado, repetindo-se o procedimento de separação do sobrenadante. Os sobrenadantes resultantes das centrifugações foram recolhidos para os tubos identificados e os *pellets* permaneceram nos respectivos tubos de *eppendorf* igualmente identificados. Cada um dos estudos foi realizado em duplicado.

No caso dos estudos de retenção incubaram-se as células com o radiofármaco em estudo numa actividade de 25 µCi/ml, durante 60 minutos, após os quais as células foram centrifugadas a 500 G durante cinco minutos, separando-se assim o *pellet* do sobrenandante. O meio foi retirado e substituído por um novo meio sem radiofármaco, seguindo-se o mesmo procedimento descrito anteriormente para os estudos de captação, para os tempos 1, 5, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos.

Após a colheita para a determinação da captação aos 120 minutos, recolheram-se 20 µl da suspensão celular, para a determinação da viabilidade celular, através do método de exclusão do azul de tripano.

Após as incubações das células com os dois radiofármacos e a colheita separada dos *pellets* e dos sobrenadantes, foi possível calcular a percentagem de captação de cada radiofármaco para cada tempo e condição referidas. Para isso, no final do procedimento, todas as fracções (*pellet*s e sobrenadantes) foram (em contagens por minuto) contadas no contador de poço (CAPINTEC CRC-15W) (no caso do ^{18}F-FDG) e no contador de poço (DPC Gamma C12) (no caso do ^{99m}Tc-MIBI), sendo então calculada a percentagem de captação ou retenção de cada radiofármaco para cada linha celular em estudo, utilizando a seguinte expressão:

$$\%\ \text{Captação (ou Retenção)} = \frac{\text{CPM}_{pellet}}{\text{CPM}_{pellet+sobrenadante}} \times 100 \qquad (1)$$

3.3.1. Determinação da Viabilidade Celular

A determinação da viabilidade celular foi realizada através do método de exclusão do azul de tripano. Este método baseia-se no facto do corante azul tripano entrar nas células que possuem a membrana celular destruída, o que traduz células não viáveis, corando-as de azul. Quando as células estão viáveis, o corante não consegue atravessar a membrana plasmática, e quando se observa ao microscópio estas surgem com um aspecto brilhante. Deste modo conseguimos distinguir entre células viáveis e não viáveis. A contagem das células realizou-se utilizando um hemocitómetro e um microscópio com ampliação de 100 vezes (Motic AE31). Após os estudos de captação e retenção, utilizando ^{18}F-FDG e ^{99m}Tc-Sestamibi, retirou-se uma amostra de 20 μl da suspensão celular, que foi colocada num tubo *eppendorf* que continha 20 μl de azul de tripano. De seguida, com auxílio de uma micropipeta, a suspensão foi homogeneizada e colocada no hemocitómetro para a contagem das células.

As células foram contadas nos quatro quadrantes dos cantos do hemocitómetro, como mostra a Figura 3.1. Na contagem, foram quantificadas as células que coraram de azul, a que correspondem células mortas e as células brilhantes, não coradas de azul, que traduzem as células

vivas. A percentagem de células viáveis foi determinada de acordo com a seguinte expressão:

$$\%\ \text{Viabilidade Celular} = \frac{\text{células vivas}}{\text{células vivas} + \text{células mortas}} \times 100 \qquad (2)$$

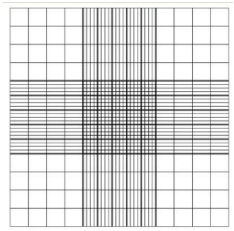


Figura 3.1. – Esquema representativo do hemocitómetro utilizado na determinação da viabilidade celular[48].

3.4. Avaliação da Proliferação Celular por Espectrofotometria

Para avaliar os efeitos do verapamil (Sigma V4629), um inibidor da Pgp[12], na proliferação das células HepG2, HuH7 e Hep3B2.1-7, foi realizado um teste colorimétrico denominado ensaio do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)2,5-difeniltetrazólio). O MTT é reduzido por células metabolicamente activas devido à acção das enzimas dehidrogenases, sendo que esta redução ocorre principalmente na mitocôndria através da acção da succinato desidrogenase, fazendo com que este método seja uma medida da função mitocondrial. Estas enzimas possuem a capacidade de clivar os anéis tetrazólio do MTT e formar cristais de formazano de cor azul escura que podem ser posteriormente solubilizados e quantificados por meios espectrofotométricos. Desta forma, a quantidade de cristais de formazano formados é directamente proporcional à quantidade de células viáveis. Para este estudo foi necessária uma suspensão celular com $5x10^4$ células/ml em meio de cultura distribuída por placas *multiwell* de 24 poços (SARSTEDT, EUA), contendo cada poço 500 µl da suspensão celular. Após 24 horas, as células foram incubadas com diferentes concentrações do composto, que variou entre 1 e 250 µM. Após 24, 48, 72 e 96 horas a

proliferação celular foi avaliada: o meio das culturas celulares foi retirado, adicionaram-se 500 µl de PBS a cada poço para lavagem e, posteriormente, 200 µl de uma solução de MTT (5 mg/ml; Sigma M2128) em PBS. Passadas 4 horas, acrescentaram-se 200µl de uma solução de isopropanol ácido (Sigma I9516), com 0,04 M de ácido clorídrico 37% fumante (Merck K24620717), e as células foram colocadas numa placa de agitação (DPC) durante alguns minutos, com o objectivo de homogeneizar o conteúdo de cada poço. O conteúdo de cada poço (200 µl) foi posteriormente transferido para uma placa de 96 poços e a absorvância foi quantificada a 570 nm com um filtro de referência de 620 nm, usando o espectrofotómetro ELISA (SLT-Spectra). Os resultados obtidos foram analisados e processados no programa OriginPro 8.0®.

3.5. Avaliação da Modulação das Proteínas MDR

Para avaliar o efeito da modulação das proteínas MDR foram realizados estudos de retenção com ^{18}F-FDG em duas linhas celulares humanas de CHC, a HepG2 e HuH7, na presença de verapamil, um inibidor da Pgp. Antes de se adicionar o radiofármaco à suspensão celular, as células foram incubadas durante 60 minutos com a concentração de 90 µM (para a linha HuH7 e HepG2) e 180 µM (para a linha HepG2) de verapamil. Estas concentrações foram escolhidas com base nos resultados obtidos através dos estudos de proliferação celular. De seguida realizou-se o procedimento já descrito anteriormente em 3.3. para os estudos de retenção.

3.6. Análise Estatística

Para aumentar o rigor da interpretação dos resultados obtidos através dos procedimentos anteriormente descritos, fez-se a análise estatística dos mesmos. Para tal, utilizou-se uma aplicação de tratamento estatístico de dados, o IBM SPSS® (*Statistical Package for Social Sciences*), versão 19.

Na análise descritiva foram determinadas medidas de tendência central (média e mediana) e de dispersão (desvio padrão e amplitude inter-quartil) para as variáveis quantitativas.

A normalidade da distribuição destas variáveis foi avaliada com recurso ao teste de Shapiro-Wilk. No caso de normalidade das distribuições subjacentes foram utilizados testes paramétricos para realizar comparações. No caso oposto foram utilizados testes não paramétricos. A comparação de variáveis quantitativas entre dois grupos foi realizada com recurso aos testes t-student (paramétrico) e de Mann-Whitney (não paramétrico). A comparação de variáveis quantitativas em mais de dois grupos foi obtida com recurso ao teste ANOVA de um factor, com análise *post-hoc* utilizando o teste de Tuckey (testes paramétricos) e ao teste de Kruskal-Wallis, com comparações múltiplas realizadas com recurso ao teste de Mann-Whitney com correção de Bonferroni.

Foi considerado um nível de significância de 5% (p=0,05).

IV. Resultados

Os métodos referidos no capítulo anterior foram utilizados com o intuito de verificar se o ^{18}F-FDG é um radiofármaco útil no estudo de MDR em CHC. Para esse efeito usaram-se metodologias de biologia molecular para correlacionar os resultados obtidos com as metodologias apoiadas na medicina nuclear.

Os resultados apresentados foram obtidos em co-autoria com a Mestre Ana Filipa Brito.

4.1. Citometria de Fluxo: Avaliação da Expressão de Pgp, MRP1, LRP, GLUT1 e GLUT3.

Para avaliar a expressão membranar e total dos GLUTs 1 e 3 e das proteínas MDR recorreu-se à técnica de citometria de fluxo. Os resultados obtidos são expressos em MIF (Média de Intensidade de Fluorescência).

Pode observar-se através da Figura 4.1. que a expressão membranar do GLUT1 é maior na linha celular HuH7, não existindo, no entanto, diferença estatística entre a expressão nesta linha celular e na linha celular HepG2 ($p=0,155$). A linha celular Hep3B2.1-7 é aquela que apresenta uma expressão inferior, embora a análise estatística não revele diferença entre esta linha celular e a linha celular HepG2 ($p=0,096$). Entre as linhas celulares HuH7 e Hep3B2.1-7, que apresentam a maior e menor expressão, respectivamente, existe diferenças estatisticamente significativas com uma significância de 0,002.

Ao analisar os níveis de expressão total de GLUT1 verifica-se que a linha celular que apresenta valores mais elevados é a linha celular HepG2, com diferença estatística relativamente às outras duas linhas celulares ($p<0,05$). A linha celular Hep3B2.1-7 é aquela que apresenta um valor inferior desta proteína. No entanto, não existe diferença estatisticamente significativa entre esta linha celular e a linha celular HuH7 ($p=1,000$).

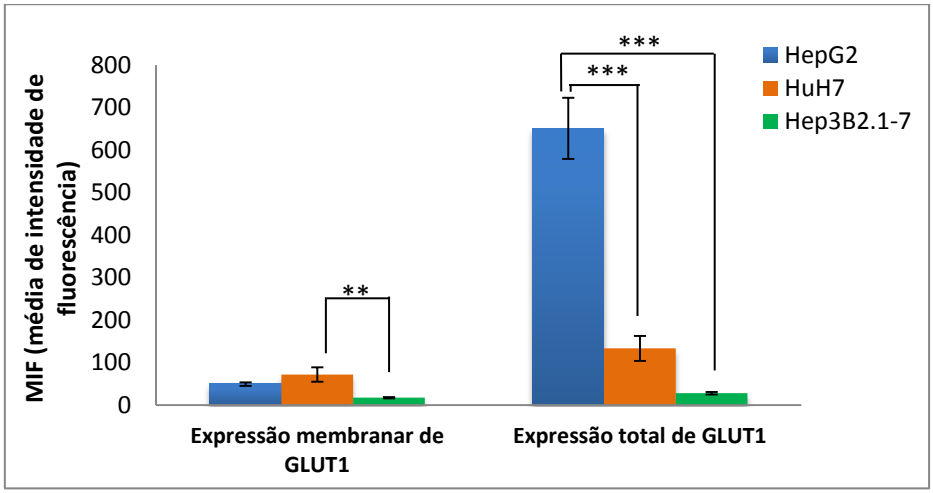


Figura 4.1. – Análise da expressão membranar e total de GLUT1 por citometria de fluxo. Os resultados são expressos em termos da média de intensidade de fluorescência (MIF) e expressam a média e desvio padrão de três experiências independentes para as três linhas celulares em estudo. Análise estatística: ** p<0,01; *** p<0,001.

Na Figura 4.2. estão representados os níveis de expressão membranar e total do GLUT3 para as três linhas celulares em estudo. Verifica-se que a linha celular Hep3B2.1-7 tem tendência para expressar mais GLUT3 membranar do que as outras duas linhas celulares em estudo, enquanto as restantes linhas celulares apresentam uma expressão idêntica. No entanto, a análise estatística revela que não existem diferenças significativas na expressão deste transportador entre as três linhas celulares em estudo (p=0,471).

Em relação à expressão total desta proteína, verifica-se que de modo semelhante ao que aconteceu com o GLUT1, a linha celular que mais expressa GLUT3 é a HepG2 (Figuras 4.1. e 4.2.), apresentando diferenças com significado estatístico relativamente às outras duas linhas celulares (p<0,05). As linhas celulares Hep3B2.1-7 e HuH7 são as que menos expressam GLUT3, não apresentando diferença estatística entre si (p=0,774).

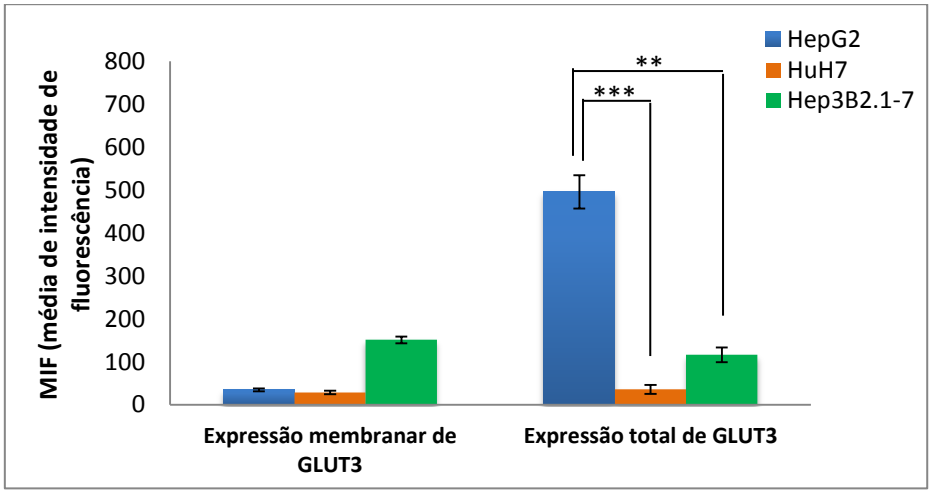


Figura 4.2. – Análise da expressão membranar do GLUT3 por citometria de fluxo. Os resultados são expressos em termos da média de intensidade de fluorescência (MIF) e expressam a média e desvio padrão de três experiências independentes para as três linhas celulares em estudo. Análise estatística: ** p<0,01; *** p<0,001.

A Figura 4.3. representa os resultados de citometria de fluxo para a avaliação da expressão membranar das três proteínas MDR em estudo: a Pgp, a MRP1 e a LRP. No caso da proteína Pgp (Figura 4.3. a)), existe uma tendência para a linha celular HuH7 ser a que mais expressa. Por sua vez, a linha celular que tende a expressar menos Pgp é a Hep3B2.1-7. No entanto, a análise estatística revela que não há diferenças estatisticamente significativas entre os três grupos em análise (p=0,341).

A linha celular HepG2 é a que apresenta maior expressão membranar de MRP1, ainda que seja um valor baixo. Este valor apresenta significância estatística (p<0,05) quando comparado com os valores das outras linhas celulares. As linhas celulares HuH7 e Hep3B2.1-7 apresentam expressões idênticas e inferiores à linha celular HepG2 (Figura 4.3. b)), não apresentando diferença estatística entre si (p=1,000).

Na Figura 4.3. c) está representada a expressão total de LRP para as três linhas celulares em estudo. Ao observar a figura, constata-se que a linha celular que apresenta valores mais elevados de expressão desta proteína é a linha celular Hep3B2.1-7, enquanto as outras duas linhas celulares (HepG2 e HuH7) apresentam valores similares e inferiores à Hep3B2.1-7. No

entanto, e há semelhança do que acontece para a proteína Pgp, não existem diferenças estatísticas entre as linhas celulares em estudo (p=0,202)

Há que salientar que, de entre as três proteínas MDR em estudo, a LRP é aquela que é mais expressa em todas as linhas celulares.

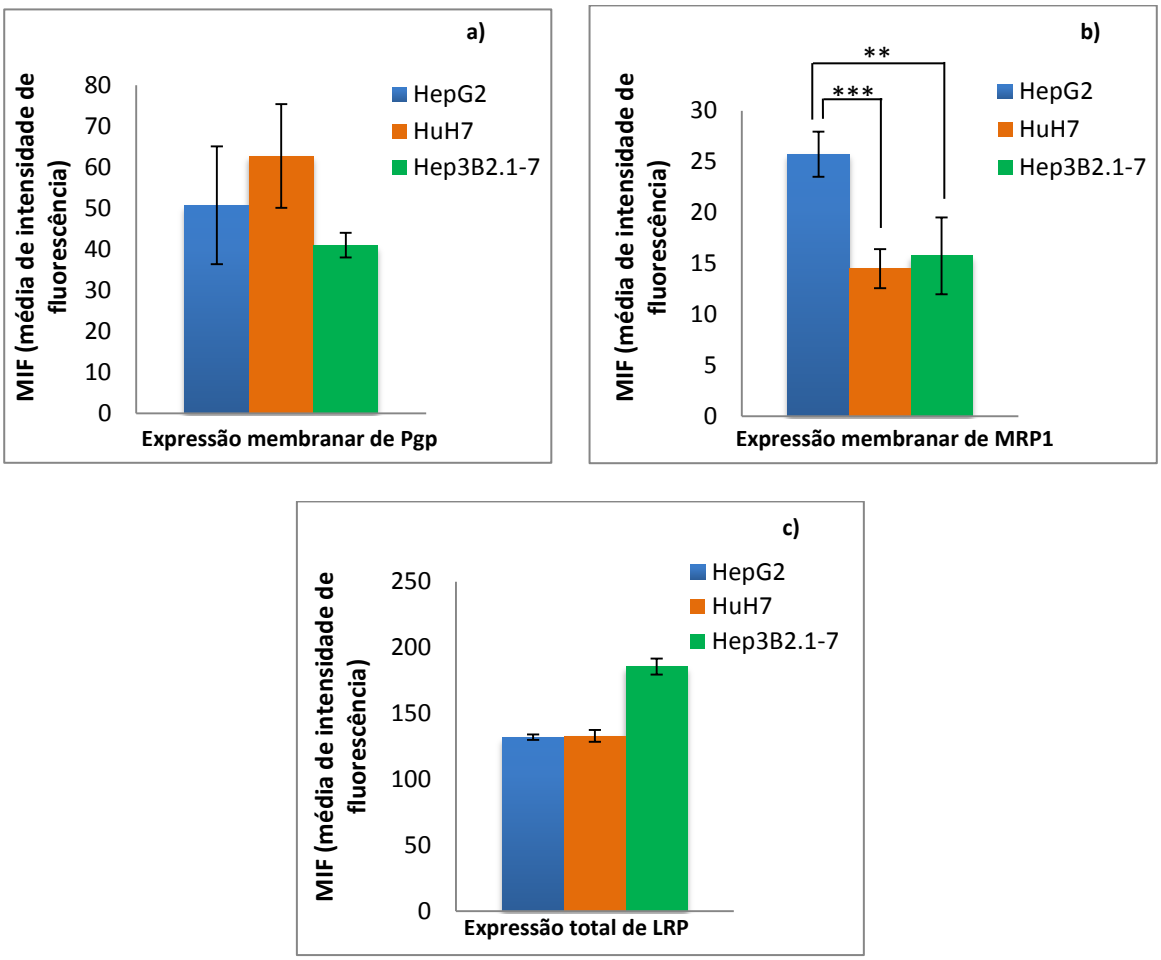


Figura 4.3. – a) Análise da expressão membranar de Pgp por citometria de fluxo; b) análise da expressão membranar de MRP1 por citometria de fluxo; c) análise da expressão total de LRP por citometria de fluxo. Os resultados são expressos em termos da média de intensidade de fluorescência (MIF) e expressam a média e desvio padrão de quatro experiências independentes para as três linhas celulares em estudo. Análise estatística: ** p<0,01; *** p<0,001.

4.2. Estudos de Captação e Retenção

Nas Figuras 4.4. e 4.5. estão representados, respectivamente, os estudos de captação e retenção realizados com ^{18}F-FDG.

Conforme se pode constatar através da observação das figuras existe uma concordância entre a percentagem de captação e a percentagem de retenção para cada linha celular.

Para os tempos iniciais de captação (5 e 15 minutos) não existem diferenças estatísticas entre as três linhas celulares ($p>0,05$). Para os restantes tempos existem diferenças estatísticas entre as três linhas celulares em estudo ($p<0,05$), sendo a linha celular HepG2 aquela que apresenta uma captação de ^{18}F-FDG estatisticamente inferior, tendo um pico de captação de cerca de 1,19% aos 30 minutos. A linha celular Hep3B2.1-7 é aquela que mais capta o radiofármaco, com um pico de captação aos 90 minutos de cerca de 3,54%. A linha celular HuH7 apresenta valores intermédios (com um pico de captação de 1,99%).

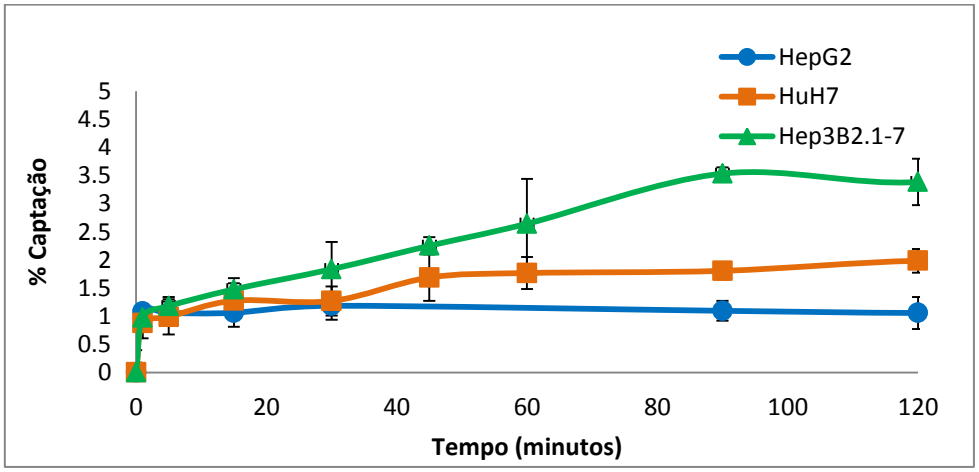


Figura 4.4. – Percentagem de captação de ^{18}F-FDG pelas três linhas celulares em estudo, ao longo do tempo. Os dados expressam a média e desvio padrão de quatro experiências independentes.

Relativamente aos estudos de retenção, a linha celular que apresenta valores mais elevados comparando com as restantes linhas é a linha celular Hep3B2.1-7, com uma percentagem de retenção de 36% ao primeiro minuto. A linha celular que menos retém o radiofármaco é a linha celular HepG2, apresentando, ao primeiro minuto, uma retenção de 7,5%. A linha celular HuH7 apresenta valores intermédios (16% de retenção ao primeiro minuto de incubação). Para todos os tempos de incubação existem diferenças estatísticas entre as três linhas celulares, com um valor de significância sempre inferior a 0,05.

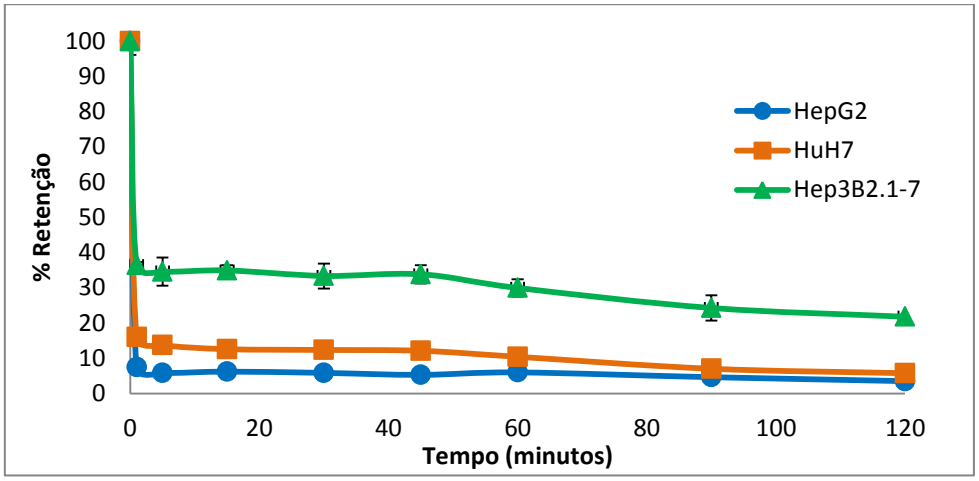


Figura 4.5. – Percentagem de retenção de ^{18}F-FDG pelas três linhas celulares em estudo, ao longo do tempo. Os dados expressam a média e desvio padrão de quatro experiências independentes.

Os resultados dos estudos de captação e retenção com ^{99m}Tc-MIBI estão representados na Figura 4.6. e Figura 4.7., respectivamente.

No caso do ^{99m}Tc-MIBI, a linha celular Hep3B2.1-7 é aquela que menos capta o radiofármaco, tendo uma tendência para estabilizar ao longo do tempo, com um pico de captação aos 90 minutos de aproximadamente 2,3% (Figura 4.6.). Para este tempo de incubação a diferença estatística entre as linhas celulares é significativa ($p=0,047$). A linha celular HuH7 é aquela que mais capta ^{99m}Tc-MIBI, apresentando um pico de captação aos 30 minutos de, aproximadamente, 5,9%, existindo diferença estatística entre as três linhas celulares ($p=0,023$) para este tempo de incubação. Para os 60 e 120 minutos de incubação não existe diferença estatística entre as três linhas celulares ($p>0,05$). A linha celular HepG2 apresenta valores intermédios, com um pico de captação de 4,2% aos 60 minutos.

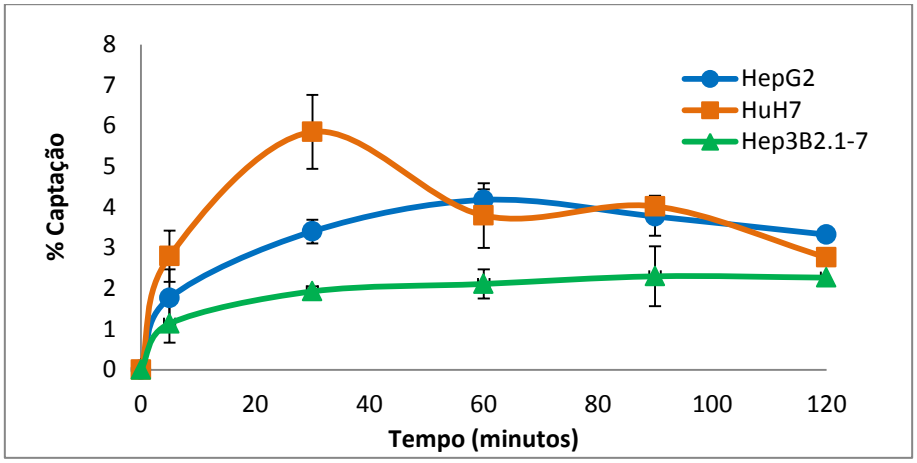


Figura 4.6. – Percentagem de captação de ^{99m}Tc-MIBI pelas três linhas celulares em estudo, ao longo do tempo. Os dados expressam a média e desvio padrão de quatro experiências independentes.

Em relação aos estudos de retenção com ^{99m}Tc-MIBI, a linha celular HuH7 é aquela que retém em maior percentagem este radiofármaco, apresentando aproximadamente 60% de retenção ao primeiro minuto. A linha celular Hep3B2.1-7 é a que possui uma menor percentagem de retenção. A linha HepG2 apresenta valores intermédios, tal como se pode observar na Figura 4.7. Tal como nos estudos de retenção de ^{18}F-FDG, também, neste caso, os resultados da análise estatística mostram diferenças estatisticamente significativas para todos os tempos de incubação entre as três linhas celulares ($p<0,05$).

Quando comparados os dois radiofármacos, curiosamente, ao contrário do que acontece com o ^{99m}Tc-MIBI, onde a linha celular Hep3B2.1-7 é a que apresenta as percentagens mais baixas de captação mas retém uma maior percentagem de ^{18}F-FDG. As linhas celulares HepG2 e HuH7 mantêm um perfil idêntico para ambos os radiofármacos.

A viabilidade celular foi avaliada ao fim dos 120 minutos de captação ou retenção, recorrendo ao método de exclusão do azul tripano, os resultados mostraram uma viabilidade celular sempre acima dos 85% para todas as linhas celulares.

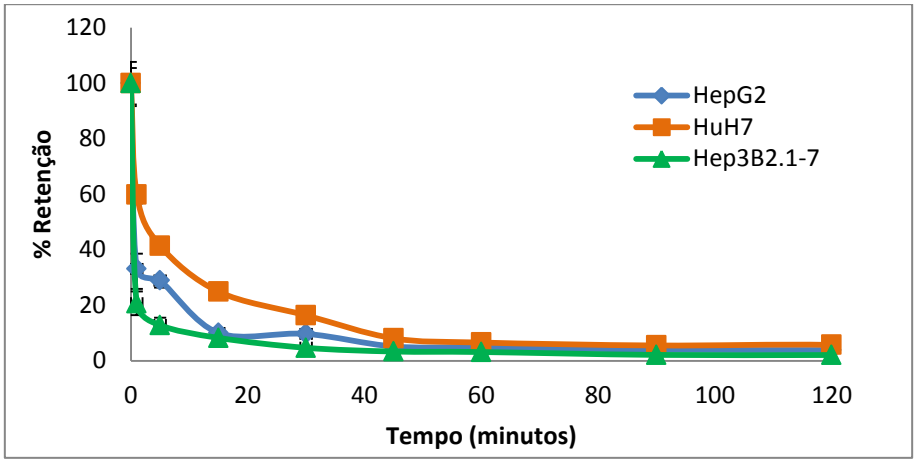


Figura 4.7. – Percentagem de retenção de ^{99m}Tc-MIBI pelas três linhas celulares em estudo, ao longo do tempo. Os dados expressam a média e desvio padrão de quatro experiências independentes.

4.3. Avaliação do Efeito do Verapamil na Proliferação Celular por Espectrofotometria

Para avaliar o efeito do verapamil, um modulador da Pgp, na proliferação celular, incubaram-se as três linhas celulares, HepG2, HuH7 e Hep3B2.1-7 com concentrações crescentes deste composto, num intervalo entre 1 µM e 250 µM. A proliferação celular foi avaliada após 24, 48, 72 e 96 horas de incubação.

Para a realização deste estudo recorreu-se ao ensaio colorimétrico do MTT, de modo a obter as diferentes curvas de dose-resposta e a encontrar o valor de IC_{50} (concentração inibitória média, ou seja, a concentração com a qual a proliferação celular é inibida em 50%) para cada linha celular e para cada tempo de incubação. Os resultados obtidos podem ser observados nas figuras 4.8., 4.9. e 4.10. sobre a forma de curvas dose-resposta, e nas tabelas 4.1., 4.2. e 4.3. onde estão apresentados os valores de $IC_{50,}$ o respectivo r^2 e intervalo de confiança.

Através da observação das Figuras 4.8., 4.9. e 4.10. verifica-se que o verapamil possui um efeito inibitório na proliferação celular para todas as linhas celulares em estudo, e que este efeito é dependente da concentração de composto utilizada e do tempo de incubação.

Observando os valores de IC_{50} presentes nas tabelas 4.1., 4.2. e 4.3. percebe-se que a linha celular HepG2 é a linha celular mais sensível ao fármaco em estudo, apresentando os valores mais baixos de IC_{50} para todos os tempos de incubação. Verifica-se que, após 24 e 48 horas, são necessários, respectivamente, 72,92 µM e 37,25 µM para obter o IC_{50}, havendo diferenças estatisticamente significativas entre estes dois tempos de incubação ($p<0,05$). A partir das 72 horas de incubação o valor de IC_{50} começa a aumentar, sendo necessários 43,55 µM e 46,38 µM, para inibir a proliferação celular em 50%, para os tempos de incubação de 72 e 96 horas, respectivamente. No entanto, entre estes tempos de incubação não existem diferenças estatísticas ($p=0,846$).

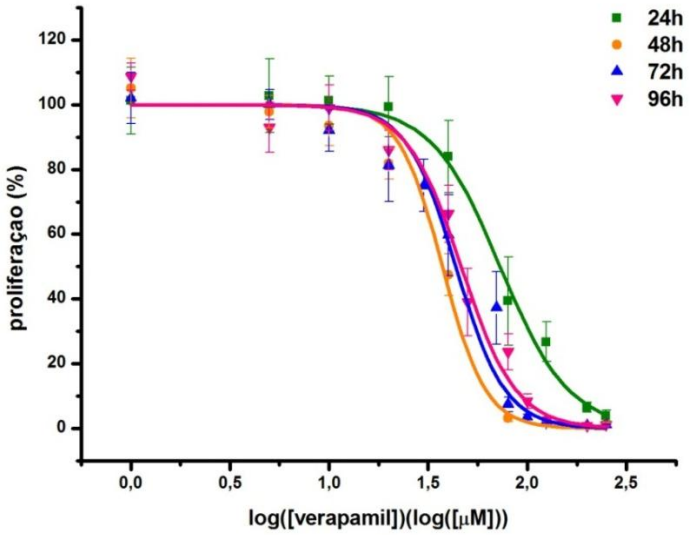


Figura 4.8. – Curva de dose-resposta da linha celular HepG2 após incubação com concentrações crescentes de verapamil durante 24, 48, 72 e 96 horas. Os resultados expressam a média e desvio padrão de seis experiências independentes.

Tabela 4.1. – Valor de IC_{50}, r^2 e intervalo de confiança para a linha celular HepG2, quando incubada com verapamil para os diferentes períodos de incubação.

	IC_{50} (µM)	r^2	Intervalo de Confiança (µM)
24h	72,92	0,99	[69,201 ; 76,830]
48h	37,25	0,98	[34,780 ; 39,898]
72h	43,55	0,96	[40,057 ; 47,337]
96h	46,38	0,98	[43,788 ; 49,121]

A linha celular HuH7 é aquela que se mostra mais resistente ao verapamil, uma vez que são necessárias concentrações superiores deste composto para que a proliferação celular seja inibida em 50%, excepto para um tempo de incubação de 72 horas, tempo de incubação em que a concentração mais alta de IC_{50} pertence à linha celular Hep3B2.1-7. Para a linha celular HuH7 foi possível calcular os valores de IC_{50} que correspondem a 155,40 µM para as 24 horas, 85,59 µM para as 48 horas, 44,02 µM para as 72 horas e 68,4 7µM para as 96 horas, como se pode observar na tabela 4.2, embora para as 72 horas não haja diferenças estatísticas entre esta linha celular e a linha celular HepG2 (p=1,000). Tal como acontece com a linha celular HepG2, também a linha HuH7 apresenta um aumento do valor de IC_{50} após 96 horas de incubação com o referido composto.

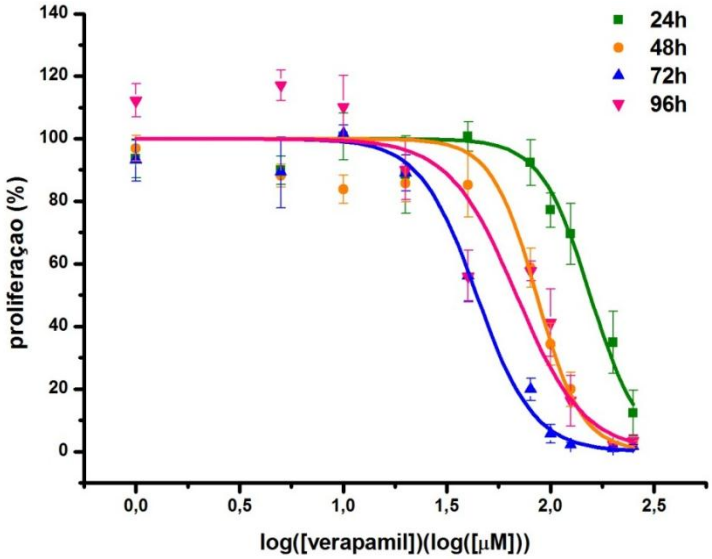


Figura 4.9. – Curva de dose-resposta da linha celular HuH7 após incubação com concentrações crescentes de verapamil durante 24, 48, 72 e 96 horas. Os resultados expressam a média e desvio padrão de seis experiências independentes.

Tabela 4.2. – Valor de IC_{50}, r^2 e intervalo de confiança para a linha celular HuH7 quando incubada com verapamil para os diferentes períodos de incubação.

	IC_{50} (µM)	r^2	Intervalo de Confiança (µM)
24h	155,40	0,98	[148,473 ; 162,650]
48h	85,59	0,98	[80,746 ; 90,720]
72h	44,02	0,98	[40,874 ; 47,414]
96h	68,47	0,93	[58,350 ; 80,346]

A linha celular Hep3B2.1-7 possui valores intermédios entre as restantes linhas celulares, para os tempos de incubação de 24, 48 e 96 horas, com valores de 94,89 µM, 81,81 µM e 54,20 µM, respectivamente. No entanto é importante ter em conta que para as 48 horas não existe diferença estatisticamente significativa entre esta linha celular e a HuH7 (p=0,377). Curiosamente, após 72 horas de incubação, a linha Hep3B2.1-7 é aquela que apresenta o valor de IC_{50} mais elevado (66,46 µM). Ao contrário do que acontece com as linhas celulares HuH7 e HepG2, esta linha celular apresenta valores de IC_{50} sempre decrescentes à medida que o tempo de incubação aumenta.

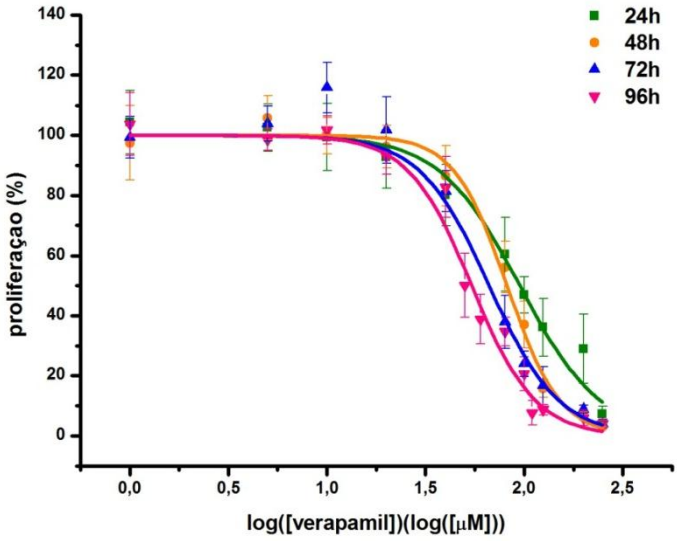


Figura 4.10. – Curva de dose-resposta da linha celular Hep3B2.1-7 após incubação com concentrações crescentes de verapamil durante 24, 48, 72 e 96 horas. Os resultados expressam a média e desvio padrão de seis experiências independentes.

Tabela 2.3. – Valor de IC_{50}, r^2 e intervalo de confiança para a linha celular Hep3B2.1-7 quando incubada com verapamil, para os diferentes períodos de incubação.

	IC_{50} (µM)	r^2	Intervalo de Confiança (µM)
24h	94,89	0,97	[87,774 ; 102,583]
48h	81,81	0,99	[78,765 ; 84,966]
72h	66,46	0,99	[62,488 ; 70,691]
96h	54,20	0,97	[50,804 ; 57,831]

Em todos os estudos apresentados neste subcapítulo verifica-se que o r^2 é sempre superior a 0,9, o que significa que existe uma boa aproximação à curva sigmóide, que é aquela que melhor representa uma aproximação à curva dose-resposta.

4.4. Estudos de Retenção utilizando um Modulador MDR

Através dos estudos de modulação utilizando verapamil com ^{18}F-FDG pretendeu-se avaliar o efeito do composto na retenção deste radiofármaco em duas das linhas celulares humanas de CHC em estudo, as HepG2 e as HuH7.

Inicialmente incubaram-se as células com duas concentrações diferentes do composto em estudo, de modo a determinar qual a concentração com que se obtinham os melhores resultados ao nível do aumento da retenção, não comprometendo a viabilidade celular. A concentração utilizada foi escolhida de acordo com o IC_{50} obtido para as 72 horas de incubação.

Foram realizados estudos de captação preliminares nos quais se utilizou uma actividade de 25 µCi de ^{18}F-FDG por ml de suspensão celular e se incubaram as linhas celulares com concentrações de 90 µM e 180 µM de verapamil, durante 60 minutos antes da incubação com o radiofármaco. Para a concentração de 90 µM verificou-se que, na linha celular HuH7, ocorreu um aumento imediato da percentagem de retenção de ^{18}F-FDG, o que se pode verificar quando se compara este resultado com a curva controlo, que neste caso, é a curva correspondente à retenção por parte das células que não foram incubadas com verapamil, tal como pode ser observado na Figura 4.11. No entanto, para os tempos de 60 e 90 minutos de incubação não existem diferenças estatisticamente significativas (p=0,997 e p=0,092, respectivamente).

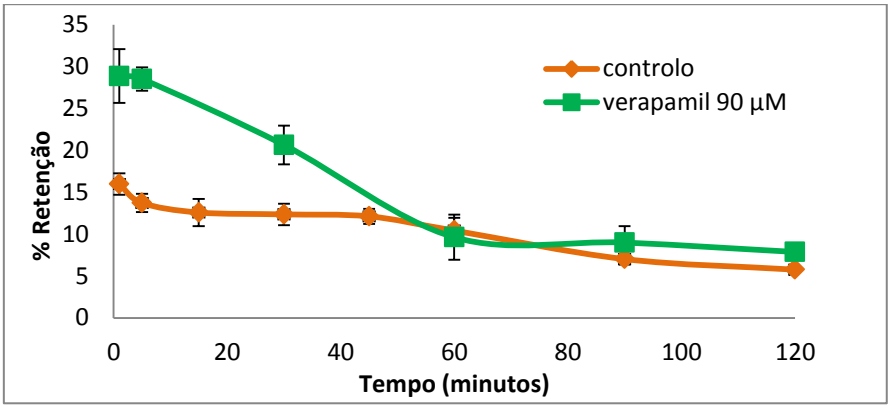


Figura 4.11. – Percentagem de retenção de ^{18}F-FDG pela linha celular HuH7, ao longo do tempo, em células controlo e células incubadas com 90 µM de verapamil. Os dados expressam a média e desvio padrão de quatro experiências independentes**.**

No caso da linha celular HepG2, quando se utilizou uma concentração de 90 µM não se observaram diferenças nos níveis de retenção de ^{18}F-FDG entre as células tratadas com verapamil e as células controlo. O aumento da retenção só foi notório quando se utilizou uma concentração de 180 µM do composto, cuja curva está representada na Figura 4.12. Para ambas as linhas celulares a diferença na percentagem de retenção é maior para os tempos iniciais (aproximadamente o dobro), havendo uma tendência para se aproximarem ao longo do tempo, embora estes resultados sejam preliminares (n=2).

Nos estudos de modulação, após os 120 minutos de retenção avaliou-se a viabilidade celular, recorrendo ao método de exclusão do azul tripano, os resultados mostraram uma viabilidade celular sempre acima dos 80%.

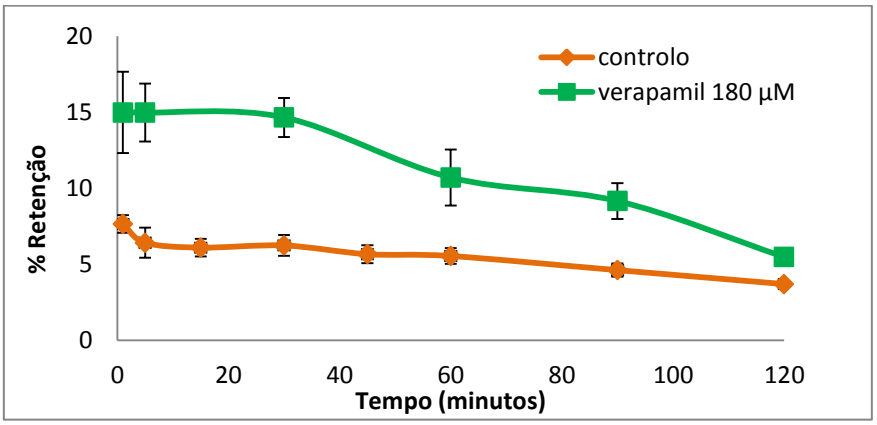


Figura 4.12. – Percentagem de retenção de ^{18}F-FDG pela linha celular HepG2, ao longo do tempo, em células controlo e células incubadas com 180 µM de verapamil. Os dados expressam a média e desvio padrão de 2 experiências independentes**.**

V. Discussão

O CHC é, hoje em dia, um dos cancros com maior taxa de morbilidade e mortalidade a nível mundial[1]. A ressecção cirúrgica e o transplante hepático são ainda a melhor hipótese de cura, mas uma vez que o número de doentes que pode beneficiar destas terapias é reduzido, têm vindo a ser desenvolvidas terapias alternativas, onde se inclui a quimioterapia[10,11]. No entanto, o CHC é conhecido por ser um tumor altamente resistente à quimioterapia, o que constitui um problema de elevada importância. A investigação crescente, num campo de intervenção tão importante como o cancro é, inquestionavelmente, necessária, fazendo com que vários grupos de investigação trabalhem com o objectivo de encontrar explicações e possíveis soluções para esta problemática.

A habilidade das células tumorais de se tornarem resistentes a diferentes tipos de fármacos está relacionada com diferentes mecanismos, entre eles é de salientar a presença de proteínas transportadoras que extrusam os fármacos (bombas de efluxo) impedindo a sua actuação[13]. Existem várias proteínas MDR já identificadas, algumas pertencem à superfamília das proteínas ABC e outras à superfamília das proteínas *Vault*[12,28]. Um dos métodos mais utilizados para quantificar a função das proteínas MDR envolve o uso de substratos radiomarcados, como o ^{99m}Tc-MIBI, através da avaliação da captação e da retenção antes e depois da inibição dos transportadores[49,43]. Este radiotraçador é catiónico e ligeiramente lipofílico, o que lhe confere as características principais da maioria dos substratos das bombas de efluxo MDR[12,50].

O ^{18}F-FDG, o análogo radiomarcado da glicose, é o principal radiofármaco utilizado no exame de imagiologia PET, permitindo a visualização de alterações na taxa metabólica da glicose nas células tumorais. Seo *et al* demonstraram que a captação deste radiotraçador pelas células tumorais, incluindo células de CHC, está inversamente correlacionada com os níveis de expressão de Pgp, sugerindo que o ^{18}F-FDG pode ser substrato para as proteínas MDR, uma vez que a Pgp pode estar a actuar como uma bomba de efluxo reduzindo a acumulação deste radiofármaco nas células[39,51–53].

Tendo por base todos estes estudos, este trabalho tem como objectivos avaliar a expressão de três proteínas MDR (Pgp, MRP1 e LRP) e de dois transportadores de glicose (o GLUT1 e o GLUT3, conhecidos por serem os principais responsáveis pela entrada de ^{18}F-FDG nas células tumorais[54–56]) e, correlacionar esses resultados com a capacidade de captação e retenção de ^{18}F-FDG e ^{99m}Tc-MIBI de três linhas celulares humanas de CHC.

Os estudos de captação e retenção de ^{18}F-FDG foram realizados com o intuito de estudar se este radiofármaco pode ser útil na avaliação de MDR em CHC. Sabe-se que a entrada de ^{18}F-FDG nas células dá-se através dos GLUTs, transportadores de membrana que pertencem à superfamília de proteínas MFS (do inglês *Major Facilitator Superfamily*). Actualmente são conhecidos 14 membros[54].

Analisando os resultados dos estudos de captação de ^{18}F-FDG verifica-se que a linha celular Hep3B2.1-7 é aquela que apresenta maiores percentagens, devido, essencialmente, ao facto de ser aquela que mais expressa GLUT3 membranar. A linha celular HuH7 é a que mais expressa GLUT1 membranar, o que faz com que, a seguir à linha celular Hep3B2.1-7, seja a que mais capta ^{18}F-FDG. A linha celular HepG2 apresenta valores superiores para a expressão total de ambos os GLUTs, mas valores mais baixos de captação de ^{18}F-FDG em relação às outras duas linhas celulares. O que sugere que estas células possuem uma grande reserva destes transportadores a nível intracelular prontos a desempenhar a sua função sempre que seja requerido.

Os estudos de retenção vão de encontro ao que acontece nos estudos de captação, uma vez que a linha celular Hep3B2.1-7 é aquela que mais retém o ^{18}F-FDG e a linha celular HepG2 a que retém menos. Através da análise da expressão das proteínas MDR, em que se verifica que a linha celular Hep3B2.1-7 é aquela que menos expressa Pgp, podemos encontrar a justificação para que a retenção de ^{18}F-FDG em Hep3B2.1-7 seja superior às outras duas, uma vez que existe uma relação inversa entre a captação e retenção deste fármaco e a expressão de Pgp nas células tumorais, como está descrito em diferentes trabalhos na bibliografia[39,51,57,58]. É natural que, ao

existir uma quantidade considerável de proteínas a extrusar o radiofármaco, a sua presença dentro das células, ou seja, a sua captação e/ou retenção diminua. Ao mesmo tempo, uma vez que a linha celular Hep3B2.1-7 é aquela que mais capta, é normal que também seja a que retém mais o radiofármaco.

Seguindo esta lógica a linha celular HepG2 devia expressar mais Pgp, visto que tem percentagens de retenção mais baixas. Mas tal não se verifica, o que pode ser explicado pelo facto desta linha celular ser a que expressa mais a proteína de efluxo MRP1.

É importante referir também que para tempos mais tardios o efluxo ocorre em simultâneo com a captação, e é possível correlacionar-se as curvas de captação e retenção. Ou seja, a captação de ^{18}F-FDG pode ser também explicada como base nas proteínas MDR, e não só nos GLUTs, assemelhando-se à retenção.

De entre todas as proteínas MDR avaliadas, a LRP é aquela que é mais expressa em todas as linhas celulares estudadas, principalmente na linha Hep3B2.1-7, o que alvitra que esta proteína MDR não está correlacionada com a extrusão de ^{18}F-FDG das células destas três linhas celulares de CHC.

Observando os resultados obtidos através dos estudos de captação e de retenção do ^{99m}Tc-MIBI consegue perceber-se, de uma forma geral, tal como no caso do ^{18}F-FDG, que existe uma analogia entre as curvas da captação e retenção. A captação de ^{99m}Tc-MIBI nas células está relacionada com a sua natureza lipofílica e catiónica. Estas características conferem-lhe a capacidade de atravessar a membrana citoplasmática por difusão passiva devido ao potencial eléctrico transmembranar. Ao atravessar a membrana o radiofármaco acumula-se nas mitocôndrias[59]. Desta forma seria importante correlacionar o potencial de membranar, quer citoplasmático, quer mitocondrial, para avaliar a contribuição desse factor na entrada do ^{99m}Tc-MIBI nas células em estudo, pois são mecanismos que certamente estão a interferir com os resultados, e podem constituir parâmetros que podem diferir entre linhas celulares.

A linha celular que apresenta valores mais baixos de retenção de ^{99m}Tc-MIBI é a linha celular Hep3B2.1-7. No entanto este resultado não vai de encontro com o descrito na literatura, uma vez que, a linha Hep3B2.1-7 que apresenta menor retenção é aquela que expressa menos Pgp, e a linha celular HuH7, que expressa mais Pgp, retém maiores percentagens deste radiotraçador[12,60–62]. O que sugere que a acção das outras proteínas MDR pode ter um papel mais relevante nestas linhas celulares, tal como, por exemplo a LRP (que é a mais expressa em Hep3B2.1-7). Assim, é possível inferir que o ^{99m}Tc-MIBI pode ser um eventual substrato para este transportador, pelo menos, para esta linha celular. Por outro lado, e como já foi dito anteriormente, o efluxo ocorre simultaneamente com a captação, para tempos mais tardios. Ora, uma vez que estas células são aquelas que menos captam, se extrusarem à mesma velocidade que as outras linhas celulares é natural que os seus valores de retenção também sejam inferiores.

Para poder aferir de forma mais precisa sobre estes resultados seria importante completar os estudos recorrendo a outras técnicas, tais como a técnica de *Western Blot* para avaliação da expressão das proteínas MDR de forma complementar com a citometria de fluxo que foi realizada.

De acordo com estudos realizados pela nossa equipa de investigação, com o objectivo de avaliar a expressão da proteína p53 nas três linhas CHC em estudo, verifica-se que existem diferenças na expressão da mesma. Através da realização da técnica de *Western Blot*, verifica-se que esta proteína se encontra sobreexpressa na linha celular HuH7, está expressa em níveis normais na linha HepG2 e em quantidades reduzidas na linha Hep3B2.1-7[63].

Estudos já realizados têm associado a expressão de p53 com a expressão de GLUTs, nas células tumorais, e consequentemente, com a entrada de ^{18}F-FDG nas células[41,42]. No seguimento destes estudos seria de esperar que a linha celular com maior taxa de captação fosse a HuH7, uma vez que mutações na p53, associadas a uma sobreexpressão, estão relacionadas com uma elevada percentagem de entrada de ^{18}F-FDG nas células. No entanto, a célula é um organismo demasiado complexo para que os resultados sejam explicados com base num único mecanismo.

Existem muitos outros factores que estão com certeza a interferir. Por outro lado, também não se pode excluir o facto de existirem outros transportadores de glicose expressos nas células tumorais que podem estar a contribuir para o facto da linha celular Hep3B2.1-7 apresentar uma taxa de captação maior que a linha HuH7, tal como, por exemplo, o GLUT2. Este transportador membranar é um dos transportadores *major* em CHC e está associado a uma elevada entrada de ^{18}F-FDG nestas células[64].

Para além de tudo isto, também é possível discutir, neste trabalho, a relação entre a expressão de GLUT1 e a expressão de p53. Sendo a HuH7 a proteína que mais expressa GLUT1 e a linha celular Hep3B2.1-7 aquela que menos expressa, este estudo indica que nas três linhas celulares de CHC estudadas quanto maior é a expressão de p53 maior é a expressão de GLUT1.

Em relação à expressão do GLUT3 (Figura 4.2) verifica-se, ao contrário do que acontece com o GLUT1, que existe uma tendência para que, a expressão membranar desta proteína esteja inversamente relacionada com expressão de p53, visto que a linha celular com menor expressão de GLUT3 é a HuH7, aquela que apresenta maior expressão membranar deste transportador, ou seja, é a linha celular Hep3B2.1-7, embora não existam diferenças com significado estatístico. Estes resultados vão de encontro com a controvérsia dos estudos encontrados na literatura, em que estes resultados são, ao mesmo tempo, corroborados[65] (havendo uma relação directa entre a expressão de p53 e a expressão de GLUT3) e negados[55] (não existe relação entre a expressão de p53 e GLUT3).

Constata-se que nas linhas celulares de CHC em estudo quando existe uma sobreexpressão de p53 resultante de uma mutação (que é o caso da linha HuH7), esta está directamente relacionada com uma expressão elevada de Pgp, ou seja, a linha celular HuH7 é aquela que mais expressa Pgp, enquanto as HepG2 e Hep3B2.1-7 que expressam p53 normalmente ou de forma residual apresentam valores inferiores dessa expressão. Estes resultados vão de encontro a outros estudos já realizados[30,33,67,68].

No caso da expressão da MRP1 verifica-se o contrário, o que contraria estudos desenvolvidos, que associam a p53 normal com uma supressão da expressão desta proteína[69]. Neste trabalho, a linha celular HepG2, que expressa a forma normal de p53, apresenta a maior expressão de MRP1.

Em relação aos resultados obtidos nos estudos de expressão da proteína LRP verifica-se que a linha celular Hep3B2.1-7 é aquela que mais expressa esta proteína. Este resultado sugere que uma supressão na expressão de p53 pode ser causa para um aumento na expressão de LRP, em tumores quimiorresistentes e vice-versa.

Os resultados da citometria de fluxo, principalmente para as proteínas Pgp e LRP, não apresentam significância estatística, desta forma seria necessário aumentar o número de experiências, uma vez que o apresentado é reduzido (n=3).

Muito se tem estudado acerca do papel das bombas de efluxo em diferentes linhas celulares de diferentes tipos de tumores, e distintas conclusões têm sido tiradas. Este estudo vai de encontro com alguns desses trabalhos. É evidente que a sobreexpressão de proteínas MDR não é o único factor implicado na quimiorresistência tumoral, existem outros mecanismos que estão envolvidos, incluindo a acção da proteína p53[30,33] e o balanço entre a expressão das proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas pertencentes à família Bcl-2[70]. Como a p53 tem um papel crucial na indução de apoptose celular quando existem mutações nesta proteína este mecanismo pode estar comprometido, daí que células que expressam p53 mutada possam apresentar maior resistência aos fármacos de quimioterapia, uma vez que a maioria dos agentes anticancerígenos actua através de indução de apoptose[30,41,68].

A principal estratégia para superar a resistência oferecida pelos tumores aos tratamentos de quimioterapia passa pelo uso de moduladores e/ou inibidores das bombas de efluxo. Neste estudo utiliza-se um modulador MDR de primeira geração, o verapamil, substrato para a Pgp, conhecido por modular a sua actividade através de uma inibição competitiva, bem como a função da MRP1[12,71,72].

Através dos estudos de avaliação da proliferação celular pretende-se atingir a concentração de verapamil necessária para inibir a proliferação celular em 50%, e usar esses valores como base para os estudos de modulação. Este fármaco é utilizado, na clínica, no tratamento de arritmias cardíacas, hipertensão e doença arterial coronária e tem função vasodilatadora[73]. As concentrações de verapamil utilizadas neste estudo para inibir a proliferação celular são de uma ordem de magnitude maior do que as utilizadas na sua aplicação em cardiologia. Estas concentrações elevadas de verapamil são tóxicas para as células, devido à sua acção sobre os canais de cálcio[74], podendo levar a problemas cardiovasculares graves, sendo esta a principal razão para que não se utilize o verapamil como solução para a quimiorresistência nos tumores que expressam Pgp. Schmidt *et al* mostram que o verapamil sozinho inibe rápida e reversivelmente a proliferação celular de uma maneira dependente da concentração e, que esse facto, não parece estar acoplado a movimentos de cálcio através da membrana celular[73]. Este facto pode, também, estar na base da não-utilização deste fármaco como agente anti-cancerígeno. Neste trabalho verificou-se também uma reversão da proliferação celular na linha HuH7 às 96 horas de incubação.

Os estudos de retenção de ^{18}F-FDG usando o modulador verapamil mostram uma diferença significativa entre a percentagem de retenção com e sem modulador, para duas das linhas celulares (HepG2 e HuH7). Estudos realizados neste âmbito têm mostrado o efeito deste fármaco nas células tumorais sendo que, após a administração do verapamil, a taxa de retenção é bastante maior[12,71]. Neste trabalho, a diferença é mais evidente nos tempos de incubação iniciais, em que a percentagem de retenção com modulador é, aproximadamente, o dobro.

Estes resultados vêm reforçar a teoria que o ^{18}F-FDG é substrato da Pgp, e eventualmente das outras proteínas MDR, uma vez que a sua retenção aumenta quando a Pgp é inibida, podendo ser útil no estudo de MDR em CHC.

VI. Conclusões e Perspectivas Futuras

A partir do trabalho realizado, cujo objectivo principal foi verificar a utilidade do radiofármaco ^{18}F-FDG no estudo de MDR em CHC, e tendo em conta os resultados obtidos, podemos retirar diversas conclusões.

Os estudos de captação com ^{18}F-FDG confirmaram o papel que os transportadores de glicose (GLUTs) têm na entrada deste radiofármaco nas células tumorais. A linha celular Hep3B2.1-7 é aquela que mais capta este radiofármaco o que se julga estar relacionado, pelo menos em parte, com o papel do GLUT3, uma vez que a nível membranar é nesta linha que ele é mais expresso.

Em relação aos estudos de retenção, a linha celular é Hep3B2.1-7 é a que mais retém ^{18}F-FDG devido essencialmente ao facto de ser a que menos expressa a proteína Pgp. A linha celular HepG2 possui a percentagem de retenção de ^{18}F-FDG mais baixa por ser também a que menos capta, e este resultado pode estar também relacionado com o facto de esta linha celular ser aquela que mais expressa MRP1.

Em relação às três proteínas MDR estudadas, a LRP é aquela que é mais expressa em todas as linhas celulares estudadas, principalmente na linha celular Hep3B2.1-7. Isto permite concluir que esta proteína não está relacionada com a captação e retenção de ^{18}F-FDG em CHC. As proteínas MRP1 e LRP têm um papel mais importante na extrusão do ^{99m}Tc-MIBI do que a proteína Pgp. Com isto, julga-se que o ^{99m}Tc-MIBI pode ser substrato para a proteína LRP nestas linhas celulares, uma vez que já é substrato para a MRP1.

Também se pode tirar conclusões sobre o papel da proteína p53 nas três linhas celulares de CHC estudadas. Neste estudos conclui-se que quanto maior é a expressão de p53 maior é a expressão de GLUT1 e, que existe uma relação inversa entre a expressão de GLUT3 e a expressão de p53, apesar de não haver significado a nível estatístico.

Constata-se que, nas linhas celulares de CHC em estudo quando existe uma sobreexpressão de p53 resultante de uma mutação existe também uma maior expressão de Pgp. No caso da expressão da MRP1 verifica-se que a expressão de p53 está inversamente relacionada

com a expressão desta proteína. Uma supressão na expressão de p53 pode ser causa para um aumento na expressão de LRP, em tumores quimiorresistentes, e vice-versa.

O ensaio do MTT realizado nas três linhas celulares de CHC quando incubadas com verapamil (inibidor da Pgp) mostrou ter efeitos anti-proliferativos. Neste trabalho verificou-se ainda uma reversão da proliferação celular na linha HuH7 às 96 horas de incubação.

Os estudos de retenção de ^{18}F-FDG usando o modulador verapamil mostram uma diferença significativa entre a percentagem de retenção com e sem modulador, para duas das linhas celulares (HepG2 e HuH7). Estes resultados revelam que o ^{18}F-FDG pode ser substrato para a Pgp, e como tal, constitui uma alternativa promissora no diagnóstico de tumores quimiorressistentes, tal como o CHC.

No futuro, de forma a complementar este trabalho, seria importante realizar outros estudos e recorrer a novas técnicas. Nomeadamente analisar e quantificar a expressão de outros GLUTs, tais como o GLUT2; avaliar o potencial de membranar, quer citoplasmático, quer mitocondrial, para aferir a contribuição desse factor na entrada do ^{99m}Tc-MIBI nas células; recorrer à técnica de *Western Blot* para avaliação da expressão das proteínas MDR e GLUTs de forma complementar com a citometria de fluxo; aumentar o número de experiências de citometria de fluxo para as proteínas MDR, uma vez que o apresentado é reduzido (n=3); analisar a expressão total de Pgp e MPR1; realizar estudos de retenção de ^{18}F-FDG com verapamil para a linha celular Hep3B2.1-7 e também de ^{99m}Tc-MIBI; realizar estudos de combinação de verapamil com agentes de quimioterapia (doxorrubicina, cisplatina, etc.) para verificar se existe uma diminuição do IC_{50} destes agentes, ou seja, diminuição da resistência aos fármacos. Para suplementar estes estudos podiam ainda criar-se linhas celulares resistentes aos agentes quimioterapêuticos, e realizar os mesmos procedimentos nestas linhas celulares.

VII. Bibliografia

1. Skelton, M. & O'Neil, B. Targeted therapies for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 140, 1410-26 (2011).

2. Jemal, A., Bray, F. & Ferlay, J. Global Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin* 61, 69-90 (2011).

3. Yang, J.D. & Roberts, L.R. Hepatocellular carcinoma: A global view. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* 7, 448-58 (2010).

4. Ferlay, J. *et al.* GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer (2010). Acedido pela última vez em 11/06/2012 às 14h40. at <http://globocan.iarc.fr>

5. Okuda, K. Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Hepatology* 32, 225-237 (2000).

6. Mazzanti, R., Gramantieri, L. & Bolondi, L. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and clinical aspects. *Molecular aspects of medicine* 29, 130-43 (2008).

7. Alves, R.C.P. *et al.* Advanced hepatocellular carcinoma. Review of targeted molecular drugs. *Annals of hepatology : official journal of the Mexican Association of Hepatology* 10, 21-7 (2011).

8. Wang, X.W. *et al.* Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Toxicology* 181-182, 43-7 (2002).

9. Bruix, J. & Sherman, M. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 42, 1208-36 (2005).

10. El-Serag, H.B., Marrero, J. a, Rudolph, L. & Reddy, K.R. Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 134, 1752-63 (2008).

11. Cabrera, R. & Nelson, D.R. Review article: the management of hepatocellular carcinoma. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 31, 461-76 (2010).

12. Casalta-Lopes, J. Efflux Pumps Modulation in Colorectal Adenocarcinoma Cell Lines: The Role of Nuclear Medicine. *Journal of Cancer Therapy* 02, 408-417 (2011).

13. Gottesman, M.M., Fojo, T. & Bates, S.E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nature reviews. Cancer* 2, 48-58 (2002).

14. Walker, J.M. *Multi-Drug Resistance in Cancer*. *Life Sciences* 57-65 (Human Press: New York, 2010).doi:10.1007/978-1-60761-416-6

15. Leslie, E.M., Deeley, R.G. & Cole, S.P. Toxicological relevance of the multidrug resistance protein 1, MRP1 (ABCC1) and related transporters. *Toxicology* 167, 3-23 (2001).

16. Leslie, E.M., Deeley, R.G. & Cole, S.P.C. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicology and applied pharmacology* 204, 216-37 (2005).

17. Leonard, G., Fojo, T. & Bates, S. The Role of ABC Transporters in Clinical Practice. *The Oncologist* 8, 411-424 (2003).

18. Hennessy, M. & Spiers, J.P. A primer on the mechanics of P-glycoprotein the multidrug transporter. *Pharmacological research* 55, 1-15 (2007).

19. Teodori, E., Dei, S., Scapecchi, S. & Gualtieri, F. The medicinal chemistry of multidrug resistance (MDR) reversing drugs. *Farmaco* 57, 385-415 (2002).

20. Lehne, G. P-glycoprotein as a drug target in the treatment of multidrug resistant cancer. *Current drug targets* 1, 85-99 (2000).

21. Ambudkar, S.V., Kimchi-Sarfaty, C., Sauna, Z.E. & Gottesman, M.M. P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene* 22, 7468-85 (2003).

22. Stavrovskaya, A.A. Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells. *Biochemistry* 65, 95-106 (2000).

23. Zaja, R., Caminada, D., Loncar, J., Fent, K. & Smital, T. Development and characterization of P-glycoprotein 1 (Pgp1, ABCB1)-mediated doxorubicin-resistant PLHC-1 hepatoma fish cell line. *Toxicology and applied pharmacology* 227, 207-18 (2008).

24. Borst, P., Evers, R., Kool, M. & Wijnholds, J. The multidrug resistance protein family. *Biochimica et biophysica acta* 1461, 347-57 (1999).

25. Borst, P. & Elferink, R.O. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annual review of biochemistry* 71, 537-92 (2002).

26. Kruh, G.D. & Belinsky, M.G. The MRP family of drug efflux pumps. *Oncogene* 22, 7537-52 (2003).

27. Hipfner, D.R., Deeley, R.G. & Cole, S.P. Structural, mechanistic and clinical aspects of MRP1. *Biochimica et biophysica acta* 1461, 359-76 (1999).

28. Dalton, W.S. & Scheper, R.J. Lung resistance-related protein: determining its role in multidrug resistance. *Journal of the National Cancer Institute* 91, 1604-5 (1999).

29. Izquierdo, M. a, Scheffer, G.L., Schroeijers, a B., de Jong, M.C. & Scheper, R.J. Vault-related resistance to anticancer drugs determined by the expression of the major vault protein LRP. *Cytotechnology* 27, 137-48 (1998).

30. Ferreira, C.G., Tolis, C. & Giaccone, G. P53 and Chemosensitivity. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 10, 1011-21 (1999).

31. Tokino, T. & Nakamura, Y. The role of p53-target genes in human cancer. *Critical reviews in oncology/hematology* 33, 1-6 (2000).

32. Guan, Y.-song, He, Q. & La, Z. Roles of p53 in Carcinogenesis , Diagnosis and Treatment of Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Cancer Molecules* 2, 191-197 (2006).

33. Akimoto, M. *et al.* Relationship between therapeutic efficacy of arterial infusion chemotherapy and expression of P-glycoprotein and p53 protein in advanced hepatocellular carcinoma. *World journal of gastroenterology : WJG* 12, 868-73 (2006).

34. Quintas, A., Freire, A. & Halpern, M.J. *Bioquímica - Organização Molecular da Vida*. 333-351 (LIDEL: Lisboa, 2008).

35. Gatenby, R. a & Gillies, R.J. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nature reviews. Cancer* 4, 891-9 (2004).

36. Hsu, P.P. & Sabatini, D.M. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell* 134, 703-7 (2008).

37. Plathow, C. & Weber, W. a Tumor cell metabolism imaging. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 49 Suppl 2, 43S-63S (2008).

38. Murakami, K. FDG-PET for hepatobiliary and pancreatic cancer: Advances and current limitations. *World journal of clinical oncology* 2, 229-36 (2011).

39. Seo, S. *et al.* P-glycoprotein expression affects 18 F-fluorodeoxyglucose accumulation in hepatocellular carcinoma in vivo and in vitro. *International Journal of Oncology* 34, 1303-1312 (2009).

40. Seo, S. *et al.* Fluorine-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography predicts tumor differentiation, P-glycoprotein expression, and outcome after resection in hepatocellular carcinoma. *Clinical cancer research* 13, 427-33 (2007).

41. Smith, T.A.D. Influence of chemoresistance and p53 status on fluoro-2-deoxy-D-glucose incorporation in cancer. *Nuclear medicine and biology* 37, 51-5 (2010).

42. Smith, T.A.D., Sharma, R.I., Thompson, A.M. & Paulin, F.E.M. Tumor 18 F-FDG Incorporation Is Enhanced by Attenuation of P53 Function in Breast Cancer Cells In Vitro. *J Nucl Med* 47, 1525-1530 (2006).

43. Krasznai, Z. *et al.* Pgp inhibition by UIC2 antibody can be followed in vitro by using tumor-diagnostic radiotracers, 99mTc-MIBI and 18FDG. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 41, 665-669 (2010).

44. http://www.lgcstandards-atcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=HB-8065&Template=cellBiology. Acedido pela última vez a 18/05/2012 às 15h05.

45. http://www.lgcstandards-atcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=HB-8064&Template=cellBiology. Acedido pela última vez a 18/05/2012 às 15h06.

46. http://cellbank.nibio.go.jp/celldata/jcrb0403.htm. Acedido pela última vez a 18/05/2012 às 15h06.

47. Bernas, T., Grégori, G., Asem, E.K. & Robinson, J.P. Integrating cytomics and proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 5, 2-13 (2006).

48. http://www.microbehunter.com/2010/06/27/the-hemocytometer-counting-chamber/counting_chamber7/. Acedido pela última vez a 18/05/12 – 15h36.

49. Kannan, P. *et al.* Imaging the Function of P-Glycoprotein With Radiotracers: Pharmacokinetics and In Vivo Applications. *Clin Pharmacol Ther* 86, 368-377 (2009).

50. Piwnica-worms, D. *et al.* Functional Imaging of Multidrug-resistant P-Glycoprotein with an Organotechnetium Complex. *Cancer Res* 53, 977-984 (1993).

51. Seo, S. *et al.* Fluorine-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography predicts tumor differentiation, P-glycoprotein expression, and outcome after resection in hepatocellular carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 13, 427-33 (2007).

52. Yamada, K., Brink, I. & Engelhardt, R. Factors influencing [F-18] 2-fluoro-2-deoxy-D-glucose (F-18 FDG) accumulation in melanoma cells: is FDG a substrate of multidrug resistance (MDR)? *J Dermatol* 32, 335-345 (2005).

53. Bentley, J., Quinn, D.M., Pitman, R.S., Warr, J.R. & Kellett, G.L. The human KB multidrug-resistant cell line KB-Cl is hypersensitive to inhibitors of glycosylation. *Cancer Letters* 115, 221-227 (1997).

54. Thorens, B. & Mueckler, M. Glucose transporters in the 21st Century. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 298, E141-5 (2010).

55. Watanabe, M., Naraba, H., Sakyo, T. & Kitagawa, T. DNA damage-induced modulation of GLUT3 expression is mediated through p53-independent extracellular signal-regulated kinase signaling in HeLa cells. *Molecular cancer research : MCR* 8, 1547-57 (2010).

56. Schwartzenberg-Bar-Yoseph, F., Armoni, M. & Karnieli, E. The Tumor Suppressor p53 Down-Regulates Glucose Transporters GLUT1 and GLUT4 Gene Expression. *Cancer Research* 64, 2627-2633 (2004).

57. Higashi, K. *et al.* P-glycoprotein expression is associated with FDG uptake and cell differentiation in patients with untreated lung cancer. *Nucl Med Commun* 25, 19-27 (2004).

58. Lorke, D.E. *et al.* In Vitro and In Vivo Tracer Characteristics of an Established Multidrug-Resistant Human Colon Cancer Cell Line. *J Nucl Med* 42, 646-654 (2001).

59. Piwnica-Worms, D., Kronauge, J.F. & Chiu, M.L. Uptake and retention of hexakis (2-methoxyisobutyl isonitrile) technetium(I) in cultured chick myocardial cells. Mitochondrial and plasma membrane potential dependence. *Circulation* 82, 1826-1838 (1990).

60. Wang, H., Chen, X.-P. & Qiu, F.-Z. Correlation of expression of multidrug resistance protein and messenger RNA with 99mTc-methoxyisobutyl isonitrile (MIBI) imaging in patients with hepatocellular carcinoma. *World journal of gastroenterology : WJG* 10, 1281-5 (2004).

61. Vergote, J., Moretti, J.-luc, Vries, E.G.E.D.E. & Garnier-suillerot, A. Comparison of the kinetics of active efflux of 99m Tc-MIBI in cells with P-glycoprotein-mediated and multidrug-resistance protein-associated multidrug-resistance phenotypes. *Eur. J. Biochem* 252, 140-146 (1998).

62. Hendrikse, N. *et al.* 99mTc.sestamibi is a substrate for Pmglycoprotein and the multidrug resistance-associated protein. *British Joumal of Cancer* 77, 353-358 (1998).

63. Gomes, A.R.B. Quimio e Radioterapia no Carcinoma Hepatocelular. Influência da p53 - Dissertação de Mestrado em Bioquímica. (2012).

64. Paudyal, B. *et al.* Clinical implication of glucose transport and metabolism evaluated by 18 F-FDG PET in hepatocellular carcinoma. *International Journal of Oncology* 33, 1047-1054 (2008).

65. Kawauchi, K., Araki, K., Tobiume, K. & Tanaka, N. p53 regulates glucose metabolism through an IKK-NF-κB pathway and inhibits cell transformation. *Nat Cell Biol* 10, 611–8. (2008).

66. Gatenby, R. a & Gillies, R.J. Glycolysis in cancer: a potential target for therapy. *The international journal of biochemistry & cell biology* 39, 1358-66 (2007).

67. Thottassery, J., Zambetti, G., Arimor, K., Schuetz, E. & Schuetz, J. p53-dependent regulation of MDR1 gene expression causes selective resistance to chemotherapeutic agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 11037-11042 (1997).

68. Ng, I.O., Liu, C.L., Fan, S.T. & Ng, M. Expression of P-glycoprotein in hepatocellular carcinoma. A determinant of chemotherapy response. *American journal of clinical pathology* 113, 355-63 (2000).

69. Tian, B. *et al.* p53 Suppresses lung resistance-related protein expression through Y-box binding protein 1 in the MCF-7 breast tumor cell line. *No J Cell Physiol* 226, 3433-41 (2011).

70. Fabregat, I. Dysregulation of apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *World Journal of Gastroenterology* 15, 513 (2009).

71. Gomes, C.M.F., Abrunhosa, A.J., Pauwels, E.K.J. & Botelho, M.F. P-Glycoprotein versus MRP1 on Transport Kinetics of Cationic Lipophilic Substrates: A Comparative Study Using [99mTc]Sestamibi and [99mTc]Tetrofosmin. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals* 24, 215-227 (2009).

72. Abe, T. *et al.* Chemosensitisation of spontaneous multidrug resistance by a 1,4-dihydropyridine analogue and verapamil in human glioma cell lines overexpressing MRP or MDR1. *British journal of cancer* 72, 418-23 (1995).

73. Schmidt, W.F., Huber, K.R., Ettinger, R.S. & Neuberg, R.W. Antiproliferative Effect of Verapamil Alone on Brain Tumor Cells in Vitro. *Cancer Research* 48, 3617-3621 (1988).

74. Toffoli, G. *et al.* Structure-activity relationship of verapamil analogs and reversal of multidrug resistance. *Biochemical pharmacology* 50, 1245-55 (1995).